

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE MEDICINA
INSTITUT UNIVERSITARI PARC TAULÍ

EPIDEMIOLOGIA DE LA INFECCIÓ
PER *Bartonella henselae*

TESI DOCTORAL
Immaculada Pons Viñas
Sabadell 2009

EPIDEMIOLOGIA DE LA INFECCIÓ
PER *Bartonella henselae*

Immaculada Pons Viñas

Memòria presentada per optar al grau de Doctora
per la Universitat Autònoma de Barcelona

Aquesta tesi doctoral ha estat realitzada sota la direcció del
Dr. Ferran Segura Porta a la Corporació Sanitària Parc Taulí.

Tesi doctoral adscrita al departament de Medicina de la
Universitat Autònoma de Barcelona.

Novembre 2009

Dr. Ferran Segura Porta

Immaculada Pons Viñas

Al Jaume, Joaquim i Guillem,
els tres homes de la meva vida.

AGRAÏMENTS

Es difícil descriure i recordar tot el que ha passat aquests últims anys, mentre he fet aquesta tesi, segurament moltíssimes coses, unes importants altres insignificants, la gran majoria bones i per sort meva molt poques de tristes, però sempre he pensat que cal mirar endavant i sobretot buscar ràpidament un altre objectiu per dur a terme. Però abans de tot voldria donar les gràcies a totes aquelles persones que m'heu ajudat a tirar endavant aquest projecte, per això us dedico aquest treball, encara que segur, ja és una mica vostre.

A Ferran Segura, per donar-me l'oportunitat de treballar amb ell i per dirigir-me la tesi. Per la paciència i constància que a vegades ha necessitat, per ensenyar-me a ser perseverant fins aconseguir l'objectiu desitjat i sobretot per endinsar-me dins d'un món desconegut per a la gran majoria de nosaltres.

A Dionísia Fontanals (Xixa) per ensenyar-me tot el que sé de microbiologia, per ser un exemple de feina ben feta i un estímul constant per a mi, gràcies pel teu suport incondicional

A Isabel Sanfeliu per estar a tot arreu i a tot hora, per ser una dona generosa, divertida i treballadora que sempre has estat al meu costat quan t'he necessitat.

A Mariela, una cubana amb un cor d'or que m'ha ensenyat una altra manera de viure la vida. Hem compartit moltes hores de feina i maldecaps, però també viatges, festes i sobre tot bones estones de conversa.

A M. Mercè Nogueras per donar-me un cop de ma en l'estadística, l'anglès, les PCR i sempre que li he demanat, crec que fem un bon tàndem.

A la gent de Microbiologia per fer-me fàcil la meva feina i donar-me suport sempre que ho he necessitat.

A tot l'equip d'Infeccioses, Esperança Antón, Bernat Font, Montse Sala, Manel Cervantes, parlant amb vosaltres dels vostres pacients, penso que tenen sort de tenir-vos com a metge. Gràcies per donar-me un cop de ma sempre que us ho he demanat.

A la Júlia i a tots els professionals de la Clínica veterinària per localitzar-nos quasi diàriament i proporcionar-nos els gats de l'estudi.

Als meus amics, pels moments compartits, perquè sense conèixer res de la meva feina m'heu animat a tirar endavant i fins i tot heu aguantat les meves explicacions amb una resignació digna d'admiració.

A Àngela, vàrem compartir més de vint anys, la feina del dia a dia, sortides, sopars, viatges, l'arribada dels meus fills i la pèrdua de persones estimades, però sobretot molts bons moments que són els que recordo.

A la meva família. als meus pares Ramon i Maria, a la meva germana Mei, a la Judith i el Fernando, per tenir-vos sempre al meu costat, per la vostra ajuda incondicional i sobre tot per fer-me la vida més fàcil i feliç. Us estimo.

A en Joaquim i en Guillem, gràcies per arribar a la nostra vida. Espero que aquest treball no m'hagi robat gaire del vostre temps de jocs, de rialles i de confidències. A partir d'ara prometo compensar-ho.

A en Jaume, per confiar en mi, per donar-me suport en tot el que faig, però sobre tot per tenir-te sempre al meu costat.

SUMARI

SUMARI

SUMARI	1
PREFACI	1
ABREVIATURES	3
1. INTRODUCCIÓ	4
1.1 BIOLOGIA DE <i>BARTONELLA</i> SP.	4
1.1.2 <i>Taxonomia del gènere Bartonella sp.</i>	4
1.1.3 <i>Característiques generals</i>	6
1.1.4 <i>Característiques microbiològiques</i>	6
Examen microscòpic	6
Cultiu microbiològic.....	8
Característiques bioquímiques.....	10
1.2 INFECCIÓ PER <i>BARTONELLA</i> SP. EN ANIMALS	11
1.2.1 <i>Infecció en animals domèstics</i>	11
Gossos	11
Gats	13
1.2.2 <i>Infecció en animals salvatges</i>	16
1.3 INFECCIÓ PER <i>BARTONELLA</i> SP. EN L’HOME.....	16
1.3.1 <i>Manifestacions Clíniques</i>	17
Bartonel·losi o Malaltia de Carrión	17
Malaltia per esgarrapada de gat (MEG).....	18
Angiomatosi bacil·lar (AB) i peliosi hepàtica	21
Febre de les trinxeres.....	22
Endocarditis.....	23
1.3.2 <i>Patogènesi</i>	25
1.3.3. <i>Reservoris i vectors de transmissió</i>	27
1.3.4 <i>Tractament</i>	31
1.3.5 <i>Prevenició i profilaxis</i>	34
1.4 DIAGNÒSTIC MICROBIOLÒGIC	35
1.4.1 <i>Mètodes directes</i>	35
Histopatologia	35
Cultiu bacteriològic	37
Identificació microbiològica.....	39
Mètodes moleculars.....	40
1.4.2 <i>Serologia</i>	43
Tècnica Enzimoimmunoassaig (EIA).....	44
Tècnica Immunofluorescència indirecta (IFI)	45
2. OBJECTIUS	48
2.1. JUSTIFICACIÓ DE LA TESI	48
2.2. OBJECTIUS PLANTEJATS	48
3. ARTICLES	49
IMMACULADA PONS, ISABEL SANFELIU, MARIELA QUESADA, ESPERANZA ANTÓN, MAITE SAMPERE, BERNAT FONT, JÚLIA PLA AND FERRAN SEGURA. PREVALENCE OF <i>BARTONELLA HENSELAE</i> IN CATS IN CATALONIA, SPAIN. AM. J. TROP. MED. HYG. 2005; 72 (4): 453–457.....	49
I. PONS, I. SANFELIU, N. CARDEÑOSA, M.M. NOGUERAS, B. FONT, AND F. SEGURA. SEROLOGIC EVIDENCE OF <i>BARTONELLA HENSELAE</i> INFECTION IN HEALTHY PEOPLE IN CATALONIA, SPAIN. EPIDEMIOL. INFECT. 2008; 136 (12): 1712-6.....	55
I. PONS, I. SANFELIU, MM. NOGUERAS, M. SALA, M. CERVANTES, MJ. AMENGUAL AND F.SEGURA. SEROPREVALENCE OF <i>BARTONELLA</i> SP. INFECTION IN HIV PATIENTS IN CATALONIA, SPAIN. BMC INFECT. DIS. 2008; 8 (58):1-6.....	61
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	68
5. CONCLUSIONS	78
6. REFERÈNCIES	80

7. ANNEXES	97
7.1 ARTICLE ANNEX 1	97
<i>José Ramón Blanco, Isabel Jado, Mercedes Marín, Isabel Sanfeliu, Aránzazu Portillo, Pedro Anda, Immaculada Pons y José Antonio Oteo.</i>	97
<i>Diagnóstico microbiológico de las infecciones por patógenos bacterianos emergentes: Anaplasma, Bartonella, Rickettsia, Tropheryma whippelii. Enferm Infecc Microbiol Clin 2008;26:573-81</i>	97
7.2 ARTICLE ANNEX 2	107
<i>Isabel Sanfeliu, Valentí Pineda, Immaculada Pons, Jacobo Pérez, Bernat Font, Ferran Segura.</i>	107
<i>Description of Bartonella sp. Infections in General Hospital of Catalonia, Spain.</i>	107
<i>CMI 2009. (En prensa).</i>	107

PREFACI

PREFACI

Si examino els avenços en el coneixement de les infeccions anomenades emergents durant els últims 20 anys, probablement, l'estudi de les infeccions per *Bartonella* sp. sigui una de les més importants clínicament.

Encara que les primeres infeccions per *Bartonella* en humans ja eren conegudes per les cultures precolombines d'Amèrica del Sud no va ser fins el 1525 quan es va documentar la primera gran epidèmia. El segle XIX, un estudiant de medicina va establir la relació directa que hi havia entre la Febre d'Oroya i la Berruga Peruana (malalties fins aquell moment diferenciades) i va descriure el que coneixem en l'actualitat com a Malaltia de Carrión. Però no va ser fins el 1909 quan Alberto Barton va poder visualitzar aquest bacteri en els eritròcits dels malalts.

Les primeres descripcions d'infecció per *Bartonella* sp. (Angiomatosi bacil·lar (AB) i Peliosi hepàtica), es varen donar en pacients immunodeprimits. Més tard, s'ha comprovat que la infecció no només depèn de l'estat immunitari del pacient i que cada vegada són més freqüents les infeccions en persones immunocompetents.

La malaltia per esgarrapada de gat (MEG) és la infecció més freqüentment diagnosticada, encara que els últims anys s'han començat a descriure altres patologies com endocarditis, bacterièmies, infeccions oculars (Síndrome de Perinaud), osteomielitis i encefalopaties entre d'altres.

Algunes de les infeccions produïdes per *Bartonella* sp. semblaven estar associades a factors molt específics; *B. quintana* es va relacionar amb conflictes bèl·lics i situacions de pobresa dels països subdesenvolupats mentre que *B. henselae* tenia una relació directa amb el contacte amb gats.

En l'actualitat aquestes infeccions mantenen els mateixos factors de risc, estan relacionades directament amb individus que tenen un contacte directe amb el vector o reservori, veterinaris, personal de granges o persones que conviuen amb animals, però en el cas de *B. quintana* a més de donar-se en situacions de manca d'higiene o brutícia també s'han descrit en llocs on es dona amuntegament de persones com camps de refugiats, centres d'acollida d'immigrants o sense sostre.

L'objectiu principal d'aquesta tesi és fer un retrat, el més acurat possible de la infecció per *Bartonella henselae* en el nostre entorn.

ABREVIATURES

VIH	Virus d'immunodeficiència humana
AB	Angiomatosi bacil·lar
MEG	Malaltia per esgarrapada de gat
ECN	Endocarditis amb cultiu negatiu
IgG	Immunoglobulines tipus G
IgM	Immunoglobulines tipus M
CD4	Limfòcits tipus CD4
IFI	Immunofluorescència indirecta
IFA	Indirect Immunofluorescence Assay
EIA	Assaig Immunoenzimàtic
ADN	Àcid desoxirribonucleic
ARN	Àcid ribonucleic
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
RFLP	Polimorfisme en la longitud dels fragments de restricció
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
HEPES	Àcid N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanesulfònic
RPMI	Medi de cultiu per fer cultius cel·lulars
VERO	Línia cel·lular (cèl·lules epitelials de ronyó de mono verd Africà (<i>Chlorocebus</i>)

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1 Biologia de *Bartonella* sp.

1.1.2 Taxonomia del gènere *Bartonella* sp.

Totes les espècies d'aquest gènere són membres del subgrup $\alpha 2$ de la classe Proteobacteria, que també inclou els gèneres *Rickettsia*, *Ehrlichia* i les diferents espècies de *Afipia* (O'Connor et al, 1991).

Classe Proteobacteria

Ordre *Rhizobiales*

Família *Bartonellaceae*

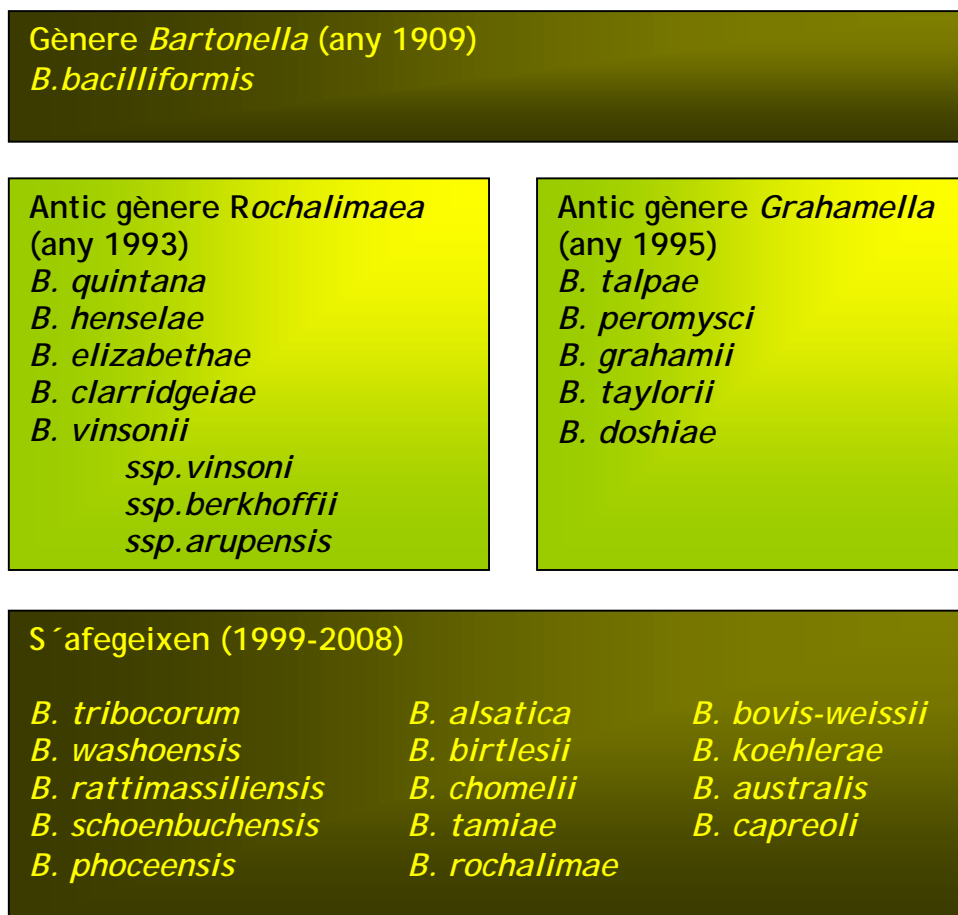
Gènere *Bartonella*

A finals dels anys 80 es varen detectar noves patologies en pacients immunodeficients, principalment pacients amb infecció pel virus de la immunodeficiència humana (VIH). Aquestes patologies es varen associar a organismes que només es detectaven per tinció del material biològic biopsiat, però que eren extremadament difícils d'aïllar en cultiu bacteriològic (Stoler et al, 1983). Amb el posterior aïllament i caracterització del microorganisme utilitzant tècniques moleculars es va poder relacionar directament amb bacteris ja coneguts que pertanyien al gènere *Rochalimaea* (Schmidt et al, 1988).

El 1993 Brenner i col·laboradors, després de fer l'anàlisi filogenètic i seqüenciació de la fracció 16S de l'ARN ribosòmic van situar el gènere *Bartonella* molt més pròxim als gèneres *Brucella* i *Agrobacterium* i per tant va ser separat de l'ordre *Rickettsiales*. També es va proposar la unificació de les diferents espècies del gènere *Rochalimaea* amb el gènere *Bartonella*; a la família *bartonellaceae* que estava formada per *Bartonella bacilliformis* com a única espècie s'hi varen afegir *B. quintana*, *B. vinsonii*,

B. henselae i *B. elizabethae* (Brenner et al,1993). El 1995 Birtles i col·laboradors van proposar la incorporació del gènere *Grahamella*, el resultat va ser l'increment en 5 espècies més: *B. talpae*, *B. peromysci*, *B. grahamii*, *B. taylorii* i *B. doshiae* (Birtles et al, 1995). El 1996 es va descriure *Bartonella clarridgeiae* (Kordick et al, 1997) i el 1998 *Bartonella tricoborum* (Heller et al, 1998). El 1999 es van incorporar *Bartonella koehlerae* (Droz et al, 1999), *B. alsatica* (Heller et al, 1999) i *B. vinsonii* ssp. *aupensis*. Aquests últims anys s'han afegit a la llista, *B. birtlesii* (Bermond et al,2000), *B. shoebuchensis* (Dehio et al, 2001), *B. bovis-weissi* (Breitschwerdt et al, 2001), *B. capreoli*, (Bermond et al, 2002), *B. waschoensis* (Kosoy et al, 2003), *B. chomelii* (Maillard et al, 2004), *B. rattimassiliensis*, *B. phoceensis* (Gundii et al, 2004) i durant aquest últim període de temps s'han descrit *B. australis* (Fournier et al, 2007), *B. tamiae* (Kosoy et al, 2007) i *B. rochalimae* (Eremeeva et al, 2008).

Fig. 1 Esquema de les diferents espècies de *Bartonella* sp. aïllades al llarg dels anys.



1.1.3 Característiques generals

Els microorganismes que pertanyen al gènere *Bartonella* són coneguts com a gèrmens “fastidious” pel seu creixement lent i pels requeriments nutricionals que presenten. Tot això fa que la implantació de tècniques d'aïllament i de identificació en un laboratori de microbiologia sigui molt difícil o, més ben dit, pràcticament inexistent.

El diagnòstic de *Bartonella* es pot dur a terme amb diferents tipus de tècniques. Les més importants són la detecció d'anticossos específics enfront el microorganisme, el cultiu microbiològic, la histopatologia i la detecció molecular del microorganisme. Les mostres més utilitzades habitualment per a l'aïllament de *Bartonella* són la sang i principalment les biòpsies. La seva manipulació i conservació ha d'ésser molt acurada, a fi d'evitar possibles contaminacions externes que afectin al resultat del cultiu microbiològic o a les tècniques diagnòstiques moleculars (PCR). Per a la detecció serològica d'anticossos s'utilitza sèrum. Qualsevol de les mostres descrites s'han de processar de immediat o han de ser congelades a -20°C o -80°C segons sigui necessari el més aviat possible, fins a la realització de la prova.

1.1.4 Característiques microbiològiques

Examen microscòpic

Els microorganismes que pertanyen al gènere *Bartonella*, són petits bacils gramnegatius polimorfes, prims, curts i lleugerament corbats, molt semblants a *Helicobacter* o *Haemophilus* e indistingibles del gènere *Afipia* microscòpicament. La seva longitud oscil·la entre 1-1.2 µm i el seu diàmetre entre 0.5-0.8 µm (Fig. 2-3).

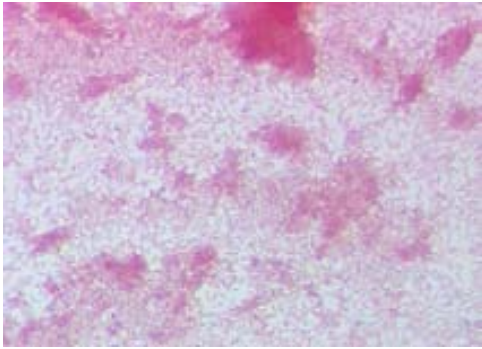


Fig. 2 Tinció de Gram

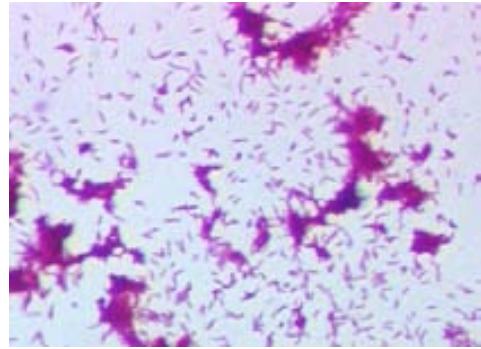


Fig. 3 Tinció de Giménez

La majoria d'espècies són immòbils, però s'ha vist que algunes d'elles, com *B. henselae* (Fig. 4) i *B. quintana* poden produir petits moviments gràcies a unes fines fimbries (*pilli*). (Welch et al, 1995). La possessió de *pilli* podria estar associada amb la adherència a les cèl·lules i tenir un paper específic en la interacció entre els bacteris i les cèl·lules endotelials i els eritròcits. Altres com *B. bacilliformis* (Fig. 5), *B. clarridgeiae*, *B. capreoli* o *B. chomelii* tenen flagels (Lawson et al, 1996; Scherer et al, 1993).

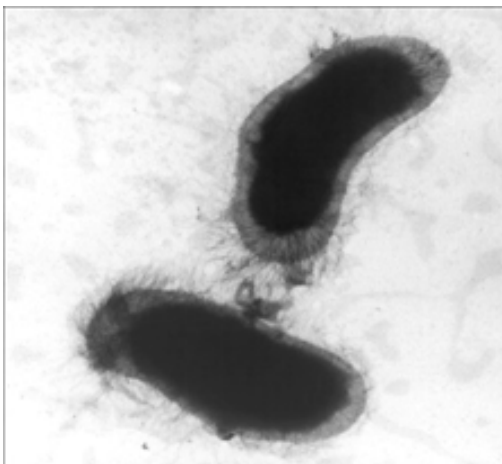


Fig. 4 *Bartonella henselae*
Fotografies de www.portalesmedicos.com



Fig. 5 *Bartonella bacilliformis*

Les tincions per poder visualitzar aquest microorganisme varien depenent del tipus de mostra que analitzem. Si tenim un cultiu bacteriològic positiu que se sospiti pugui ser una *Bartonella* es pot fer una simple tinció de Gram (Violeta de genciana i contrast amb Safranina) o es pot fer una tinció de Giménez (Fucsina fenicada i contratinció amb Verd de Malaquita).

Si es tracta d'un cultiu de sang positiu realitzat en medi líquid es pot fer una tinció de Warthin-Starry o, millor encara, una tinció amb Taronja d'acridina (Larson et al, 1994). Per a les biòpsies, la més utilitzada i la més fàcil de veure és la tinció de Warthin-Starry on es poden observar masses o clusters de bacteris pleomòrfics negrosos

Cultiu microbiològic

L'aïllament de *Bartonella* a partir de mostres humanes és difícil, per això sempre s'ha de tenir en compte que fins i tot un cultiu negatiu després d'un llarg període d'incubació no exclou en absolut la sospita d'infecció per *Bartonella*. Com que el cultiu necessita d'unes condicions especials, el clínic ha de demanar explícitament aquest tipus de cultiu quan té una alta sospita de infecció per *Bartonella* sp.

Existeixen diferents tipus de medis de cultiu microbiològic per al cultiu de *Bartonella*; medis sòlids, líquids o cultius cel·lulars. En tractar-se de microorganismes intracel·lulars necessiten d'un procés previ a la sembra. Per a l'aïllament de *Bartonella* en sang es poden utilitzar tubs que contenen EDTA o bé tubs comercialitzats (Isolator™ blood-lysis tube). Mentre que els tubs de Isolator™ porten saponina per lisar els hematies directament, els tubs amb EDTA, s'hauran de congelar a -80°C per tal que els hematies es trenquin i alliberin els bacteris.

Segons Brenner, si la sembra de la sang en plaques de cultiu es fa abans de les 24 hores sembla que el mètode amb Isolator sigui més sensible, mentre que si les mostres es guarden durant un llarg període (aproximadament uns 30 dies o més) les mostres recollides amb EDTA obtenen millor rendiment (Brenner et al, 1997).

La detecció de *Bartonella* en sang utilitzant aparells automatitzats és inferior i més difícil, probablement degut a la baixa o inexistent producció

de CO₂. Tot i així, s'ha pogut aïllar *B. henselae* de pacients immunodeprimits. En aquest cas, després de 21 dies de incubació a l'aparell automatitzat, es recomana fer un subcultiu en medi sòlid no incubant-lo durant 2 mesos com a mínim (Tierno et al, 1995).

Totes les espècies de *Bartonella* són hemina depenents (Dracourt et al, 1993). Creixen millor en medis d'agar sang enriquits, en una atmosfera humida, amb un 5-10% CO₂ i a 35-37°C, excepte *bacilliformis* que només creix a 28-30 °C (Regnery et al, 1992; Sander et al, 1997).

El tipus de sang utilitzada en el medi de cultiu i el temps que fa que aquest està fabricat, són dos factors que influeixen directament en l'aïllament d'aquest microorganisme. Així, s'observa un creixement més ràpid en els medis recents amb un temps màxim entre la fabricació i la seva utilització de menys de 12 dies. En l'estudi comparatiu fet entre diferents tipus de sang (ovella, cavall i conill), es conclou que els medis amb sang de conill tenen un rendiment d'aïllament millor i per tant és la sang més adient per al cultiu de *Bartonella* (Welch et al, 1993).

El creixement del gènere *Bartonella* (excepte *B. bacilliformis*) és molt lent. Els aïllaments primaris a partir de mostra clínica requereixen al voltant de 21-45 dies (Schmidt et al, 1996). La llarga incubació dels cultius en atmosfera humida augmenta molt el risc de contaminació per fongs i per bacteris de creixement ràpid; aquest problema es resol mitjançant la addició d'antimicòtics com l'amfotericina B al cultiu o el tancament de la placa de cultiu amb parafilmTM després de les primeres 24 hores d'incubació (Welch et al, 1995; Maurin et al, 1997).

Les primeres colònies són de color blanc-grogenc i d'aspecte rugós i tenen una mida petita de 0.3-2.0 mm. Sempre les trobem molt adherides al medi, incrustades a la superfície i difícils d'agafar amb una nansa de sembra. El primer cultiu pot presentar dificultats en el seu creixement, però després

de múltiples resembres o subcultius es poden veure les primeres colònies a partir del tercer dia (Regnery et al, 1992; Sander et al, 1997; Welch et.al,1993). Les colònies de *B. henselae* i *B. quintana* d'un primer aïllament presenten una morfologia molt heterogènia, formes irregulars i rugoses; després, les colònies dels subcultius tenen un aspecte més arrodonit, brillant i estan molt menys adherides al medi (Fig. 6-7).



Fig. 6 Colònies de *B. henselae* en Agar sang



Fig. 7 Cultiu *B. henselae* en subcultiu

Característiques bioquímiques

Identificar les diferents espècies del gènere *Bartonella* al laboratori, resulta francament difícil, ja que fenotípicament i genotípicament són molt similars. Totes les espècies són oxidasa, ureasa i nitrat reductasa negatives. Totes les espècies del gènere *Bartonella* són catalasa negativa menys *B. bacilliformis*.

Bartonella sp. és un bacteri bioquímicament inert, no utilitza els sucres (fructosa, inositol, lactosa, maltosa, manitol, rafinosa, i sucrosa) que es troben a la majoria de kits d'identificació comercialitzats, a més, les bases de dades d'aquests kits són incompletes i no tenen la suficient informació sobre aquest gènere. Tot això fa que els resultats d'identificació d'espècies de *Bartonella* que es puguin obtenir no siguin ni concloents ni fiables. Després de diferents estudis comparatius entre diferents kits comercialitzats RapID ANA II, Rapid ID 32 A System (BioMèrieux) i MicroScan Rapid (Dade Behring), la única conclusió acceptada és que només poden utilitzar per fer una identificació a nivell de gènere (Clarridge et al, 1995).

1.2 Infecció per *Bartonella* sp. en animals

Les infeccions per *Bartonella* sp. en animals són cada vegada més conegudes i estudiades. Tot i que hi ha nombrosos treballs fets tant en animals domèstics (gats i gossos), com en animals de granja (vaques i altres remugants), els estudis que descriuen la epidemiologia d'aquesta infecció en animals salvatges encara són escassos.

1.2.1 Infecció en animals domèstics

Els animals domèstics representen el gran reservori d'infecció per als humans. Els gats i els gossos són, amb diferència, els animals més ben estudiats en l'actualitat.

Gossos

La infecció per *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii* és la més freqüent en gossos, està associada a endocarditis, miocarditis, uveïtis, poliartritis i limfadenitis granulomatosa (Breitschwerdt et al, 2000; Breitschwerdt et al, 2005).

Durant aquest 10 últims anys s'han descrit fins a 6 espècies de *Bartonella* en gossos, associades a manifestacions clíniques variades. *B. clarridgeiae* i *B. washoensis* en casos d'endocarditis (Chomel et al, 2004; Boulouis et al, 2005), i pèrdues de pes i anèmies provocades per *B. elizabethae* (Breitschwerdt et al, 2000; Chomel et al, 2004). *B. henselae* s'ha associat a hepatitis granulomatosa, peliosi hepàtica o epistaxi (Gundi et al, 2004) mentre que *B. quintana* només s'ha descrit en casos d'endocarditis (Kelly et al, 2006).

La infecció per *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii* en gossos és l'única clínicament ben documentada, mentre que la resta d'infeccions descrites es podrien

contemplar com a malaltia en hostes accidentals, sobretot a les regions no tropicals.

La situació epidemiològica varia molt depenent de l'àrea geogràfica que s'estudia; a les zones tropicals s'observa una alta seroprevalença de *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii*: al Senegal tenen una seroprevalença del 26%, al Sudan un 65%, a Tailàndia un 38% (Chomel et al, 2004) i un 38% al Marroc (Henn et al, 2006), mentre que als Estats Units i Europa aquesta no sobrepassa el 5% (Chomel BB et al, 2006).

Existeixen pocs estudis sobre la prevalença de *B. henselae* en gossos, en un estudi fet als Estats Units troben del 10% de gossos sans amb anticossos (Solano-Gallego et al, 2004), al Regne Unit detecten una seroprevalença del 3% (Barnes et al, 2000), al Japó un 7.7% (Tsukahara et al, 1998) mentre que a Zimbabwe aquesta augmenta a un 14% (Kelly et al, 2004). De la resta d'espècies de *Bartonella* se'n té poca informació.

Encara que la prevalença sigui baixa (sobretot a les zones no tropicals), la varietat d'espècies de *Bartonella* detectades és alta; això pot ser un factor determinant per a considerar els gossos uns bons indicadors d'infecció ens els humans.

Existeixen 3 elements que dificulten el diagnòstic d'infecció per *Bartonella* sp. (Breitschwerdt EB et al, 2009).:

- El gran nombre de manifestacions clíniques que poden donar.
- La coinfecció de *Bartonella* sp. amb altres patògens, com *Ehrlichia* sp. o *Babesia* sp.
- La dificultat del cultiu microbiològic de *Bartonella* sp.

Gats

El gat és el principal vector i reservori de *B. henselae* (Koehler et al, 1994; Chomel et al, 1995), encara que aquesta espècie és la més important, també s'han descrit infeccions per *B. clarridgeiae* (Chomel et al, 2004) i *B. koehlerae* (Avidor et al, 2004; Droz et al, 1999).

Els últims anys s'han començat a detectar altres espècies de *Bartonella*, com *B. quintana* determinada per extracció de DNA en les polpes de les dents d'un gat (La et al, 2005) i *B. bovis* (abans *weissi*) aïllada en gats dels Estats Units (Regnar et al, 2000).

La principal manifestació clínica de la infecció per *Bartonella* en aquests animals és la bacterièmia, en la majoria de casos asimptomàtica, de llarga durada e intermitent (des d'algunes setmanes a pocs anys). Altres alteracions menys freqüents són pèrdua de pes i anorèxia, limfadenitis, rinitis granulomatosa, miocarditis i arítmies, uveïtis i lesions oculars o desordres reproductius (Breitschwerdt et al, 2000; Chomel et al, 1995; Arvand et al, 2001; Kordick et al, 1999).

La infecció per *Bartonella* en gats té una àmplia distribució mundial. La incidència de bacterièmies i la seroprevalença entre les diferents zones del planeta varien molt. Aquestes variacions depenen directament de diferents factors; un d'aquests factors es l'edat dels animals; s'ha comprovat que la bacterièmia en gats menors d'un any és més alta que en la població adulta (Chomel et al, 1995). També són importants les condicions de vida (domèstics o salvatges) i la zona climàtica on viuen; es creu que les altes temperatures i la humitat són factors afavoridors de la infecció ja que aquestes condicions intervenen directament en el cicle biològic de les puces augmentant la parasitació (Kordick et al, 1999).

La prevalença de bacterièmia varia depenent on es fa l'estudi i del tipus de mostra de gats que s'escull. La majoria de treballs recollits s'han fet als Estats Units on el seguiment de les infeccions per *B. henselae* és molt més controlat. Kordic et al obtenen una prevalença de bacterièmia del 89% (17/19) en gats infectats que pertanyen a pacients diagnosticats de MEG (Kordick et al, 1999); al nord-est de Califòrnia un 40% (81/205) dels gats testats estaven infectats (Chomel et al, 1995), mentre que a Hawaii un 62% dels cultius de sang de gat varen ser positius (Dermers et al, 1995).

En altres parts de món, els estudis, fins fa poc, eren molt limitats. A França obtenen un 53% d'infecció (Heller et al, 1997) i un 11% a Paris (Chomel et al, 1995), a Alemanya la incidència de bacterièmia és del 13% (Sander et al, 1997), a Itàlia troben un 18% (Fabbi et al, 2004); a Holanda i Dinamarca un 22% i un 22.6% respectivament (Bergmans et al, 1997; Chomel et al, 2002).

Els països nòrdics europeus presenten una incidència de bacterièmia per *B. henselae* més baixa: a Suècia la prevalença és del 3% i a Noruega no en troben (Engvall et al, 2003; Bergh et al, 2002). Per una altra banda, al continent asiàtic troben una alta incidència: Indonèsia té una prevalença del 54%, Tailàndia del 27.6% i Filipines del 61% (Marston et al, 1999; Maruyama et al, 2001; Chomel et al, 1999).

Experimentalment, s'ha comprovat que la infecció per *B. henselae* no només es transmet per esgarrapada o mossegada sinó que també juguen un paper de transmissió molt important les puces (*Ctenocephalides felis*) (Chomel et al, 1996; Zanutto et al, 2000).

Malgrat la majoria de bacterièmies són produïdes per *B. henselae*, també hi ha nombrosos casos descrits a la literatura d'infecció per *B. clarridgeiae* (Zanutto et al, 2000). Hi ha treball on s'ha aïllat *B. clarridgeiae* com a únic responsable de la infecció i altres on s'han descrit coinfeccions de les dues espècies (Chomel, 2000; Gurfield et al, 1997). No hi ha estudis referenciats

de *B. clarriddgeiae* ni a Alemanya ni a Dinamarca, mentre que a França representen el 30% de las bacterièmies en gats.

Taula 1. Prevalença de bacterièmia per *B. henselae* en gats

País	Prevalença
Estats Units (Nord Carolina)	89%
Estat Units (Califòrnia)	40%
Estats Units (Hawaii)	62%
França	53%
França (Paris)	11%
Alemanya	13%
Itàlia	18%
Holanda	22%
Dinamarca	22.6%
Suècia	3%
Noruega	0%
Indonèsia	54%
Tailàndia	27.6%
Filipines	61%

Els estudis de seroprevalença presenten també resultats molt variables, des del 0.97% al 70% (Chomel et al, 1995), fins i tot superiors al 80%, observat en una població felina amb una elevada parasitació per puces. Altres seroprevalències van del 12 al 44% a Baltimore (Childs et al, 1994), del 6 al 22% al Japó (Ueno et al, 1995) o d'un 16% en gats domèstics i d'un 40% en gats salvatges a Austràlia (Branley et al, 1996).

Al nord d' Europa la seroprevalença enfront a *B. henselae* és del 1.5% o pràcticament nul·la, però en canvi es detecta una taxa d'anticossos del 14% davant *B. elizabethae* (Bergh et al, 2002; Hjelm et al, 2002).

1.2.2 Infecció en animals salvatges

La infecció per *Bartonella* sp. en animals salvatges està molt menys estudiada que en els domèstics. El que s'observa és una major diversitat d'espècies de *Bartonella* en aquests animals salvatges, però això no sembla presentar un perill directe per a l'home ja que la majoria d'espècies descrites no produeixen patologia als humans.

Un estudi fet als Estats Units en felins (lleons, tigres i lleopards petits) demostra una seroprevalença enfront *B. henselae* que oscil·la entre el 17% i el 47% (Yamamoto et al, 1998).

S'ha descrit també *B. vinsonii*, *B. birtlesii* i *B. taylorii* en petits rosegadors (Bermond et al, 2000; Boulouis et al, 2004), *B. alsatica* en conills, *B. washoensis* en esquirols, *B. schoenbuchii* en cérvols salvatges i *B. tribocorum* i *B. rochalimae* en rates (Heller et al, 1998; Heller et al, 1999; Dehio et al, 2001; Kosoy et al, 2003; Lin et al, 2008).

També s'han realitzat estudis a ramats de cérvols, vaques i braus on es troben seroprevalències enfront *Bartonella* sp. que oscil·len entre el 42% i el 90%, mentre que no s'ha demostrat cap indicatiu d'infecció en ovelles (Chang et al, 2000).

Cal anar en compte amb espècies de *Bartonella* aïllades en rates o en vaques lleteres que si poden provocar infeccions en humans: *B. elizabethae*, *B. grahamii* i *B. vinsonii* ssp. *arupensis*.

1.3 Infecció per *Bartonella* sp. en l'home

Del total de les espècies trobades en l'actualitat només 10 s'han descrit com a patògens per a l'home. D'aquestes *B. bacilliformis*, *B. quintana* o *B. henselae* són les més conegudes i freqüents.

1.3.1 Manifestacions Clíniques

Bartonel·losi o Malaltia de Carrión

Bartonella bacilliformis és el bacteri responsable de la malaltia de Carrión (descoberta al 1885 per Daniel Carrión). Només es troba al Perú, Equador, Colòmbia i a les valls interandines (entre 500 i 3200 metres d'altitud), on es donen les condicions ecològiques indispensables que permeten que el vector de la malaltia visqui. Aquest vector és la mosca de la sorra (*Lutzomyia verrucarum*). No es coneix cap altre vector animal o vegetal i sembla ser que l'home és l'únic probable reservori (Maguina et al, 2000).

Aquesta malaltia cobra importància en el moment actual degut a la gran accessibilitat als viatges i al flux migratori de la població sud-americana, principalment de la regió andina del Perú.

Els estudis reporten entre un 9-29% de individus asimptomàtics amb bacterièmia per *B. bacilliformis* en àrees endèmiques. La Bartonel·losi afecta principalment a nens i adults joves, un 50% de la població infectada pot ser asimptomàtica i els que desenvolupen la malaltia tenen un període d'incubació d'aproximadament 21 dies (Kosek et al, 2000).

En un estudi fet al Perú l'any 2000 es va trobar una incidència de la malaltia de 12.7/100 persones-any, i es varen descriure com a factors de risc a més de l'exposició a la mosca de la sorra, la convivència amb ratolins, els treballs relacionats amb granges o l'embaràs (Chamberlin et al, 2002).

La malaltia evoluciona en tres fases clíniques:

Fase aguda (Febre d'Oroya) es manifesta amb febre, malestar, pal·lidesa, anorèxia, debilitat i anèmia hemolítica aguda acompanyada de septicèmia. Aquests malalts presenten moltes vegades sobreinfeccions per altres

microorganismes com *Salmonella*, protozoos o altres. El seu curs clínic és greu amb una mortalitat del 40-85% si no es dona tractament. Abans de la mort es presenta un període d'aparent curació, però on sempre es documenta una important bacterièmia. Per una altra banda, la recuperació pot ser total i el pacient pot passar a un estat de portador.

Fase intercalar, usualment asimptomàtica i de duració variable.

Fase crònica (Berruga Peruana) es manifesta uns mesos més tard, apareixen dolors musculoesquelètics, lesions cutànies pseudotumorals, angiomatoses i que sagnen al contacte (principalment a la cara). Poden ser úniques o múltiples i limitar-se a la dermis (formes miliars) o estendre's al teixit subcutani (formes nodulars) (Maguina et al, 2000; Kosek et al, 2000) (Fig. 8).



Fig. 8 lesions cutànies. Fotografia de www.portalesmedicos.com

Malaltia per esgarrapada de gat (MEG)

La malaltia per esgarrapada de gat és la més freqüent, va ser descrita per primera vegada l'any 1950 per Debré (Debré et al, 1950), encara que la primera referència de MEG la va fer Parinaud l'any 1889 quan va tractar un malalt amb conjuntivitis i adenopaties regionals que manifestava haver tingut contacte amb gats (Parinaud et al, 1889).

És una infecció de distribució mundial, que té una incidència estable, sense brots epidèmics. L'incidència pot variar d'uns llocs a altres. Així, un estudi fet als Estats Units els anys 90 estimava que hi podria haver entre 22000 i

24000 persones infectades a l'any (incidència de 3.7 casos/100.000 hab.) dels quals uns 2000 podrien requerir hospitalització (Jackson et al, 1993). A altres zones com el País Basc, Holanda o França, tenen entre uns 2000 i 5000 casos l'any (Boulouis et al, 2004).

Aquesta malaltia es caracteritza per l'aparició d'adenopaties regionals després d'una esgarrapada o mossegada de gat. La resposta patològica a la infecció per *B. henselae* varia depenent de l'estat immunològic del pacient. Pot afectar a persones de qualsevol edat, però més del 80% dels casos es donen en pacients menors de 21 anys (Jackson et al, 1993).

El 60-90% dels pacients a l'inici de la infecció presenten una pàpula o pústula a la zona d'inoculació i posteriorment (entre 1-3 setmanes) apareix afecció ganglionar a l'àrea de drenatge del lloc d'inoculació (Fig. 9).



Fig. 9 Afectació del palmell de la ma. (www.portalesmedicos.com)

L'adenopatia que sol ser axil·lar, cervical o inguinal augmenta de mida fins a tenir alguns centímetres i pot produir dolor.

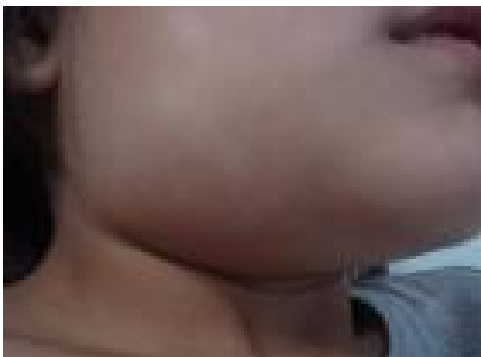


Fig. 10 Adenopaties submaxilars

En la majoria dels casos la infecció no requereix de tractament antibiòtic i desapareix sense més complicacions (Bogue et al, 1989; Margileth et al, 1992). Un 10-15% del pacients poden presentar abscessos ganglionars i un 5-25% manifestacions atípiques (Fig. 10).

La Síndrome de Parinaud pot afectar al 6% dels pacients amb MEG i presenta una conjuntivitis unilateral, amb una àrea de reacció local granulomatosa i la presència d'una adenopatia preauricular o submandibular. També s'han descrit conjuntivitis, neurorrenitis, neuritis òptica i despreniment de retina; en general aquestes lesions acostumen a coincidir amb les manifestacions sistèmiques. Alguns pacients en edat pediàtrica poden presentar, associada a la malaltia per esgarrapada de gat, encefalopatia però la seva recuperació és completa en la majoria dels casos (Margileth, 1993).

Encara que *B. henselae* és l'espècie més directament associada a aquesta patologia, en els últims anys s'han descrit casos de infecció per *B. quintana* (Azevedo et al, 2000) i *B. clarridgeiae* com a responsable directa d'una petita part de les infeccions per esgarrapada de gat, degut principalment a l'alta incidència de *B. clarridgeiae* en gats tant en infecció única com en coinfecció amb *B. henselae* (Kordick et al, 1997; Lawson et al, 1996).

La seroprevalença de *B. henselae* varia del 2.6% de Hawaii, 3% de Suècia o 5.5% de Tailàndia a valors molt més alts, d'un 19.8% a Grècia o un 30% a Alemanya (Dermers et al, 1995; McGill et al, 2005; Maruyama et al, 2000; Alexiou-Daniel et al, 2000; Sander et al, 1998). Aquests valors de seroprevalença augmenten quan es tracta de grups de risc, pacients amb diagnòstic de MEG, persones que tenen contacte amb gats, professionals dedicats a treballar amb animals o altres com addictes a drogues o persones sense sostre. En aquests grups de risc les prevalències que trobem van des d'un 6.3% a Itàlia o un 16.3% a Anglaterra en pacients amb sospita de MEG (Del Prete et al, 1999; Harrison et al, 1999) fins el 41% de seroprevalença trobada en pacients portadors del VIH de Grècia o un 60% en pacients drogodependents eslaus (Pape et al, 2005; Zupan et al, 2003).

Al nostre país hi ha pocs estudis de seroprevalença, però els valors que s'observen són molt similars a la resta del món, així a la Rioja tenen una seroprevalença del 5.88% i d'un 24.7% a Sevilla (població sana). Un estudi fet amb pacients portadors del VIH la seroprevalença augmentava, sent del 13% al 17.4%. (Blanco et al, 1999; García-García et al, 2005; Ramos et al, 2002).

Angiomatosi bacil·lar (AB) i peliosi hepàtica

L'angiomatosi bacil·lar presenta tres manifestacions clíniques; la més comú és l'aparició de pàpules o nòduls d'aspecte vermellós o púrpura, que es poden confondre amb el Sarcoma de Kaposi; en aquest cas es necessita de tincions específiques per tal de fer la diferenciació clínica. Els nòduls subcutanis són la segona manifestació més comú, solen ser grans i fàcilment palpables, aquestes lesions són similars a les produïdes per *Cryptococcus neoformans* i de vegades poden travessar la dermis i produir úlceres. Per últim, podem observar plaques cel·lulítiques, que encara que siguin manifestacions cutànies, tenen darrere seu una infecció a nivell d'os. En tots els casos, per tinció de la mostra s'observa una proliferació vascular i la presència de bacils. Amb freqüència existeix una adenopatia regional a la zona del drenatge i una proliferació vascular generalment a nivell cutani, que pot disseminar-se a altres òrgans com la melsa, fetge, budell, ronyó, pulmó o cervell (Koehler et al, 1992)

El 1983 es va descriure la primera infecció per *Bartonella* en un pacient immunodeprimit amb lesions subcutànies, febre, sudoracions nocturnes i pèrdua de pes (Stoler et al, 1983). El 1987 es va observar l'estreta relació clínica que hi havia entre AB, la berruga peruana i el sarcoma de Kaposi, però amb la diferència que en les lesions de angiomatosi bacil·lar, s'observaven nombrosos bacils i la seva resposta als antibiòtics era més ràpida.

El 1990 es va seqüenciar per primera vegada un bacteri molt pròxim a *B. quintana* i al cap de poc temps es va aïllar *B. henselae* i *B. quintana* en un cultiu de lesions cutànies (Lawson et al, 1996).

Afecta principalment a immunodeprimits (pacients portadors del VIH i habitualment amb CD4 <100 i també en trasplantats) i s'associa a la presència de gats en el domicili.

Inicialment només es coneixia la peliosi hepàtica en pacients amb tuberculosi, càncer o en tractament amb esteroides anabolitzants. Actualment es parla de peliosi hepàtica davant d'un quadre d'angiomatosi bacil·lar que afecta a òrgans sòlids, principalment el fetge, però també d'altres com la melsa, ganglis limfàtics i el moll d'os. Es tracta de lesions parenquimatoses que presenten una proliferació vascular amb dilatacions capil·lars que porten a la formació de llacs vasculars. Poden manifestar-se de forma aïllada o juntament amb AB o bacterièmia. Clínicament es manifesta amb nàusees, vòmits, diarrea, dolor abdominal, febre, calfreds i hepatomegàlia i pot afegir-s'hi pancitopènia, trombocitopènia i elevació d'enzims hepàtics.

Els agents causals més freqüents són *B. henselae* i *B. quintana*, confirmant-se la seva presència amb la tinció de plata de Warthin-Starry i observant en les mostres biopsiades masses de bacils en el material granular o per tècniques de PCR.

Febre de les trinxeres

Anomenada també Febre de Volínia o Febre dels 5 dies. És una de les plagues sofertes durant dècades, però no va ser fins la primera guerra mundial quan es va reconèixer que hi havia hagut fins a un milió d'infectats.

B. quintana és l'agent patògen responsable de la infecció que té com a únic vector de transmissió el poll (*Pediculus humanus corporis*, Fig. 11) i com a hoste l'home. L'home s'infecta quan les femtes del poll es posen en contacte amb la pell erosionada (Maurin et al, 1996).



Fig. 11 Vector responsable de la febre de les trincheres

Aquesta infecció va lligada a situacions de manca d'higiene o brutícia; en l'actualitat pot donar-se en col·lectius que visquin en condicions higièniques poc favorables o d'amuntegament important com camps de refugiats, gent sense sostre (Bass et al, 1997).

És una septicèmia que presenta de 12 a 25 dies d'incubació. Les manifestacions clíniques són molt variables i poden anar des d'una infecció asimptomàtica fins a una sepsi greu. Comença amb febre (38.5-40°C), mal de cap i dolor als ossos pretibials que poden ser molt intensos. La febre es dona normalment cada 5 dies (pot tenir un interval de 4 a 8 dies). Aquestes crisis es repeteixen durant 4 o 6 setmanes, però cada vegada són pitjors. Cal dir que la sepsi per *B. quintana* té una mortalitat molt baixa.

Endocarditis

Les endocarditis amb cultiu negatiu (ECN) suposen entre el 2.5 i el 31% de totes les endocarditis (Bouza et al, 2001). Un resultat negatiu de l'hemocultiu podria ser degut a una administració d'antibiòtics prèvia a l'extracció però també a la presència de bacteris de creixement lent o amb requeriments nutricionals específics difícils d'aïllar en medis convencionals. Un d'aquests bacteris pot ser *Bartonella* sp.

En aquest moments sabem que provoquen entre l'1 i el 17% de tots els casos d'endocarditis amb ECN. El primer cas d'endocarditis per *B. quintana* es va descriure en un pacient infectat pel VIH al 1993 (Spach et al, 1993). El 1995 Raoult diagnostica varies endocarditis en persones sense sostre (VIH negatiu). En totes es va poder determinar *B. quintana* al teixit valvular utilitzant tècniques immunohistoquímiques, tots els malalts presentaven anticossos específics enfront *B. quintana* i el diagnòstic etiològic es va confirmar per l'aïllament del bacteri en hemocultius i per l'evidència del germen en teixit valvular utilitzant tècniques immunohistoquímiques o per PCR.

B. quintana és l'espècie més freqüents (80% de les endocarditis) (Fournier et al, 2001; Maurin et al, 1997) però actualment s'han reconegut fins a sis espècies més com a responsables d'endocarditis; *B. henselae*, *B. elizabethae*, *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii*, *B. vinsonii* ssp. *arupensis*, *B. kohlerae* i per últim *B. alsatica* (Avidor et al, 2004; Daly et al, 1993; Roux et al, 2000; Fenollar et al, 2005; Raoult et al, 2006; Blanco et al, 2005).

Des del punt de vista epidemiològic podem dir que les endocarditis per *B. quintana* es dona en pacients que pertanyen a grups socials més desfavorits, sense sostre, drogodependents, camps de refugiats on podem trobar amb més freqüència el vector de transmissió, el polls, mentre que les endocarditis per *B. henselae* comporten contacte amb gats o picades de puces.

Els pacients amb endocarditis per *B. quintana* no solen presentar història de cardiopatia prèvia, al contrari del que s'observa en *B. henselae* (Raoult et al; 1996). En les endocarditis per *Bartonella* sol haver-hi afectació de vàlvula aòrtica i menys freqüentment vàlvula mitral o totes dues. L'evolució de la majoria dels pacients passa per un recanvi valvular i la

mortalitat de l'infecció pot arribar a ser d'un 10%, probablement degut al retard en el diagnòstic (Fournier et al, 2001).

Degut a les reaccions creuades observades entre *Chlamydomphila pneumoniae* i *B. henselae* o *B. quintana*, se suposa que algunes de les endocarditis diagnosticades inicialment per aquest microorganisme són en realitat infeccions provocades pel gènere *Bartonella* (Maurin et al, 1995).

1.3.2 Patogènesi

Bartonella presenta creixement intracel·lular; s'ha demostrat la seva adhesió i capacitat d'invasió en cultius de cèl·lules Vero, en cèl·lules epitelials humanes i en eritròcits de gat. La presència de *pilli* tipus IV, pot suposar un factor determinant per poder enganxar-se a la cèl·lula a més d'un factor de virulència (Batterman et al, 1995); també sembla tenir un paper important en l'adherència que té la colònia de *Bartonella* sp. sobre el medi de cultiu sòlid, quan es tracta de creixements primaris de mostres clíniques.

Aquest bacteri infecta els hematies i pot envair les cèl·lules endotelials, cèl·lules progenitores CD34+ i cèl·lules dendrítiques dels diferents hostes (Dehio, 2004).

Pel que fa a la resposta immunitària humana, *B. henselae* interactua amb el sistema immune, activant el sistema del complement, induint l'expressió d'antígens específics de la superfície del macròfags, enganxant-se als limfòcits i reduint la funció oxidant dels leucòcits polimorfonuclears (Rodríguez-Barradas et al, 1995).

Les lesions produïdes per *B. henselae* depenen molt de l'estat immunitari de l'hoste. En hostes immunocompetents indueixen hiperplàsia de nòduls limfàtics, donant lloc a granulomes, però la característica més notable

d'aquest bacteri patogen és la seva capacitat per induir la formació de tumors de proliferació vascular en immunodeprimits (Koehler et al. 1992).

En humans, la neovascularització que comença en els vasos sanguinis petits és la responsable de les lesions en la AB i la peliosi hepàtica. Aquest fenomen de angiogènesi també s'ha descrit amb *B. quintana* i *B. bacilliformis*. Encara que les lesions provocades pel bacteri poden ser importants, s'obté una bona regressió de la infecció i de les lesions quan s'administra una pauta d'antibiòtics adequada (LeBoit et al, 1989). Això pot suggerir que el gènere *Bartonella* específicament envaeix i colonitza l'endoteli vascular i produeix alteracions o lesions localitzades i temporals.

En els últims estudis realitzats *in vitro* s'han utilitzat cèl·lules endotelials embrionàries. Durant les primeres tres hores els bacteris s'adhereixen i penetren quedant a l'espai perinuclear, després lentament es van formant agregats de bacteris. En aquest punt comença la angiogènesi que és un procés complex ja que comporta la migració i proliferació endotelial de les cèl·lules i la reorganització de nous capil·lars.

Un altre punt important és la capacitat d'inhibir l'apoptosi de les cèl·lules infectades (algunes espècies com *B. vinsonii* o *B. elizabethae* no la presenten), encara que per si sola no sembla suficient per incrementar la proliferació de les cèl·lules, una major supervivència cel·lular sens dubte és important (Dehio et al, 2004). Així doncs, en els últims anys els diferents estudis genètics sobre el gènere *Bartonella*, la utilització de cultius cel·lulars i els models animals, han ajudat a desxifrar diferents factors relacionats directament amb la patogènesi d'aquesta malaltia.

Taula 2 - Factors de patogenicitat de *Bartonella* spp

Factors	Funció
Factor angiogènic	Estimula proliferació endotelial
Flagel	Mobilitat i invasió dels eritròcits
Hemolisina	Lisi d'hematies
Hbp/Pap 31	Hemina vinculant a les proteïnes
<i>Pilli</i> tipus IV	Adhesió cel·lular

1.3.3. Reservoris i vectors de transmissió

Actualment es diferencia entre dos tipus de vectors; els reconeguts com a transmissors, en els quals s'ha trobat *Bartonella* (aïllament en cultiu o detecció de DNA per PCR) i vectors potencialment sospitosos de transmetre la infecció que actualment estan en estudi.

Les diferents espècies de *Bartonella* spp. presenten una gran diversitat de reservoris i de vectors que influeix directament en la distribució mundial de la infecció. Hi ha espècies de *Bartonella* que tenen un nombre de reservoris i vectors més ampli com *B. henselae* o altres espècies de *Bartonella* que s'han trobat en diferents animals, mentre que altres com *B. quintana* o *B. bacilliformis* semblen presentar un únic reservori (home) o vector.

Tenim una única infecció localitzada a una zona geogràfica determinada, com la Malaltia de Carrion que té com a únic vector *L. verrucarum* (mosca de la sorra) com a vector de *B. bacilliformis* mentre que la resta d'espècies les podem considerar molt més cosmopolites (Fig. 12).



Fig. 12 *Lutzomyia* spp responsable de la transmissió de *B. bacilliformis*

Tot i així, des de finals dels 90 s'observen algunes discrepàncies entre la distribució d'alguns casos de malaltia de Carrión i la de *L. verrucarum*, que poden suggerir l'existència d'altres vectors secundaris responsables de la transmissió de *bacilliformis* en àrees on *L. verrucarum* no és present. Un possible vector podria ser *L. peruensis*, relacionat en un episodi d'infecció per *B. bacilliformis* a Cuzco (Chomel et al, 2009).



Fig 13. Gats reservori i vector de *B. henselae* i *B. clarridgeiae*

Queda clar doncs, que les infeccions per *Bartonella* presenten reservoris molt propers a nosaltres, animals domèstics (Fig. 13) o de granja i que la majoria d'elles utilitzen com a vector de transmissió els artròpodes (Fig. 14) (Chomel et al, 1995).



Fig. 14 *Pedicoccus humanus* vector de *B. quintana*

Malgrat tot els estudis són cada vegada més nombrosos, fins el moment, només 3 espècies són conegudes per infectar i replicar-se en el tracte digestiu dels seus respectius vectors: *quintana* en els polls humans, *B. henselae* en les puces de gat i més recentment *B. shoenbuchensis* a *Lipoptena cervi* (artròpode xuclador de sang) (Chomel, 2009)

Cal tenir en compte que els gats juguen un doble paper, tant de reservori de la infecció com de vector; per tant, la transmissió de la infecció es pot produir per contacte entre gats, esgarrapades o mossegades i també per mitjà de les picades de puces (*C. felis*) que passen d'un animal a un altre.

En un estudi fet a Alemanya i França, un 3.7% de les puces estudiades eren positives per *Bartonella* sp. La diferència entre els 2 països és que a França predomina la detecció de *B. clarridgeiae* i a Alemanya és més abundant *B. henselae* (Just et al, 2008).

Si es té en compte que el vector de transmissió és un dels factors principals en la infecció per *B. henselae* hem de pensar que totes les condicions ambientals que afavoreixen aquests vectors, indirectament també afavoreixen la malaltia. Alguns estudis han corroborat que el factor climàtic està directament relacionat amb la prevalença de la infecció. Les altes temperatures i l'augment de la humitat afavoreixen la infecció perquè incrementen la supervivència i reproducció dels artròpodes com les puces (Chomel et al, 2005; Chomel et al, 2006).

En aquest moment es parla de l'existència de nous vectors ja que s'ha detectat DNA de *B. henselae* en paparres del gènere *Ixodes ricinus* trobades en humans i en *I. scapularis* recollides d' albergs (Sanogo et al, 2003; Hercík K et al 2007).

A Califòrnia també s'ha detectat DNA de *B. quintana*, *B. henselae* i *B. vinsonii ssp. berkhofii* en paparres del gènere *I. pacificus* i s'han descrit ja algunes infeccions per *B. henselae* on els pacients descriuen un possible contacte temporal amb paparres.

Encara que per conèixer el paper concret i específic de les paparres en la transmissió de *Bartonella*, s'hauran de fer estudis addicionals més complets (Billeter et al, 2008.), es pot considerar l'exposició directa a paparres com un factor de risc associat a la malaltia per esgarrapada de gat en humans (Sanogo et al, 2003).

Taula 3. Epidemiologia de les diferents espècies de *Bartonella* sp.

<i>Bartonella</i> sp.	Reservoiris	Vectors	Hoste accidental
<i>B. bacilliformis</i>	Humans	<i>L.verrucarum</i> ¹	Cap
<i>B. quintana</i>	Humans	<i>P.humanis</i> ²	Gat, Gos, primats
<i>B. talpae</i>	Talps		
<i>B. peromysci</i>	Ratolins		
<i>B. henselae</i>	Gats	<i>C.felis</i> ³	Humans, Gos
<i>B. clarridgeiae</i>	Gats	<i>C.felis</i>	Humans, Gos
<i>B.koehlerae</i>	Gats	<i>C.felis</i>	Humans
<i>B. vinsonii</i> ssp. <i>vinsonii</i>	Ratolins	<i>T.microti</i> ⁴	
<i>B. vinsonii</i> ssp. <i>berkhoffii</i>	Gos, Guineus	Puces, Paparres?	Humans
<i>B. vinsonii</i> ssp. <i>aupensis</i>	Ratolins salvatges	Puces, Paparres?	Humans
<i>B. elizabethae</i>	Rates	<i>X.cheopis</i> ⁵	Humans, Gos
<i>B. grahamii</i>	Rates salvatges	<i>C.nobilis</i> ⁶	Humans
<i>B. taylori</i>	Rates, Ratolins	<i>C.nobilis</i>	
<i>B. doshiae</i>	Ratolins	Puces?	
<i>B. tribocorum</i>	Rates		
<i>B. alsatica</i>	Conills	Puces?	Humans
<i>B. bovis-weisii</i>	Vaques, Bous		
<i>B. birtlesii</i>	Rates		
<i>B. washoensis</i>	Esquirols	Puces?	Humans, Gos
<i>B. shoebuchensis</i>	Cérvols	<i>L.cervi</i> ⁷	
<i>B. capreoli</i>	Vaques, Bous		
<i>B. chomelii</i>	Vaques		
<i>B. tamiae</i>			Humans
<i>B. rochalimae</i>	Rates		Humans

1. *Lutzomia verrucarum*, 2 *Pediculus humanus*, 3. *Ctenocephalides felis*, 4. *Trombicula microti*, 5. *Xenopsylla cheopis*, 6. *Ctenophthalmus nobilis*, 7. *Lipoptena cervi*

1.3.4 Tractament

Existeixen molt poques dades sobre la sensibilitat *in vitro* de *Bartonella* degut principalment als pocs aïllaments que hi ha fins la dècada dels 90. Els primers estudis de sensibilitat es van fer utilitzant Agar Columbia amb sang de cavall e incubant les soques a 37°C durant 5 dies (Maurin et al, 1995) i el mateix any es va fer un estudi sobre l'activitat bactericida dels antibiòtics enfront *B. henselae* en cultius de cèl·lules endotelials (Musso et al, 1995). El 1996 es van fer els primers estudis utilitzant E-test™ (tires impregnades d'antibiòtic) sobre plaques d'Agar Xocolata (Wolfson et al, 1996).

Els resultats dels estudis confirmen que les espècies de *B. henselae* són altament sensibles a alguns β-lactàmics, macròlids, tetraciclins, rifampicina, cloramfenicol, cotrimoxazol i aminoglucòsids (gentamicina, tobramicina i amikacina) en tot tipus de medi testat però sempre cal tenir en compte que es tracta de sensibilitat *in vitro*. Les espècies de *Bartonella* són menys sensibles a cefalosporines de primera generació, clindamicina i són resistents a vancomicina.

Normalment la infecció per esgarrapada de gat no es tracta amb antibiòtics, ja que és una infecció autolimitada, que sol curar sense cap mena de complicació. A vegades es poden donar analgèsics per minimitzar el dolor i es fa un seguiment dels símptomes clínics del pacient (Margileth et al, 1992).

En l'actualitat, si el malalt presenta adenopaties voluminoses es poden tractar amb azitromicina i si l'adenopatia es pot drenar quirúrgicament, els pacients solen presentar una disminució clara del dolor a les 24-48 hores següents. Quan les formes de la malaltia són més greus es dona una associació de doxiciclina amb rifampicina (Chia et al, 1998).

L'angiomasosi bacil·lar, bacterièmia o peliosi hepàtica es tracta amb eritromicina o doxiciclina, però hem de tenir en compte que les infeccions disseminades (peliosi hepàtica i bacterièmia) necessiten de tractament parenteral (Koehler et al, 1993; Regnery et al 1995).

En les endocarditis s'associa gentamicina i azitromicina o doxiciclina i en el cas de febre de les trinxeres i bacterièmia, els fàrmacs recomanats son doxiciclina o azitromicina (Daly et al, 1993).

La Febre d'Oroya es tracta amb cloramfenicol o ciprofloxacina i la berruga peruana amb rifampicina o macròlids (Piémont et al,1999). Encara que les pautes antibiòtiques poden ser variades sempre s'han de aplicar les dosis d'antibiòtic i temps de tractament adequats per tal d'obtenir la curació de la infecció de forma ràpida i efectiva (Taula 4) (Rolain et al, 2004).

Per poder controlar les infeccions per *Bartonella*, és tan important un bon tractament antibiòtic com intentar evitar el seu contagi.

Taula 4. Pautes antibiòtiques en les infeccions per *Bartonella*.

Malaltia	Adults	Nens
Malaltia per esgarrapada de gat amb adenopaties grans	Azitromicina (500mg-1er d+250mg-4d)	Azitromicina (10mg 1 d i 5mg/kg de 2 a 5 d)
Retinitis	Doxiciclina (100mg/d) + Rifampicina (300mg/d 4 o 6 set)	
AB, Bacteriemies, Peliosi hepàtica	Eritromicina (500mg/6h) o Doxiciclina (100mg/d de 6-8set. Fins 4 m)	Eritromicina (40mg/kg/d durant 2 m)
Endocarditis	Gentamicina (3mg/kg/d 14 d)+ Ceftriaxona (2g i.m/i.v 6 set) o Doxiciclina (100mg/12h 4 set)+ Gentamicina o Rifampicina (300mg/12h 14d)	
Febre trinxeres	Doxiciclina (100mg/12h 4 set)+ Gentamicina (3mg/kg 2 set)	
Febre d'Oroya	Cloramfenicol (500mg v.o/i.v 14 d) + un Beta-lactàmic o Ciprofloxacina (500mg/12h 14 d)	Cloramfenicol (50-75 mg/v.o/i.v 14d)+ un Beta-lactàmic
Berruga peruana	Rifampicina (10mg/kg/d 14d) o Estreptomicona (15-20mg/kg 10 d)	Rifampicina (10mg/kg 14 d)

d. dia; set. Setmana; m. Mes; h. hora

1.3.5 Prevenció i profilaxis

És molt difícil parlar de prevenció si tenim en compte que en el països industrialitzats des dels anys 80 s'ha incrementat molt el nombre de persones que tenen animals de companyia (gats i gossos). S'estima que hi ha al voltant de 60 milions de gats domèstics que viuen en un terç de les llars americanes, uns 8.4 milions de gats a França, dels qual aproximadament 1.5 milions podrien ser bacterièmics i 2 milions a Holanda dels que aproximadament un 22% amb infecció activa per *Bartonella* (Chomel et al, 2000).

Cal informar a la població sobre aquestes malalties i els mecanismes de transmissió, però mai generalitzar fent una publicitat negativa dels animals de companyia. Aquestes mascotes tenen la majoria de vegades un paper reconfortant per a molts pacients crònics o terminals.

Per tal de minimitzar el contagi d'aquestes malalties, és important fer una bona selecció de l'animal de companyia, cosa gairebé impossible de portar a la pràctica. En general es volen animals de poca edat per tal d'afavorir la integració a la llar, i justament s'ha descrit que les persones que conviuen amb gats petits tenen quinze vegades més risc de infectar-se (Zangwill et al, 1993). El més convenient per evitar el risc de contagi seria adquirir un animal domèstic adult procedent d'un lloc amb garanties de higiene adequades i on els animals no presentin infestació per puces (Foil et al, 1998). De totes maneres fins i tot així seria difícil evitar el contagi ja que un 2% dels gats que són seronegatius enfront *Bartonella* poden ser bacterièmics (Chomel et al, 1995; Dermers et al, 1995).

La prevenció depèn directament de l'eliminació de vectors transmissors de la infecció (puces de gat, polls i en menys importància les paparres). Si això no es pot aconseguir del tot, la acció més efectiva que tenim al nostre abast és la utilització de mesures higièniques que tots coneixem i que són

el rentat de mans després de tocar els animals i una bona desinfecció amb aigua i sabó en el cas de talls, mossegades o esgarrapades.

Un altre factor important que podria influir directament en la disminució de la infecció per *Bartonella* seria la possibilitat de disminuir la prevalença de infecció en els animals domèstics (gats i gossos) ja que són els hostes principals, utilitzant vacunes. Aquesta opció s'està estudiant però sembla difícil d'aconseguir una vacuna efectiva sobretot per la varietat d'espècies que poden afectar aquests animals (Chomel , 2000).

1.4 Diagnòstic microbiològic

Existeixen 2 tipus de procediments al laboratori per tal de fer el diagnòstic de infecció per *Bartonella* sp. Demostrar directament la presència del microorganisme o el seu antígen utilitzant la histologia, el cultiu bacteriològic o la PCR i la determinació serològica d'anticossos enfront *Bartonella* per tècniques d'immunoassaig (Blanco et al,2008 annex 1).

1.4.1 Mètodes directes

Histopatologia

La biòpsia i el seu examen histològic és un dels mètodes més ràpids i rentable actualment. La tinció amb hematoxilina i eosina, la tinció amb taronja d'acridina i principalment la tinció de Warthin-Starry són les més utilitzades en els departaments d'anatomia patològica. Les mostres més freqüents per al diagnòstic directe són les biòpsies de ganglis, la pell, les vàlvules i en menys casos es pot fer servir la sang. Les mostres s'han de recollir de manera asèptica per personal qualificat i s'han d'enviar ràpidament al laboratori per a la seva posterior manipulació. Les biòpsies es conserven en formaldehid i es poden conservar a temperatura ambient fins la seva arribada al laboratori, després són parafinades en blocs i tallades en làmines de 0.4-0.5 mm de gruix per fer les tincions necessàries.

La tinció d'impregnació argèntica de Warthin-Starry és la més específica en casos de sospita de bartonel·losi. En l'examen histològic es pot observar la proliferació vascular de petits vasos amb grans cèl·lules endotelials (epiteloides) que es posen dins dels capil·lars recent formats arribant fins i tot a obstruir la llum. Aquests poden estar rodejats per un infiltrat inflamatori format per polimorfonuclears, alguns limfòcits i hi pot haver zones focals de necrosi, així com grumolls de material granular que són cúmuls de bacteris pleomòrfics tenyits de fosc quasi negres, que es disposen habitualment pròxims a la llum dels vasos.

En el cas específic de la malaltia per esgarrapada de gat, en la lesió d'inoculació hi ha una àrea de necrosi rodejada de capes concèntriques d'histiòcits, limfòcits i polimorfonuclears; els ganglis limfàtics es caracteritzen per granulomes necrotitzants rodejats per infiltrats limfocítics i polimorfonuclears. En el cas de l'angiomatosi bacil·lar hi ha una lesió per proliferació vascular però sense granuloma (Fig. 15)

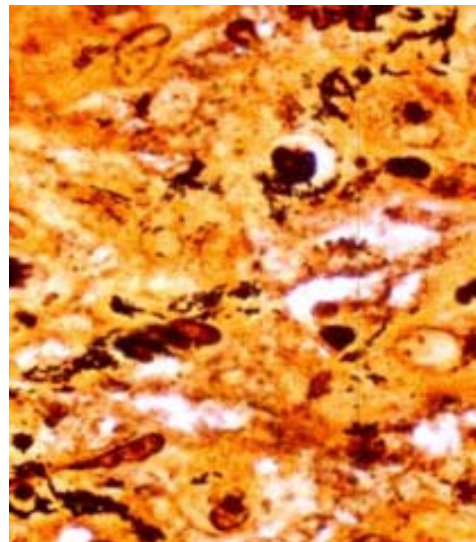


Fig.15 Secció d'una biòpsia tenyida amb la tinció de Warthin-Starry

En la peliosi hepàtica s'observa una proliferació important de capil·lars sinusoides, formació de grans llacs vasculars en un estroma mixoide i amb cèl·lules inflamatòries. També poden observar-se bacteris a l'estroma. De manera excepcional es poden observar granulomes necrotitzants.

Si en lloc de biòpsia, es disposa d'un cultiu de sang positiu, la tinció necessita d'un procés previ de concentració i lisi de la sang. Encara que podríem utilitzar la tinció de Warthin-Starry, es més fàcil de realitzar la tinció amb taronja d'acridina 0.01%(w/v). Posem unes gotes de la mostra

de sang lisada en un portaobjectes, la fixem i tenyim; amb el microscopi de fluorescència si la mostra és positiva s'observa la presència de bacils petits i pleomòrfics de color taronja (Larson et al, 1994).

Cultiu bacteriològic

La majoria de mostres per cultiu de *Bartonella* són biòpsies de ganglis, vàlvules o pell, en aquests casos és recomanable triturar o picar la mostra en un morter sempre de manera estèril abans de fer la sembra en les plaques de cultiu, per tal d'evitar possibles contaminacions. En el cas que la mostra fos sang, el que s'ha d'afavorir és l'alliberació o sortida dels bacteris dels hematies. Això s'aconsegueix, per un procés de congelació a -80°C i posterior descongelació del tub d'EDTA o utilitzant tubs comercialitzats que provoquen la lisis cel·lular dels hematies (Isolator™ blood-lysis tube).

Els primers medis de cultiu utilitzats van ser medis sòlids formulats amb una base d'agar i nutrients i amb un suplement de sang. A partir d'aquí s'han fet proves per tal de millorar el rendiment del medis utilitzant diferents tipus de sang (ovella, cavall, conill). D'aquesta manera s'ha evidenciat que la sang de conill és la que dona una millor recuperació de *Bartonella* sp.

Un altre aspecte que s'ha valorat és el temps transcorregut entre la fabricació del medi i la seva utilització, detectant que com més fresc és el medi de cultiu més bons resultats de creixement s'obtenen (Chomel et al, 1995). Aquests 2 factors es poden controlar fàcilment si realitzem estudis on es planifica la recollida de mostres, però és molt difícil per no dir impossible aplicar la tècnica en un laboratori convencional, on l'arribada de las mostres és imprevisible.

El medi més utilitzat per a la sembra de mostres sospitoses de *Bartonella* és l'agar Columbia amb un 5% de sang de ovella (plaques comercialitzades)

que s'incuben a una temperatura de 35-37°C aproximadament, amb humitat i amb una concentració de CO₂ del 5-10%. El període d'incubació pot variar des dels 15 dies que necessiten espècies com *B. henselae* o *B. quintana* fins als 2 mesos quan parlem d'aïllament primari de mostra biològica. Per als subcultius, el temps de cultiu pot disminuir fins als 3-5 dies, però cal tenir en compte que cada vegada que es fa un subcultiu es modifica no només el temps de creixement sinó també la morfologia de la colònia (La Scola et al, 1999; Blanco et al, 2008 annex1). És important tancar les plaques o col·locar-les en bosses de plàstic per tal d'evitar la dessecació i la contaminació (Koehler et al, 1997). *Bartonella bacilliformis* necessita els mateixos medis enriquits, però la seva temperatura òptima de creixement és de 28-30°C (Maguina et al, 2001)

Els medis líquids s'utilitzen principalment per al cultiu de sang. Es poden utilitzar els mateixos aparells automatitzats que es fan servir pels cultius de sang convencionals, però cal tenir en compte que passat un temps d'incubació, de aproximadament 21 dies, no podem donar com a definitiu el cultiu. Aquests bacteris pel seu metabolisme generen molt poc CO₂ i podria ser que l'aparell no detectés com a positiu el cultiu encara que ho fos. S'ha de centrifugar la sang i el medi del flascó incubat a 1500rpm durant 10 min i fer un subcultiu en placa d'agar sang que s'incuba uns 30 dies més. També s'han utilitzat medis líquids amb RPMI com a base i incorporant suplementes com glutamina, HEPES, piruvat, aminoàcids i hemina entre d'altres; sembla que s'obté un creixement més ràpid però no sembla detectar més positivitats (Wong et al, 1995; Tierno et al, 1995; Schwartzman et al, 1993).

Per últim, un dels mètodes d'aïllament que també es poden utilitzar són els cultius cel·lulars amb cèl·lules VERO. Hi ha estudis que reporten un millor i més ràpid creixement de *Bartonella* malgrat les línies cel·lulars son difícils de mantenir i es poden contaminar fàcilment. No és un medi de cultiu que

pugui ser incorporat fàcilment a la rutina d'un laboratori (La Scola et al, 1999).

Identificació microbiològica

La primera identificació que es pot fer és la observació directa en el medi de cultiu. Les colònies de *Bartonella* tenen 2 morfologies diferents: 1- irregulars, aspres, seques i blanquinoses o 2- llisa, circular, mucosa i fortament adherida al medi. L'aspecte de les colònies varia segons l'espècie; així *B. henselae* presenta colònies més heterogènies i *B. quintana* més uniformes.

El fet d'haver d'allargar la incubació fins a més de set dies abans de l'aparició de les primeres colònies, una tinció de Gram on es visualitzi bacils gram negatius petits i corbats i una reacció de la catalasa i oxidasa negatives són suficients per fer una identificació inicial de *Bartonella* a nivell de gènere (Agan et al, 2002).

Identificar les diferents espècies del gènere *Bartonella* al laboratori, resulta molt difícil, ja que fenotípicament i genotípicament són molt similars. Totes les espècies són oxidasa, ureasa, nitrat reductasa negatives i totes les espècies de *Bartonella* són catalasa negativa menys *B. bacilliformis*.

Després de diferents estudis comparatius entre els diferents mètodes comercialitzats (RapID ANA II System, Rapid ID 32 A (Fig. 16) i MicroScan Rapid) només un Kit d'identificació ràpida d'anaerobis de Microscan, sembla presentar un perfil que podria ajudar a la identificació. Utilitzant aquest mètode, a partir d'un McFarland n°3 Standard, s'hauria de poder distingir algunes espècies de *Bartonella*, però sembla que la única conclusió acceptada és que només es pot utilitzar per a una identificació a nivell de gènere (Clarridge et al, 1995).



Fig. 16 Galeria Rapid ID 32 A (BioMérieux)

Mètodes moleculars

L'aparició i desenvolupament de les diferents tècniques moleculars ha estat un dels principals factors per avançar en el diagnòstic i en la investigació epidemiològica de les infeccions per *Bartonella*. Hi ha diferents mètodes moleculars utilitzats per a la identificació i diferenciació de espècies de *Bartonella*: *Southern blot*, reacció en cadena de la polimerasa o PCR, polimorfisme en la longitud dels fragments de restricció o RFLP (Houpikian et al, 2001).

Southern blot

És una tècnica que permet la identificació de seqüències específiques de ADN a través de electroforesi en gel i de hibridació utilitzant sondes específiques. Per analitzar una mostra de ADN, aquesta s'ha de fragmentar utilitzant la sonicació o enzims de restricció i els fragments es separen de major a menor grandària fent una electroforesi en gel. Una vegada acabada, els fragments de ADN es traspassen a un filtre de nitrocel·lulosa. A continuació, el filtre s'incuba amb una sonda marcada, específica per a la seqüència que es vol identificar. Aquesta sonda és una seqüència d'àcid nucleic, ADN o ARNm, que reconeixerà la seqüència de ADN immobilitzada al filtre, a través del reconeixement de seqüències complementàries d'àcids nucleics. Aquesta tècnica és molt laboriosa i necessita molt temps, a més de grans quantitats de ADN per treballar. Per aquest motiu no és una tècnica que es pugui aplicar directament sobre mostra biològica (Sader et al, 1995).

Polimorfisme en la longitud dels fragments de restricció o RFLP

Són les variacions en les bases nitrogenades del lloc on un enzim de restricció talla un segment de ADN. Aquestes variacions afecten al tamany dels fragments que resulten del tall. Els RFLP es poden utilitzar com a marcadors en la construcció de mapes físics i de lligament, doncs varien entre espècies (Sader et al, 1995).

Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) és la tècnica que consisteix en l'amplificació *in vitro* d'un fragment de ADN específic. Per dur a terme el procés d'amplificació es necessari conèixer, almenys parcialment, la seqüència que volem amplificar (un gen, una part d'un gen, una regió no codificadora). Bàsicament, es tracta de replicar una i una altra vegada un mateix fragment de ADN (Fig. 17).

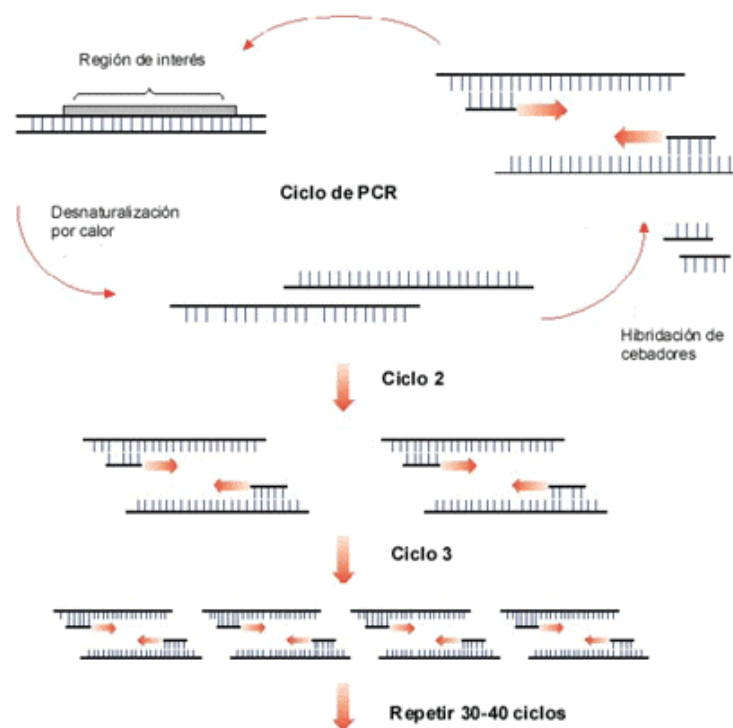


Fig. 17 Esquema d'amplificació per PCR.

Aquesta última tècnica molecular és la més utilitzada actualment, tant per al diagnòstic directe sobre mostra biològica com per a la identificació d'espècie. Existeix una gran varietat de gens descrits per a la identificació i diferenciació d'espècies de *Bartonella* sp. com el gen 16S ribosomal altament conservat (Regnery et al, 1992; Birtles et al, 1995), la regió intergènica de 16S/23S rRNA (ITS) (Jensen et al, 2000) (Fig. 18), el gen de la citrat sintasa (gltA) (Birtles et al, 1996; Avidor et al, 1997) i el gen de la riboflavina sintetasa (RibC) entre d'altres.

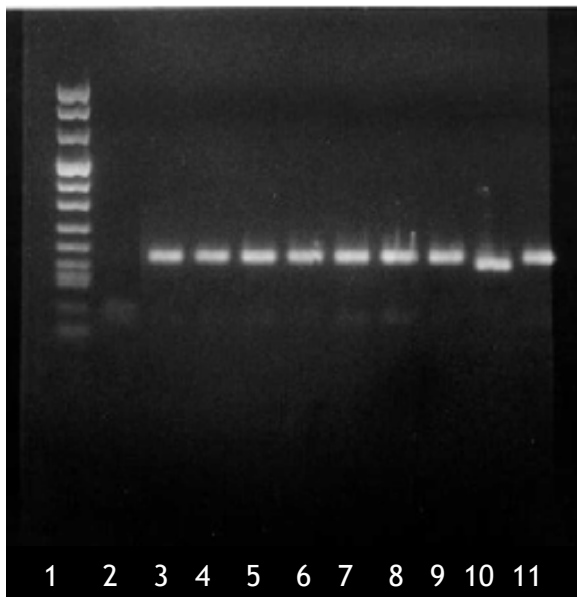


Fig. 18 Fotografia d'un gel d'agarosa al 1.8% amb Bromur d'etidi on veiem els productes de ADN amplificats de la regió 16S-23S intergènica. 1: Pes molecular; 2: Control Negatiu, 3-9 Aïllats de gat (banda específica a 172 pb). 10: *B. clarridgeiae*, 11: *B. henselae* amb bandes a 154 i 172 pb respectivament.

L'any 1990 Relman va descriure els primers *primers* per al diagnòstic de *Bartonella* (Relman et al, 1990); més tard, el 1994 Anderson va realitzar un estudi en 21 nòduls limfàtics que provenien de malalts amb sospita de malaltia per esgarrapada de gat (Anderson et al, 1994); des d'aquests primers anys la descripció i publicació de nous *primers* ha estat constant.

En el diagnòstic de la malaltia per esgarrapada de gat, la PCR s'ha aplicat principalment en les mostres biològiques que provenen de ganglis limfàtics obtingudes per punció i aspiració de material o biòpsia. El material biològic pot ser fresc, congelat o fixat amb formol i parafinat. En mostres parafinades la sensibilitat obtinguda està entre el 43% i el 68% (Anderson et al, 1994; Sander et al, 1999; Mouritsen et al, 1997; si utilitzem els mateixos

primers però en mostres fresques la sensibilitat augmenta del 69% al 84% (Avidor et al, 1996; Anderson et al, 1994). Aquesta sensibilitat pot augmentar fins el 96% obtingut en un estudi realitzat amb biòpsies utilitzant els *primers* p12B-p24E (Bergmans et al, 1995) i fins a un 100% de sensibilitat obtingut utilitzant els primers p93E-p13B (Avidor et al, 1997).

En malalts amb AB, la PCR ha demostrat tenir una bona sensibilitat per detectar ADN de *Bartonella* i també per identificar l'espècie (Koehler et al, 1992; Relman et al, 1990). Altres teixits que s'han utilitzat són l'os i el cervell (George et al, 1998)

S'ha detectat ADN de *Bartonella* en sang total, tant en pacients amb endocarditis o bacterièmia (Raoult et al, 2006; Klein et al, 2002; Kreisel et al, 2005; Lesprit et al, 2003; Walls et al, 2006; Oteo et al, 2006; Vikram et al, 2007) com en tres pacients diagnosticats de malaltia per esgarrapada de gat (Del Prete et al, 2000; Maruyama et al, 2000; Maruyama et al, 2006). També s'ha trobat en sang de gats (Roy et al, 2001).

L'amplificació de ADN de *Bartonella* en ectoparàsits com puces, polls o paparres té una bona sensibilitat i especificitat i ens ajuda a conèixer millor els reservoris de *Bartonella* i les rutes de transmissió entre animals i humans (Koehler et al, 1994, Rydkina et al, 1999; Tabar et al, 2008)

1.4.2 Serologia

La detecció específica d'anticossos enfront *Bartonella* és fins al moment el millor mètode de diagnòstic de la infecció, redueix el temps que necessita el cultiu bacteriològic i és més senzilla que la PCR, tècnica més complexa.

Fins ara la tècnica de la PCR en sang o sèrum no pot desplaçar a la serologia com a tècnica diagnòstica de la infecció. Se sap que la PCR és una

tècnica més cara i que la seva sensibilitat respecte a la serologia es més baixa.

Això és degut a la baixa concentració de bacteris en sang; la majoria d'ells es troben segrestats en els teixits i eritròcits o també perquè la sang pot tenir inhibidors o substàncies com la hemoglobina que poden interferir en la tècnica de la PCR.

Els primers test serològics van ser desenvolupats al Center for Disease Control (CDC) i van ser validats per nombrosos estudis clínics (Zangwill et al, 1993; Regnery et al, 1992; Sander et al, 2001). Amb el temps, els diferents tests per diagnosticar la infecció per *Bartonella* s'han anat desenvolupant i ara tenim diversos Kits comercialitzats.

Actualment hi ha disponibles tècniques comercialitzades d'enzim immunoassaig (EIA) i d'Immunofluorescència indirecta (IFI) per a *B. quintana*, *B. bacilliformis* i *B. henselae*.

Tècnica Enzimoimmunoassaig (EIA)

Per a la tècnica de l'enzimoimmunoassaig, es necessita una placa de microdil·lució on els pouets contenen antígens o extractes proteics de *B. henselae*; es posa el sèrum del pacient que es vol estudiar i després d'incubar i rentar s'aplica el conjugat que és un anti IgG o IgM humana. La reacció positiva la podem veure pel viratge de color que desenvolupen el sèrums dels pacients que han estat en contacte amb l'agent infeccios i per tant contenen anticossos. Com en tots els immunoassaigs, poden ésser en formes directes (enzimoimmunoassaig directe) i indirectes (enzimoimmunoassaig indirecte). Aquesta tècnica presenta gairebé els mateixos avantatges de sensibilitat, especificitat i precisió que el seu equivalent, el radioimmunoassaig, però la seva senzillesa tècnica s'imposa en la majoria d'aplicacions.

Tècnica Immunofluorescència indirecta (IFI)

És un mètode que permet localitzar un antigen en un teixit o en unes cèl·lules aïllades, gràcies al marcatge d'un anticòs específic amb una substància fluorescent que no en modifica les propietats immunològiques. Quan es produeix la reacció antigen-anticòs el complex pot ésser visualitzat en el microscopi de fluorescència (amb llum ultraviolada).

En la IFI són utilitzats dos tipus d'anticossos, un d'específic que reacciona amb l'antigen, i un altre que té especificitat pel primer anticòs marcat amb la substància fluorescent. En la tècnica utilitzada per detectar anticossos enfront *B. henselae* o *B. quintana*, tenim en un portaobjectes l'antigen fixat de *Bartonella*.

Si volem detectar IgG es treballa sobre microorganismes crescuts en cultiu de cèl·lules VERO (Fig. 19), si es tracta de detectar anticossos IgM, són bacteris obtinguts de medis de cultiu sòlids.

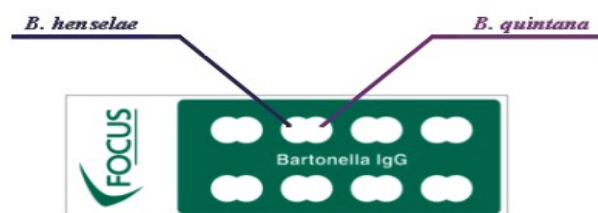


Fig. 19 Portaobjectes comercial per detecció de *B. henselae* i *B. quintana*.

La tècnica consisteix en posar en contacte el sèrum del malalt prèviament diluït amb l'antigen, incubar i rentar, afegir l'IgG o IgM anti humana marcada, deixar incubar i rentar; si és positiu es poden veure els bacteris fluorescents (Fig. 20).

Els sèrums positius es van diluint fins a trobar la primera dilució negativa (Fig. 21). Aquesta és una tècnica subjectiva; per aquest motiu és bo que el personal que realitzi la tècnica sigui sempre el mateix o que siguin dues persones les responsables de mirar la Immunofluorescència i decidir el títol que es considera positiu (Zbinden et al, 1997).

Els resultats de la serologia s'han de complementar amb altres proves diagnòstiques sempre que sigui possible (cultiu, PCR).

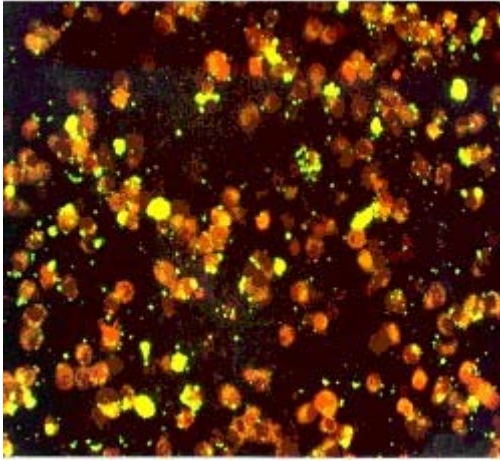


Fig. 20 Serologia de *Bartonella* positiva

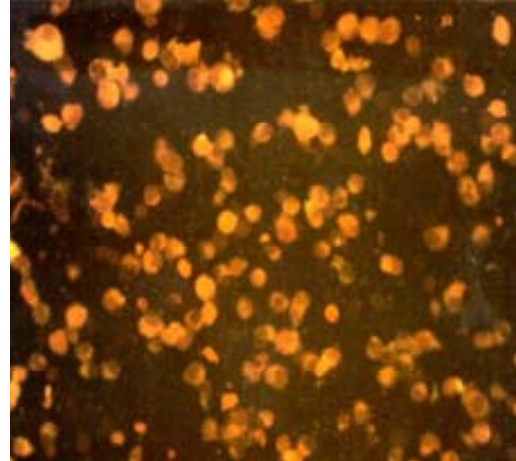


Fig. 21 Serologia de *Bartonella* negativa

B. henselae i *B. quintana* son molt similars antigènicament i s'ha demostrat que pot haver-hi fins a un 95% de reaccions creuades en la tècnica de IFI (Sander et al, 2001); aquests resultats són iguals si s'utilitza la tècnica de EIA (Bergmans et al, 1997). En aquests moments s'estan investigant diferents antígens específics com 8-kDa, 17-kDa i 83-kDa de *B. henselae* trobats en malalts amb MEG, amb l'idea que s'hauran d'incloure múltiples serotips en el assaigs immunològics. Les variacions en els antígens dels diferents serotips de *B. henselae* podrien ser els responsables de les diferències en la sensibilitat de les tècniques.

En la majoria de persones, es poden detectar anticossos entre la primera i segona setmana des de l'aparició dels símptomes, encara que algunes poden continuar sent seronegatives al llarg de tota la infecció. Les IgM poden ser negatives en el moment del diagnòstic clínic ja que presenten un màxim a les quatre setmanes i després van desapareixent (Barka et al, 1993; Bergmans et al, 1997).

Un resultat serològic negatiu no exclou la infecció; podríem no detectar els anticossos per un problema de temps (detecció precoç i per tant, encara

poca resposta immunològica) o podria ser que el pacient estigués tant immunodeprimit que no tingués resposta immunològica.

Es dóna com a positiu un títol de IgG superior a 1/64 en els estudis de seroprevalença, mentre que per al diagnòstic de malaltia per esgarrapada de gat el títol d'IgG ha de ser superior o igual a 1/128 i el de IgM superior o igual a 1/20. En casos d'endocarditis el títol considerat positiu és de 1/800.

OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

2.1. Justificació de la tesi

Les malalties anomenades emergents són cada vegada més freqüents al nostre entorn. Sempre havien estat presents a la nostra societat, infeccions per esgarrapada de gat sovint en nens, en professionals de risc com veterinaris, etc, però no ha sigut fins aquests últims anys, amb l'aparició de pacients immunodeprimits (fonamentalment VIH), i l'augment de persones sense sostre (alcoholisme, drogodependència, precari status econòmic) quan s'han començat a diagnosticar més infeccions produïdes per *Bartonella* sp.

El motiu principal d'aquesta tesi és aprofundir en l'estudi de la infecció per *Bartonella henselae* en el nostre entorn. Per fer aquest retrat hem de conèixer tant la seroprevalença de la nostra població com la incidència de *Bartonella* en els vectors i reservoris principals.

2.2. Objectius plantejats

- 2.2.1 Estudiar la infecció per *Bartonella henselae* en gats, principals vectors i hostes.
- 2.2.2 Estudiar la seroprevalença de *Bartonella henselae* en la població sana de la nostra zona i els possibles factors de risc associats.
- 2.2.3 Estudiar la seroprevalença de *Bartonella henselae* en la població portadora del Virus d'immunodeficiència humana (VIH) i els diferents factors que poden influir-hi.

ARTICLES

3. ARTICLES

Article 1

Immaculada Pons, Isabel Sanfeliu, Mariela Quesada, Esperanza Antón, Maite Sampere, Bernat Font, Júlia Pla and Ferran Segura. Prevalence of *Bartonella henselae* in cats in Catalonia, Spain.

Am. J. Trop. Med. Hyg. 2005; 72 (4): 453-457.

Impact Factor 2.482, 1 quartil de Tropical Medicine.

PREVALENCE OF *BARTONELLA HENSELAE* IN CATS IN CATALONIA, SPAIN

IMMACULADA PONS, ISABEL SANFELIU, MARIELA QUESADA, ESPERANZA ANTON, MAITE SAMPERE, BERNAT FONT, JÚLIA PLA, AND FERRAN SEGURA

Infectious Diseases Program, Parc Taulí Hospital, Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell, Barcelona, Spain; Microbiology Laboratory, Unitat de Diagnostic per Imatge i Alta Tecnologia Diagnostic Center, Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell, Barcelona, Spain; Clinical Veterinary, Sabadell, Barcelona, Spain; Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract. *Bartonella henselae*, an emerging pathogen bacterium, is the main causative agent of the cat scratch disease. While the first clinical descriptions were associated with immunosuppressed patients, it is now more frequently observed in patients with normal immune status (endocarditis and bacteremia). Cats were found to be the only known reservoir of *B. henselae*. In this paper, we report the results obtained in the first study made to investigate the prevalence of *B. henselae* bacteremia and antibodies in domestic cats in Catalonia, Spain. Serum samples from 115 cats were tested for antibodies to *B. henselae* by immunofluorescent antibody testing, and 29.6% had a titer \geq 1:64. Seven *B. henselae* strains were isolated using standard culture techniques and amplification by a polymerase chain reaction and subsequent sequencing was performed on the intergenic spacer region between the 16 and 23S ribosomal RNA genes. Of all factors concerning the studied bacteremia rate (age, sex, habitat, presence of antibodies, contact with animals, parasites), only the presence of antibodies to *B. henselae* was statistically significant.

INTRODUCTION

In 1993, Brenner and others proposed to unify all the different species of *Rochalimea* under the genus *Bartonella*, and they agreed to rename them *B. quintana*, *B. vinsonii*, *B. henselae*, and *B. elizabethae*, and they were added to the single previous species *Bartonella bacilliformis*.¹ In 1995, Birtles and others proposed to include the genus *Grahamella* species within *Bartonella*, and five more species were added.² In 1997, *B. clarridgeiae* was included,³ in 1998, *B. tribocorum* and *B. washoensis* were included,^{4,5} and from 1999 to 2002, *B. koehlerae*, *B. alsatica*, *B. birtlesii*, *B. schoenbuchensis*, *B. capreoli*, and *B. bovis* were included.^{6–10} Of the 19 species named, only 9 were acknowledged as human pathogen species: *B. bacilliformis*, *B. quintana*, and *B. henselae* are the most frequently described species,^{11–13} while *B. elizabethae*, *B. vinsonii*, *B. washoensis*, *B. grahamii*, *B. clarridgeiae*, and *B. koehlerae* were recently identified as responsible for a few cases of human infections.^{5,14–17} *Bartonella henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. koehlerae*, and *B. elizabethae* are the main species isolated from cats, while the rest were isolated from other animals (coyotes, cattle, rodents, etc.).

Although the first clinical descriptions of *Bartonella* were associated with immunocompromised patients with bacillary angiomatosis, we currently know that this organism is directly involved in diseases affecting a large number of patients, regardless of their immune status. Cat scratch disease, hepatic peliosis, and some cases of bacteremia and endocarditis are directly caused by some species of the genus *Bartonella*.^{18–21} When studying the different diseases associated with *B. henselae*, contact with animals, especially cats, was found to be a common factor among many of the infected patients. The natural reservoir of this bacteria is the cat, and one of the main vectors of its transmission are fleas.^{22,23} The prevalence of *Bartonella* infection in cats determined by blood culture may vary from 4% to 70%. Seroprevalence varies according to the different studies conducted: from 4% to 95% in the United States, from 6% to 45% in Singapore; 8% in Switzerland, and 0% in eastern Canada and Norway.^{22,24–26}

Isolation of *B. henselae* from domestic cats has been reported from various parts of the world.^{27,28} However, no information is available from Spain. This is, to our knowledge, the first study that provides data about the prevalence of

B. henselae bacteremia and antibodies to this organism in cats in Catalonia, Spain.

In this study, we determined the prevalence of *Bartonella* bacteremia and of *B. henselae* seroprevalence in 115 Catalan cats. We analyzed the *Bartonella* strains previously isolated from cats by *Bartonella*-specific polymerase chain reaction (PCR) and sequencing the 16S–23S ribosomal RNA (rRNA) gene fragment, and then correlated *B. henselae* seropositivity and bacteremia with factors such as flea infestation, contact with animals, age, and sex.

MATERIALS AND METHODS

Animals. From January 2001 to May 2002, 115 cats visiting a veterinary clinic in Vallès Occidental, a region near Barcelona in Catalonia, Spain, were chosen for our study. Thirty-eight cats (33%) were \leq 1 year of age, 62 (54%) were females, and 87% were domestic cats. Ninety-nine cats (86%) were healthy animals visiting the clinic to be neutered or for an annual check-up, while 14% had some type of pathology (urinary tract infection, worms, and uterus infection). A total of 76.5% of the cats had contact with other animals (67% with only cats, 12% with dogs, and 21% with both) and 20 cats (17%) were infested with fleas.

Approximately 2.5 mL of blood was aseptically collected from the external jugular vein of each cat after receiving permission of the owners. One milliliter of blood was introduced in a serum-separating tube for serologic analyses; the remainder was placed into a pediatric isolator 1.5 tube (Isolator™ 1.5; Oxoid, Ogdensburg, NY).

***Bartonella* isolation.** Two hundred fifty microliters of blood were streaked onto Columbia agar plates supplemented with 5% sheep blood (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) in triplicate. The plates were incubated at 35°C in a moist atmosphere containing 5% CO₂ for nearly two months. The plates were checked every week and gram staining was done on suspicious colonies. All isolates were then frozen at –80°C in *Brucella* broth supplemented with 10% glycerol (v/v).

Bacterial strain identification. Suspicious colonies, based on their morphology and gram staining, were also identified with the Rapid ID 32A identification panel (BioMérieux) and by amplification of the intergenic spacer (ITS) region be-

tween the 16S and 23S rRNA genes with *B. henselae* forward (nucleotides 302 to 321) and reverse (nucleotides 473 to 454) (Invitrogen, Carlsbad, CA) complimentary primers, as previously described by Jensen and others.²⁹ The positivity of the amplification was confirmed by electrophoresis on 1.8% and 3% agarose gels. The sizes of the ITS PCR amplification products were determined by comparison with standard molecular mass marker VIII (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). The PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA), as reported by the manufacturer, and were sequenced with an automated sequencer ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Their sequences were compared with the corresponding sequences for *Bartonella* species available in the DNA analysis computer program NCBI Blast (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD).

Serologic analysis. Sera were obtained by centrifugation of 1-mL samples of blood at 1,500 rpm for 10 minutes, and the samples were frozen at -80°C until used. Antibody titers against *B. henselae* were determined in 115 serum samples by an indirect immunofluorescence antibody (IFA) test. Commercial slides (*Bartonella* IFA IgG; Focus Technologies, Inc., Herndon, VA) were used.³⁰ The IFA technique was standardized using two cat sera with known titers (kindly provided by Dr. Bruno B. Chomel, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA). These sera were also used as positive controls. A 1:128 dilution of a fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-cat polyclonal antibody (IgG heavy plus light chains; ICN Biomedicals, Irvine, CA) was used as a conjugate. Two-fold serial dilutions of the sera (from 1:64 to 1:1,024) were made in phosphate-buffered saline with 3% nonfat powdered milk and applied to the antigens, and the mixtures were incubated in a moist chamber for 30 minutes at 37°C . We considered specimens showing no fluorescence at IgG titers of 1:64 as negative. The intensity of each specific fluorescence was subjectively evaluated and independently graded by two of the authors.³¹

Statistical analysis. The sample size was calculated taking into account an expected prevalence of 40%, with a precision of $\pm 10\%$, and losses $\leq 10\%$. Qualitative variables were studied descriptively with 2×2 tables and chi-square tests were used to check statistical significance. When applicability conditions were not met, Fisher's exact test was used. A *P* value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

Isolation of *Bartonella* organisms. Of the 115 cultures performed, 15 were rejected due to contamination (all three plates were contaminated before one month). *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Stenotrophomonas* spp. were found in three cats (they showed clinical symptoms of uterine infection, pyodermitis, and a poor general condition, respectively). *Bartonella* spp. were isolated from the blood of 7 of the 100 cats tested.

The characteristics of the cats with *B. henselae* bacteremia are shown in Table 1. When the data were related to the prevalence of bacteremia versus age group, we obtained positive cultures in four cats ≤ 1 year of age (12.1%) and in three in cats > 1 year of age (4.5%). The prevalence of bacteremia was higher in male cats (9.3%) than in females (5.3%); how-

TABLE 1
Characteristics of the cats with *Bartonella henselae* bacteremia

Cat no.	Age (years)	Sex	Fleas	Titers of antibodies	Health status	Contact with animals
33	> 1	M	Yes	1:128	Healthy	Dog
53	≤ 1	F	No	1:256	Intestinal worms	Cat
72	> 1	F	No	1:512	Healthy	No
86	≤ 1	M	No	1:128	Dehydration	–
96	≤ 1	M	Yes	1:128	Healthy	Cat
103	≤ 1	F	No	1:512	Healthy	Cat
107	> 1	M	–	1:512	Healthy	Cat

ever, this difference was not statistically significant. Two cats (28.5%) with bacteremia had parasites and 19.3% of the non-bacteremic cats had fleas. Most (71.4%) the bacteremic cats were in contact with other cats or dogs. All bacteremic cats also had IgG antibodies to *B. henselae* with titers $> 1:128$. Of all the factors considered (age, sex, habitat, serology, parasites, and contact with other animals), only the presence of antibodies against *B. henselae* in bacteremic cats showed statistical significance (*P* = 0.005).

Identification of *Bartonella*. The growth of colonies was not visible until after 10–15 days of incubation. Gram staining of the isolates showed small, slightly curved, gram-negative rods. The isolates were catalase and oxidase negative. Biochemical reaction profiles of the isolates were obtained with the Rapid ID 32A System (BioMérieux). Identification of the species was not possible by biochemical methods. A fragment of the 16S–23S rRNA gene was amplified from the DNA extracted from the isolates from cats. Sequencing of the 172-basepair fragment showed that all cats had bacteremia with *B. henselae*; the two macroscopically different types of colonies isolated from the same cat were *B. henselae*. The DNA amplified from the control strain of *B. clarridgeiae* had the expected 154-basepair fragment. In this study, no cats bacteremic with *B. clarridgeiae* were found. The results of the PCR analysis are shown in Figure 1.

Serologic data. Thirty-four (29.6%) of the 115 cats studied had antibodies to *B. henselae*. Of the 38 cats < 1 year of age, 10 (26.3%) had IgG antibodies against *B. henselae*; however, in older cats this value increased up to 31%. Seven (20.5%) of 34 cats positive for IgG antibodies also had fleas, while 16% of the cats with negative serologic results had fleas (this difference was not statistically significant). The relationship between immunofluorescence antibody titers to *B. henselae* and age and sex in 115 cats is summarized in Table 2.

DISCUSSION

Diseases associated with *B. henselae* have recently showed a gradual increase, and studies conducted in human and animal populations have provided more knowledge on the different epidemiologic aspects of *Bartonella* species. Cats are the main reservoir of *B. henselae*.³² Different studies have shown that there is a high seroprevalence and a relatively high rate of asymptomatic bacteremia in young cats.^{32–35} Seven percent of domestic cats in our study had *B. henselae* bacteremia. If we consider only cats < 1 year of age, this bacteremia rate increases up to 12.1%. This prevalence is slightly lower than those reported by other investigators (13% by Sander

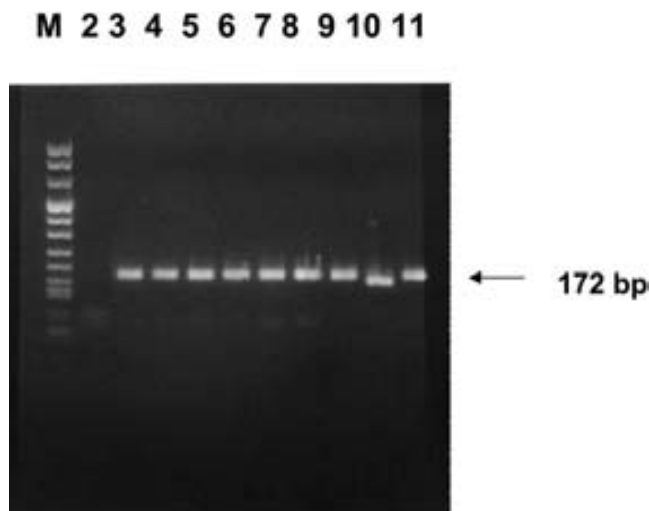


FIGURE 1. Polymerase chain reaction–based identification of *Bartonella* species isolated from cat blood. Shown is an ethidium bromide–stained 1.8% agarose gel demonstrating amplified 16S–23S ribosomal intragenic region products from template DNAs derived from *Bartonella* species. Lane M, DNA molecular mass marker VIII (Boehringer Mannheim); lane 2, negative control, lanes 3–9, isolates from cats; lane 10, *B. clarridgeiae*; lane 11, *B. henselae*. Lanes 10 and 11 (controls) both showed the expected products of 154 and 172 basepairs, respectively. The **arrow** indicates the specific 172-basepair (bp) band.

and others³⁶ in Germany and 53% by Heller and others²⁷ in France).

The culture medium used may have directly influenced the isolation of *Bartonella* because the use of fresh rabbit blood as a supplement in the culture medium would have favored its growth and isolation.²² In our study, we used commercial (not fresh) media supplemented with 5% sheep blood. In most studies, bacteremia is produced by *B. henselae*. Although *B. clarridgeiae* has been isolated as the single causative agent of infection in some studies,³⁷ co-infections with both species have also been reported.^{28,38} To identify the isolated bacteria, we used a PCR technique with primers that best suited our study. The primers chosen allowed us to identify not only genus, but also the species of these bacteria. All strain isolated in our study were *B. henselae*.

Some investigators have pointed out that differences in bacteremia rates may be influenced by important climatic factors (high temperatures and humidity would favor infection).^{28,37} These climatic factors would also be directly related

to an increase in flea infestations, since their biologic cycle is favored in countries with these conditions.³⁹

There are different and extensively described vectors for the different species of the genus *Bartonella*. Infection with *B. bacilliformis* is related to *Lutzomyia* spp. sand flies, which are also a vector of *Leishmania*. Humans are the only known reservoir of *B. quintana*, which has *Pediculus humanus corporis* (lice) as vector. As for *B. henselae*, whose main reservoir is domestic cats (especially young ones with asymptomatic bacteremia), its known vector for its transmission among felines is *Ctenocephalides felis* (the cat flea).⁴⁰ Although this transmission mechanism is extensively described in felines, it has not been documented in humans. Also, horizontal transmission should not be overlooked since it can occur in absence of these vectors.⁴¹

In this study, we believe that the two factors that can exert the greatest influence on the low prevalence of bacteremia are 1) the low number (33%) of cats less than one year of age in our sample, and 2) the low (17.4%) incidence of flea infestation.²⁶ We also assume that the fact that animals came from only one clinic could also affect the results. Infestations, contact with other animals, or sex were not statistically significant risk factors in our study.

The single factor in this study with statistical significance ($P = 0.005$) was serologic results positive for infection with *B. henselae*. All bacteremic cats showed antibody titers $\geq 1:128$ against *B. henselae*. Some investigators have reported the existence of bacteremic animals with negative serologic results; this may have occurred because detection of antibodies was conducted in an early stage of the infection, or because the animals had some immune disorder that altered their immune responses.^{22,28}

The seroprevalence value for *B. henselae* in our study was 29.6%. In the available literature, there is a broad variability of seroprevalence values: in some studies, the seroprevalence against *B. henselae* reaches 38–80%,^{28,42} while in others, some selection of a feline population (cats with high rates of flea infestation or populations with a bacteremia rate of 70%).²² Conversely, some studies conducted in Scandinavian countries show a prevalence of *B. henselae* that is close to 0%.²⁶ Another study reported an antibody positivity rate against *B. elizabethae* of 14%, whereas seroprevalence against *B. henselae* was only 1.5%.⁴³

In cats with antibody titers of 1:512, cultures were positive in 37.5%. In our study, the serologic test had a positive predictive value of 20.6%, which limited its utility to differentiate between bacteremic and non-bacteremic cats, whereas the

TABLE 2
Prevalence of immunofluorescence antibody titers to *Bartonella henselae* by age and sex for 115 Spanish cats*

Age (years)/sex	No. of cats negative or positive by IFA/total no. tested (%)				
	IgG (Neg)	IgG (1:64)	IgG (1:128)	IgG (1:256)	IgG (1:512)
≤ 1					
Females	22/26 (84.6)	1/26 (3.8)	1/26 (3.8)	–	2/26 (7.7)
Males	6/12 (50)	–	3/12 (25)	2/12 (16.6)	1/12 (8.3)
> 1					
Females	25/37 (67.5)	1/37 (2.7)	7/37 (18.9)	2/37 (5.4)	2/37 (5.4)
Males	28/40 (70)	2/40 (5)	5/40 (12.5)	2/40 (5)	3/40 (7.5)
Total	81/115 (70.4)	4/115 (3.5)	16/115 (13.9)	6/115 (5.2)	8/115 (6.9)

* IFA = indirect immunofluorescence assay.

absence of antibodies against *B. henselae* was highly predictive of the absence of bacteremia (negative predictive value = 100%).

Some studies reported bacteremia caused by co-infection of two different species of *Bartonella*.^{28,38} In our study, all colonies, except one, had a similar morphology. Nevertheless, with the identification obtained by sequencing the 16S–23S rRNA gene fragment, it was determined that all colonies were *B. henselae*.

Determining the presence or absence of bacteremia in cats is crucial in assessing the actual risk of transmission to humans. Culturing of cat blood samples still remains the only technique for identifying bacteremic cats. However, this procedure does not provide conclusive results because cats can be intermittently bacteremic. Serologic testing appears to be of limited value in predicting bacteremia. However, the inability to detect antibodies to *B. henselae* appears to be predictive of the absence of bacteremia.

Despite some limitations in the cat population selected for our study, the data indicate that infection with *B. henselae* in cats is present in the urban center of Catalonia, Spain. This is the first report to document the distribution of *B. henselae* among cats in this country. Experimental studies are necessary to determine the kinetics and duration of bacteremia in cats. Similarly, studies are needed to better understand the method of transmission of *B. henselae* from cat to cat and from cats to humans to develop strategies to prevent *B. henselae* infection.

Received March 9, 2004. Accepted for publication November 5, 2004.

Acknowledgments: We are grateful to Bruno Chomel (Department of Population Health and Reproduction, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA) for kindly supplying *B. henselae* and *B. clarridgeiae* strains and cat sera. We also thank Jordi Real for advice on biostatistics.

Financial support: This work was supported by an FIS-0/0598 grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (Madrid, Spain) and Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI-CO3/14).

Authors' addresses: Immaculda Pons, Mariela Quesada, Esperanza Anton, Maite Sampere, Bernat Font, Júlia Pla, and Ferran Segura, Infectious Disease Program, Department of Internal Medicine, Corporació Sanitària Parc Taulí, Parc Taulí s/n, PC 08208 Sabadell, Barcelona, Spain, Telephone: 34-93-745-8252, Fax: 34-93-716-0646, E-mails: ipons@cspt.es, mquesada@cspt.es, eanton@cspt.es, bfont@cspt.es, and fsegura@cspt.es. Isabel Sanfeliu, Microbiology Laboratory, Unitat de Diagnòstic per Imatge i Alta Tecnologia Diagnòstic Center, Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell, Barcelona, Spain, E-mail: isanfeliu@cspt.es.

REFERENCES

- Brenner J, O'Connor S, Winkler H, Steigerwalt A, 1993. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinnonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the familia *Bartonellaceae* from the order *Rickettsiales*. *Int J Syst Bacteriol* 43: 777–786.
- Birtles JR, Harrison TG, Saunders NA, Molyneux D, 1995. Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* com. 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* 45: 1–8.
- Kordick DL, Hilyard EJ, Hadfiel TL, Wilson KH, Steigerwalt AG, Brenner DJ, Breitschwerdt EB, 1997. *Bartonella clarridgeiae*, a new recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease). *J Clin Microbiol* 35: 1813–1818.
- Heller R, Riegel P, Hansmann Y, Delacour G, Bermond D, Dehio C, Lamarque F, Monteil H, Chomel BB, Piémont Y, 1998. *Bartonella tribocorum* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rats. *Int J Syst Bacteriol* 48: 1333–1339.
- Kosoy M, Murray M, Gilmore RD, Bai Y, Gage KL, 2003. *Bartonella* strains from ground squirrels are identical to *Bartonella washoensis* isolated from a human patient. *J Clin Microbiol* 41: 645–650.
- Droz A, Chi B, Horn E, Steigerwalt A, Whitney AM, Brenner DJ, 1999. *Bartonella koehlerae* sp. nov., isolated from cats. *J Clin Microbiol* 37: 1117–1122.
- Heller R, Kubica M, Mariet P, Riegel P, Delacour G, Dehio C, Lamarque F, Kasten R, Boulouis HJ, Monteil H, Chomel BB, Piémont Y, 1999. *Bartonella alsatica* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rabbits. *Int J Syst Bacteriol* 49: 283–288.
- Bermond D, Heller R, Barrat F, Delacour G, Dehio C, Alliot A, Monteil H, Chomel B, Boulouis HJ, Piemont Y, 2000. *Bartonella birtlesii* sp. nov., isolated from small mammals (*Apodemus* spp.). *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 1973–1979.
- Dehio C, Lanz C, Pohl R, Behrens P, Bermond D, Piemont Y, Pelz K, Sander A, 2001. *Bartonella schoenbuchii* sp. nov., isolated from the blood of wild roe deer. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 1557–1565.
- Bermond D, Boulouis HJ, Heller R, van Laere G, Monteil H, Chomel BB, Sander A, Dehio C, Piemont Y, 2002. *Bartonella bovis* sp. nov. and *Bartonella capreoli* sp. nov., isolated from European ruminants. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 383–390.
- Alsmark CM, Frank AC, Karlberg EO, Legault BA, Ardell DH, Canback B, Eriksson AS, Naslund AK, Handley SA, Huvet M, La Scola B, Holmberg M, Andersson SG, 2004. The louse-borne human pathogen *Bartonella quintana* is a genomic derivative of the zoonotic agent *Bartonella henselae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 9716–9721.
- Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB, 2004. Cat scratch disease and other zoonotic *Bartonella* infections. *J Am Vet Med Assoc* 224: 1270–1279.
- Comer JA, Paddock CD, Childs JE, 2001. Urban zoonoses caused by *Bartonella*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, and *Rickettsia* species. *Vector Borne Zoonotic Dis* 1: 91–118.
- Johnson G, Ayers M, McClure SC, Richardson SE, Tellier R, 2003. Detection and identification of *Bartonella* species pathogenic for humans by PCR amplification targeting the riboflavin synthase gene (ribC). *J Clin Microbiol* 41: 1069–1072.
- Kerkhoff FT, Bermans AMC, van der Zee A, Rothova A, 1999. Demonstration of *Bartonella grahamii* DNA in ocular fluids of a patient with neuroretinitis. *J Clin Microbiol* 37: 4034–4038.
- Mansueto P, Di Lorenzo G, Rizzo M, Mazzola G, Affronti M, Battista Rini G, Mansueto S, 2003. Bartonellosis. *Recenti Prog Med* 94: 177–185.
- Avidor B, Graidy M, Efrat G, Leibowitz C, Shapira G, Schattner A, Zimhony O, Giladi M, 2004. *Bartonella koehlerae*, a new cat-associated agent of culture-negative human endocarditis. *J Clin Microbiol* 42: 3462–3468.
- Aguirrebengoa K, Benito JR, Montejo M, Bereciartua E, Perez-Irezabal J, Gonzalez-Zarate P, 1999. Cat-scratch disease: series of 14 cases. The diagnostic usefulness of serology. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 17: 15–18.
- Chomel BB, 1996. Cat-scratch disease and bacillary angiomatosis. *Rev Sci Tech* 15: 1061–1073.
- Brouqui P, Lascola B, Roux V, Raoult D, 1999. Chronic *Bartonella quintana* bacteremia in homeless patients. *N Engl J Med* 340: 184–189.
- Raoult D, Fournier PE, Drancourt M, Marrie J, Etienne J, Cosserrat J, Cacoub P, Poincignon Y, Leclercq P, Sefton AM, 1996. Diagnosis of 22 new cases of *Bartonella* endocarditis. *Ann Intern Med* 125: 646–652.
- Chomel BB, Abbott JG, Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, Kass PH, Glasser CA, Pederson NC, Koehler JE, 1995. *Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. *J Clin Microbiol* 33: 2445–2450.

23. Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, Chi B, Yamamoto K, Roberts-Wilson J, Gurfield A, Abbott R, Pedersen NC, Koehler JC, 1996. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J Clin Microbiol* 34: 1952–1956.
24. Nasirudee AMA, Thong ML, 1999. Prevalence of *Bartonella henselae* immunoglobulin G antibodies in Singaporean cats. *Pediatr Infect Dis J* 18: 276–278.
25. Glaus T, Hofmann-Lehmann R, Greene C, Glaus B, Wolfensberger C, Lutz H, 1997. Seroprevalence of *Bartonella henselae* infection and correlation with disease status in cats in Switzerland. *J Clin Microbiol* 35: 2883–2885.
26. Bergh K, Bevanger L, Hanssen L, Loseth K, 2002. Low prevalence of *Bartonella henselae* infections in Norwegian domestic and feral cats. *APMIS* 100: 309–314.
27. Heller R, Artois M, Xemar V, Briel D, Gehin H, Jaulhac B, Montiel H, Piemont Y, 1997. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in stray cats. *J Clin Microbiol* 35: 1327–1331.
28. Chomel BB, Carlos ET, Kasten RW, Yamamoto K, Chang CC, Carlos RS, Abenes MV, Pajares CM, 1999. *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* infection in domestic cats from the Philippines. *Am J Trop Med Hyg* 60: 593–597.
29. Jensen WA, Fall MZ, Rooney J, Kordick DL, Breitschwerdt EB, 2000. Rapid identification and differentiation of *Bartonella* species using a single-step PCR assay. *J Clin Microbiol* 38: 1717–1722.
30. Regnery RL, Olson JG, Perkins BA, Bibb W, 1992. Serological response to “*Rochalimaea henselae*” antigen in suspected cat-scratch disease. *Lancet* 339: 1443–1445.
31. Zbinden R, Michael N, Sekulovski A, Graevenitz A, Nadal D, 1997. Evaluation of commercial slides for detection of immunoglobulin G against *Bartonella henselae* by indirect immunofluorescence. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16: 648–652.
32. Breitschwerdt E, Kordick DL, 2000. *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity and zoonotic potential for human infection. *Clin Microbiol Rev* 13: 428–438.
33. Koehler JE, Glaser CA, Tappero JW, 1994. *Rochalimaea henselae* infection. A new zoonosis with domestic cat as reservoir. *JAMA* 271: 531–535.
34. Seubert A, Schulein R, Dehio C, 2002. Bacterial persistence within erythrocytes: a unique pathogenic strategy of *Bartonella* spp. *Int J Med Microbiol* 291: 555–560.
35. Arvand M, Klose AJ, Schwartz-Porsche D, Hahn H, Wendt C, 2001. Genetic variability and prevalence of *Bartonella henselae* in cats in Berlin, Germany, and analysis of its genetics relatedness to a strain from Berlin that is pathogenic for humans. *J Clin Microbiol* 39: 743–746.
36. Sander A, Bühler C, Pelz K, Cramm E, Brecht W, 1997. Detection and identification of two *Bartonella henselae* variants in domestic cats in Germany. *J Clin Microbiol* 35: 584–587.
37. Marston E, Finkel B, Regnery R, Winoto I, Graham R, Wignall S, Simanjuntak G, Olson J, 1999. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in an urban Indonesian cat population. *Clin Diagn Lab Immunol* 6: 41–44.
38. Gurfield AN, Boulouis HJ, Chomel BB, Heller R, Kasten RW, Yamamoto K, Piemont Y, 1997. Coinfection with *Bartonella clarridgeiae* and *Bartonella henselae* and with different *Bartonella henselae* strains in domestic cats. *J Clin Microbiol* 35: 2120–2123.
39. Bergmans AMC, Jong CMA, Amerongen G, Schot CS, Schouls LM, 1997. Prevalence of *Bartonella* species in domestic cats in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 35: 256–261.
40. Piémont Y, Bermond D, 2001. Infections caused by *Bartonella* spp. *Ann Biol Clin (Paris)* 59: 593–604.
41. de Souza Zanutto M, Mamizuka EM, Raiz R Jr., de Lima TM, Diogo CL, Okay TS, Hagiwara MK, 2001. Experimental infection and horizontal transmission of *Bartonella henselae* in domestic cats. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 43: 257–261.
42. Fabbi M, de Giuli L, Tranquillo M, Bragoni R, Casiraghi M, Genchi C, 2004. Prevalence of *Bartonella henselae* in Italian stray cats: evaluation of serology to assess the risk of transmission of *Bartonella* to humans. *J Clin Microbiol* 42: 264–268.
43. Hjelm E, McGill S, Blomqvist G, 2002. Prevalence of antibodies to *Bartonella henselae*, *B. elizabethae* and *B. quintana* in Swedish domestic cats. *Scand J Dis* 34: 192–196.

Article 2

Pons, I. Sanfeliu, N. Cardenosa, M.M. Nogueras, B. Font, and F. Segura.

Serologic evidence of *Bartonella henselae* infection in healthy people in Catalonia, Spain.

Epidemiol. Infect. 2008; 136 (12): 1712-1716.

Impact Factor 2.360. 2 quartil de Public, Enviromental and Occupational Health.

Serological evidence of *Bartonella henselae* infection in healthy people in Catalonia, Spain

I. PONS^{1,2*}, I. SANFELIU³, N. CARDEÑOSA¹, M. M. NOGUERAS¹,
B. FONT¹ AND F. SEGURA^{1,2}

¹ Infectious Diseases Program, Department of Internal Medicine, Hospital Universitari Parc Taulí, Sabadell, Barcelona, Spain

² Department of Medicine, Universitat Autònoma Barcelona, Barcelona, Spain

³ UDIAT Diagnòstic Center, Corporació Sanitària Parc Taulí, Sabadell Barcelona, Spain

(Accepted 11 January 2008)

SUMMARY

Cat scratch disease (CSD), bacillary angiomatosis, hepatic peliosis and some cases of bacteraemia, endocarditis, and osteomyelitis are directly caused by some species of the genus *Bartonella*. The purpose of this study was to determine the prevalence of IgG antibodies against *Bartonella henselae* in healthy people and to identify the epidemiological factors involved. Serum samples from 218 patients were examined by indirect immunofluorescence assay (IFA). Significance levels for univariate statistical analysis were determined by the Mann–Whitney *U* test, χ^2 test and Fisher's exact test. Of 218 patients, 99 were female and 119 male, with a median age of 34·36 years (range 0–91 years). Nineteen (8·7%) reacted with *B. henselae* antigens. Of all the factors concerning the seroprevalence rate being studied (age, sex, contact with animals, residential area), only age was statistically significant. Our serological data seems to indicate that *B. henselae* is present in Catalonia and could be transmitted to humans.

INTRODUCTION

The number of zoonotic *Bartonella* spp. identified in the last 15 years has increased considerably, since the first HIV-infected patient with unusual vascular proliferative lesions of bacillary angiomatosis (BA) was described in 1983 [1]. Of the 21 species of *Bartonella* currently described, 10 are acknowledged as human pathogen species. *B. bacilliformis*, *B. quintana*, and *B. henselae* are the most frequently described species [2–4], while *B. elizabethae*, *B. vinsonii*, *B. washoensis*,

B. grahamii, *B. clarridgeiae*, *B. koehlerae* and *B. alsatica* were recently identified as being responsible for some cases of human infection [5–10]. Cat scratch disease (CSD), BA, hepatic peliosis and some cases of bacteraemia, endocarditis, osteomyelitis, uveitis and neurological disorders are directly caused by some species of the genus *Bartonella* [11–13]. To determine the real incidence of *Bartonella* infection, it is necessary to study the seroprevalence in the general population as well as the principal reservoirs and vectors involved in infection transmission. In the present study, we serologically tested 218 samples across Catalonia for evidence of *Bartonella* spp. antibodies and analysed possible corresponding risk factors for infection.

* Author for correspondence: Dr I. Pons, Infectious Disease Program, Department of Internal Medicine, Corporació Sanitària Parc Taulí, Parc Taulí s/n, E-08208 Sabadell, Barcelona, Spain (Email: ipons@tauli.cat)

MATERIAL AND METHODS

Geographical area

The study was undertaken in Vallès Occidental, Catalonia, a predominantly urban area near the coast in the northeast of Spain. A total of 11 municipalities (356 266 inhabitants) participated in the study.

Samples

Serum samples from 218 patients who had attended Sabadell Hospital were collected for the survey. The collection of samples took place during a 5-month period, from September to January. The samples include adults undergoing minor surgery and children cared for non-infectious diseases in the Paediatrics Emergency Service.

Taking into account a previous analysis of the actual population of Vallès Occidental regarding sex, age and residential area, subjects were selected in order to obtain a representative sample. Thus, the study population was stratified by sex, by age (0–14 years, 15–29 years, 30–44 years, 45–64 years, ≥ 65 years) and by residential area: rural (<5000 inhabitants), semi-rural (5000–50 000), and urban (>50 000).

Informed consent was obtained from all adult participants and from parents or legal guardians of minors. Each patient completed a questionnaire in which the following variables were registered: age, gender, place of residence, contact with pets, stray dogs, and occupation. Those inhabitants unable to answer the epidemiological survey were excluded.

The sample of heparinized blood was sedimented and the supernatant was collected and stored at -80°C . A serological survey was carried out according to the ethical guidelines of the ethics committee of Sabadell Hospital.

Serological technique

Human serum samples were evaluated by indirect immunofluorescence assay (IFA). We used commercial slides (*Bartonella* IFA IgG; Focus Technologies Inc., Herndon, VA, USA) to determine antibodies to *Bartonella* spp. The kit for detecting IgG antibodies utilizing Vero cells infected with either *B. henselae* or *B. quintana* was used according to the manufacturer's instructions. The serum samples were initially diluted 1/64. Any serum samples found to be positive at the initial dilution were further titrated. Positive and

negative controls were included in each test. We considered specimens showing no fluorescence at IgG titres of 1/64 as negative and specimens with bright fluorescence at a dilution of $\geq 1/64$ as positive. The intensity of each specific fluorescence test was subjectively evaluated and independently graded by two of the authors [14].

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS software version 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Seroprevalence was determined globally and by residential area. A univariate analysis was performed to determine possible risk factors. Univariate group comparisons were performed using χ^2 and Fisher's exact test. Group differences were determined by odds ratio and 95% confidence intervals. Quantitative variables were compared by Mann–Whitney *U* test. A *P* value of <0.05 was considered significant.

RESULTS

Of the 218 subjects, 119 were male and 99 female. The mean age was 34.36 years (0–91 years). Subjects were reported from 11 towns, and 145 (66.51%), 59 (27.2%), and 14 (6.5%) subjects lived in urban, semi-rural, and rural areas, respectively; 35 (16%) reported contact with pets, and four (1.9%) with stray dogs. In the group of 161 adults (≥ 18 years), there were 11 (6.8%) students, 27 (16.8%) retired, 37 (23%) housewives, 53 (32.9%) workers, and 26 (16.1%) unemployed. For seven people the occupation was unknown.

Considering titres of $\geq 1:64$ as positive, the seroprevalence of *B. henselae* in humans was 8.7%, considering samples with antibodies against *B. henselae* only or with *B. henselae* titres twofold higher to *B. quintana* titres. No sample had antibodies against *B. quintana* only. The relationship between the *B. henselae* antibody prevalence and the surveyed items is shown in Table.

Nineteen samples had antibodies against *B. henselae*. Ten of them had an IgG titre of 1:64, four a titre of 1:128, four a titre of 1:256 and one a titre of 1:512.

No difference in seropositivity was observed between males and females. The *B. henselae* seroprevalence was 8.3% in urban areas, 11.9% in semi-rural areas and 0% in rural areas. The mean age (\pm s.d.) of seropositive subjects was 42.83 ± 17.04 years, whereas the

Table Demographic information from subjects tested for antibodies to *B. henselae*

Variables (n=218)	No. subjects (%)	n (%) of positive	P value
Sex			0.858
Male	119 (54.6)	10 (52.6)	
Female	99 (45.4)	9 (47.4)	
Age (years)			
0-14	51 (23.4)	1 (5.3)	0.046
15-29	50 (23)	3 (15.8)	0.368
30-44	44 (20.1)	8 (42)	0.042
45-64	46 (21.1)	6 (31.6)	0.155
≥65	27 (12.4)	1 (5.26)	0.313
Residence area			
Urban	145 (66.5)	12 (63.1)	0.623
Semi-rural	59 (27)	7 (36.9)	0.185
Rural	14 (6.5)	0 (0)	0.286
Contact with animals			
Pets	35 (16)	6 (31.6)	0.05
Stray dog	4 (1.9)	1 (5.6)	0.296
Occupation (adults, ≥18 years, n=161)			
Student	11 (6.8)	1 (5.8)	0.015
Retired	27 (16.8)	5 (29.4)	0.172
Housewife	37 (23)	2 (11.8)	0.607
Worker	53 (32.9)	9 (52.9)	0.018
Unemployed	26 (16.1)	0 (0)	0.091
Unknown	7 (4.3)	0 (0)	0.112

mean age of seronegative subjects was 33.59 ± 23.56 years ($P=0.053$). Seropositivity was significantly more prevalent in subjects aged 30-44 years ($P=0.042$). On the other hand, subjects aged 0-14 years showed a lower seropositive rate ($P=0.046$). Of seropositive patients, six (31.6%) had contact with pets ($P=0.05$) and one (5.6%) with stray dogs (non-significant). Concerning occupation, students presented lower seroprevalence (5.8%, $P=0.015$) and workers had a higher seropositive rate (52.9%, $P=0.018$).

DISCUSSION

B. henselae, now regarded as the primary, and perhaps sole, causative agent of CSD, is also a cause of BA and hepatic peliosis, and has been associated with endocarditis, fever, and bacteraemia in adults and children [15, 16]. Isolation of *Bartonella* is typically time-consuming, often requiring 2-6 weeks or longer incubation for primary isolation. The resulting isolation must then be identified by PCR. In general, isolation or detection of *B. henselae* from blood is not successful for CDS patients who have no evidence of

systemic disease. Conversely, isolation of *Bartonella* spp. from blood of immunocompromised patients, or patients with evidence of systematic disease is usually possible. PCR offers a rapid and specific means to detect the organism directly from clinical samples and is more sensitive than isolation [17]. In humans, serological testing is the reference test for diagnosis of CDS and other infections by *Bartonella* [18]. An IgG anti-*B. henselae* antibody titre of ≥1:64 is considered as positive for infection.

Nineteen people (8.71%) had antibodies against *B. henselae*. This seroprevalence is slightly lower than those reported by other investigators: 30% by Sander *et al.* [18] in Germany, 19.8% by Alexiou-Daniel *et al.* [19] in Greece, and 24.7% by Garcia-Garcia *et al.* [20] in Sevilla, Spain. However, similar or lower seroprevalence have been found in healthy populations from Sweden (3.2%) or La Rioja, Spain (5.88%) [21, 22]. We are able to assume that this seropositivity may indicate a past infection with *Bartonella* spp. However, we could not exclude unspecified serological cross-reactivity with other heterologous antigens. It is well known that *Bartonella* can cross-react with other genera, such as *Coxiella burnetti* or *Chlamydia* [23, 24]. Therefore, we compared these data with those obtained in a previous study (M. Vila *et al.*, unpublished data). All 218 individuals included in this study were examined by an IFA test for *Chlamydia* [*Chlamydomphila pneumoniae* IFA IgG (Vircell, S.L., Santa Fè, Granada, Spain), cut-off 1/64]. Eight (3.66%) serum samples had antibodies against *B. henselae* exclusively; three serum samples reacted against *C. pneumoniae* and *Bartonella* at the same titre levels; six sera showed higher titres against *B. henselae* (1/128 vs. 1/32, 1/512 vs. 1/32 and 1/256 vs. 1/32); and in two other samples titres against *Chlamydia* were higher (1/256 vs. 1/64 and 1/128 vs. 1/64). These last two sera should not be considered positive for *B. henselae*. These results indicate *B. henselae* may be present in Catalonia and its seroprevalence might range from 6.42% to 7.9%.

The only statistically significant association observed was that between *B. henselae* seropositivity and age. *B. henselae* seropositivity was significantly more prevalent in subjects aged 30-44 years. This observation agrees with a study carried out in Greece, which also showed higher *B. henselae* seropositive rates in children aged <14 years (non-significant). Moreover, those children had greater titres [19]. Taking into account that the cat is the main *Bartonella* reservoir, most seropositive subjects had

contact with pets. Highest titres in children could be due to greater contact with pets. Seropositivity rates differ from one study to another due to the different epidemiological and climatic environments. Therefore, we carried out a seroprevalence study of *B. henselae* in cats from the same region and over the same period of time [25]. Seroprevalence of *B. henselae* in cats was 26% and there were 7% of cats with bacteraemia. If cats aged <1 year were considered, incidence of bacteraemia rises to 12.1%.

As shown in Sander *et al.* [18], most titres were not high. Thus, it seems that subjects did not have recent infection. In our study 1.37% of the healthy population examined had IgG antibodies to *B. henselae* at a titre 1:128, and 0.91% had IgG antibodies at a titre of 1:256 and 0.45% had IgG antibodies at a titre of 1:512.

Because bartonellosis is a newly recognized class of infection in Spain, it is important to identify certain potential risk factors. It is reasonable to assume that as reliable, validated, and safe methods for serological diagnosis of *Bartonella* infections become a routine procedure in many clinical laboratories, the spectrum of *Bartonella*-associated diseases will continue to expand. The present study therefore provides an epidemiological and serological framework for future *Bartonella* studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a FIS-0/0598 grant from 'Fondo de Investigaciones Sanitarias' (Health Research Fund), Madrid, Spain, and supported in part by Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III – FEDER, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008). We thank Jordi Real and Eva Penelo for their advice on biostatistics.

DECLARATION OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. Stoler MH, *et al.* An atypical subcutaneous infection associated with acquired immune deficiency syndrome. *American Journal of Clinical Pathology* 1983; **80**: 714–718.
2. Anderson BE, Neuman MA. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* 1997; **10**: 203–219.
3. Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB. Cat scratch disease and other zoonotic *Bartonella* infections. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2004; **224**: 1270–1279.
4. Comer JA, Paddock CD, Childs JE. Urban zoonoses caused by *Bartonella*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, and *Rickettsia* species. *Vector Borne Zoonotic Diseases* 2001; **1**: 91–118.
5. Johnson G, *et al.* Detection and identification of *Bartonella* species pathogenic for humans by PCR amplification targeting the riboflavin synthase gene (*ribC*). *Journal of Clinical Microbiology* 2003; **41**: 1069–1072.
6. Kosoy M, *et al.* *Bartonella* strains from ground squirrels are identical to *Bartonella washoensis* isolated from a human patient. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; **41**: 645–650.
7. Kerkhoff FT, *et al.* Demonstration of *Bartonella grahamii* DNA in ocular fluids of a patient with neuroretinitis. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; **37**: 4034–4038.
8. Mansueto P, *et al.* Bartonellosis. *Recenti Progressi in Medicina* 2003; **94**: 177–185.
9. Avidor B, *et al.* *Bartonella koehlerae*, a new cat-associated agent of culture negative human endocarditis. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; **42**: 3462–3468.
10. Raoult D, *et al.* First isolation of *Bartonella alsatica* from a valve of a patient with endocarditis. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; **44**: 278–279.
11. Chomel BB. Cat-scratch disease and bacillary angiomatosis. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties* 1999; **15**: 1061–1073.
12. Brouqui P, *et al.* Chronic *Bartonella quintana* bacteraemia in homeless patients. *New England Journal of Medicine* 1999; **340**: 184–189.
13. Raoult D, *et al.* Diagnosis of 22 new cases of *Bartonella* endocarditis. *Annals of Internal Medicine* 1996; **125**: 646–652.
14. Zbinden R, *et al.* Evaluation of commercial slides for detection of immunoglobulin G against *Bartonella henselae* by indirect immunofluorescence. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 1997; **16**: 648–652.
15. Piemont Y, Bermon D. Infections caused by *Bartonella* spp. *Annales de Biologie Clinique (Paris)* 2001; **59**: 593–604.
16. Chomel BB. Cat-scratch disease. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties* 2000; **19**: 136–150.
17. Fournier PE, Mainardi JL, Raoult D. Value of micro-immunofluorescence for diagnosis and follow-up of *Bartonella* endocarditis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2002; **9**: 795–801.
18. Sander A, *et al.* Seroprevalence of antibodies to *Bartonella henselae* in patients with scratch disease in healthy controls: evaluation and comparison of two commercial serological tests. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1998; **5**: 486–490.
19. Alexiou-Daniel AT, *et al.* Occurrence of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* in healthy Greek population. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2000; **68**: 554–556.

20. **Garcia-Garcia JA, et al.** Prevalence of serum antibodies against *Bartonella* spp. in a health population from the south area of the Seville province [in Spanish]. *Revista Clinica Espanola* 2005; **11**: 541–544.
21. **McGill S, et al.** *Bartonella* spp. seroprevalence in healthy Swedish blood donors. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2005; **37**: 723–730.
22. **Blanco JR, et al.** Seroepidemiology of *Bartonella henselae* infection in a risk group [in Spanish]. *Revista Clinica Espanola* 1998; **12**: 805–809.
23. **La Scola B, Raoult D.** Serological cross-reactions between *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae* and *Coxiella burnetii*. *Journal of Clinical Microbiology* 1996; **34**: 2270–2274.
24. **Maurin M, Etienne J, Raoult D.** Serological cross-reactions between *Bartonella* and *Chlamydia* species: implications for diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; **35**: 2283–2287.
25. **Pons I, et al.** Prevalence of *Bartonella henselae* in cats in Catalonia, Spain. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2005; **72**: 453–457.

Article 3

Pons, I. Sanfeliu, MM. Nogueras, M. Sala, M. Cervantes, MJ. Amengual and F.Segura.

Seroprevalence of *Bartonella* sp. infection in HIV patients in Catalonia, Spain.

BMC Infect. Dis. 2008; 8 (58):1-6.

Impact Factor 2.536. 2 quartil de Infectious Diseases.

Research article

Open Access

Seroprevalence of *Bartonella* spp. infection in HIV patients in Catalonia, Spain

Immaculada Pons*^{1,2}, Isabel Sanfeliu³, María Mercedes Nogueras¹, Montserrat Sala¹, Manuel Cervantes¹, M José Amengual³ and Ferran Segura^{1,2}

Address: ¹Infectious Diseases Program, Hospital de Sabadell Institut Universitari Parc Taulí UAB, Sabadell, Spain, ²Medicine Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain and ³UDIAT Diagnostic Center Laboratory, Sabadell, Spain

Email: Immaculada Pons* - ipons@tauli.cat; Isabel Sanfeliu - isanfeliu@tauli.cat; María Mercedes Nogueras - mnogueras@tauli.cat; Montserrat Sala - msala@tauli.cat; Manuel Cervantes - mcervantes@tauli.cat; M José Amengual - mjose@tauli.cat; Ferran Segura - fsegura@tauli.cat

* Corresponding author

Published: 1 May 2008

Received: 26 April 2007

BMC Infectious Diseases 2008, **8**:58 doi:10.1186/1471-2334-8-58

Accepted: 1 May 2008

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/8/58>

© 2008 Pons et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Although the first clinical descriptions of *Bartonella* infection were associated with immunocompromised patient with bacillary angiomatosis, we currently know that this organism is directly involved in diseases affecting a large number of patients, regardless of their immune status. Cat scratch disease, hepatic peliosis, and some cases of bacteraemia and endocarditis, are directly caused by some species of the genus *Bartonella*. The purpose of this study was to determinate the prevalence of IgG antibodies against *Bartonella henselae* and *B. quintana* in HIV patients and to identify the epidemiological factors involved.

Methods: Serum samples were collected from HIV patients treated at Hospital de Sabadell. Antibodies to *B. henselae* and *B. quintana* from 340 patients were examined by indirect immunofluorescence assay (IFA). Significance levels for univariate statistical test were determined by the Mann-Whitney U test and χ^2 test.

Results: Of 340 patients, 82 were women and 258 men, with a median age of 42.21 ± 10.35 years (range 16–86 years). Seventy-six (22.3%) patients reacted with one or more *Bartonella* antigens. Of all the factors concerning the seroprevalence rate being studied (age, sex, intravenous drugs use, alcohol consumption, CD4 levels, AIDS, HCV, HBV, residential area), only age was statistically significant.

Conclusion: A high percentage of HIV patients presents antibodies to *Bartonella* and is increasing with age.

Background

The spectrum of *Bartonella* infections has expanded rapidly since the first HIV- infected patient with unusual, vascular proliferative lesions of bacillary angiomatosis (BA) was described in 1983 [1]. Of the 19 species of *Bartonella*

described until now, only 10 were acknowledged as human pathogen species; *B. bacilliformis*, *B. quintana*, and *B. henselae*, are the most frequently described species [2–4], while *B. elizabethae*, *B. vinsonii*, *B. washoensis*, *B. graminii*, *B. clarridgeiae*, *B. koehlerae* and *B. alsatica* were

recently identified as responsible for a few cases of human infections [5-10]. Cat scratch disease (CSD), hepatic peliosis and some cases of bacteraemia and endocarditis are directly caused by some species of the genus *Bartonella* [11-14]. To determine the real incidence of *Bartonella* infections, we must study the seroprevalence in the general population and the principal reservoirs and vectors of infection transmission. The results yielded by different studies on seroprevalence vary depending on the type of population under study; thus, the research conducted on collective groups that present special characteristics or associated risk factors present a higher prevalence than that found in studies carried out on the normal population.

In patients with addiction to parenteral drugs, it ranged from 15% to 47.5% [15,16]; in patients with HIV infection, it varied between 17.3% and 40% [17,18]. The objective of this study was to evaluate the prevalence of *Bartonella* infections in patients with HIV in our catchment area and to assess related factors.

Methods

Geographical area

The study was undertaken in Vallès Occidental (Catalonia), a predominantly urban area near the coast in the northeast of Spain.

Samples

The collection of samples took place over a 10-month period, from October 2004 to July 2005. The sample included adults and children treated at Hospital de Sabadell (Vallès Occidental, an area near Barcelona, Spain), where most of the patients diagnosed with HIV from the region are treated (catchment area 407.763 inhabitants). They were attended in periodical CD4 follow-up. Serum samples were collected from these patients at their scheduled follow up visits. The residential area was determined considering the number of inhabitants who lived in the municipalities. In fact, municipalities with < 50.000 inhabitants were considered semirural areas, and >50.000 were regarded as urban areas. Demographic information was obtained from computerized clinic record. Information about alcoholism, drug use, CD4 levels, HCV and HBV serology, was available from computerized records for patients who regularly received care at the clinic and was obtained by chart review for some patients. Informed consent was obtained from adult participants and from the parents of minors.

Serological technique

The sample of heparinized blood was sedimented (centrifugation of 5 ml samples of blood at 1.500 rpm for 10 minutes), and the supernatant was collected and stored at -80°C until used. Human serum samples were evaluated

by indirect immunofluorescence assay (IFA). We used commercial slides (*Bartonella* IFA IgG. Focus Technologies, Inc., Herndon, VA) to determine antibodies to *Bartonella* spp. The kit for detecting IgG antibodies that employees Vero cells infected with either *B. henselae* or *B. quintana* was used according to the manufacturer's instructions. The serum samples were initially diluted 1/64. Any serum samples found to be positive at the initial dilution were further titrated. Positive and negative controls were included in each test. We considered specimens showing no fluorescence at IgG titers of 1/64 as negatives and specimens with bright fluorescence in a dilution of 1/64 or greater as positive. The intensity of each specific fluorescent test was subjectively evaluated and independently graded by two of the authors [19].

Data analysis

Statistical analysis was performed using statistical package SPSS for Windows, Release 13.0.1 (standard version; SPSS, Inc., Chicago, IL). Significance levels for univariate statistical test were determined by the Mann-Whitney U test, χ^2 test and Fisher exact test. A *p* value of 0.05 or less was considered to be significant in all statistical tests used.

Results

Of the 340 subjects, 82 (24.1%) were women and 258 (75.9%) men. Mean age was 42.21 ± 10.35 years (range 16–86 years). One hundred and ninety four (57%) and 146 (43%) patients lived in urban and semirural-rural areas, respectively. One hundred and ninety-six (57.6%) patients consumed or had consumed intravenous drugs, whilst 97 (28.5%) presented an excessive intake of alcohol. 13.8% of patients presented CD4 levels below or equal to 200 cell/ml at the time of the study. Of all the patients being followed-up, 102 (30%) had been diagnosed with AIDS. 50% of the patients were infected with the hepatitis C virus, whereas only 5% was infected with the hepatitis B virus (Table 1). None of the patients enrolled in this study presented neither a past history of diseases caused by exposure to *Bartonella* spp nor bartonellosis symptoms. Antibodies to *Bartonella* species were highly prevalent in this group of HIV patients; 76 (22.3%) of the samples reacted with at least 1 *Bartonella* antigen, 32 (42.1%) of the positive samples reacted with only *B. henselae* antigen, one sample (1.3%) reacted with only *B. quintana*, and 43 (56.6%) with both. In 34 serum samples, the titers obtained did not allow for differentiation between the 2 *Bartonella* species, as the specimens presented the same titer or one dilution as difference only. In the 9 remaining serum samples, the titers obtained for *B. henselae* were clearly superior (2 or more dilutions as difference) (Table 2). Fifty-seven patients (75%) were positive at a titer of 1/64, 10 (13.1%) at 1/128, 5 (6.6%) at 1/256, 2 patients (2.6%) at 1/512 and 2 patients (2.6%) were positive at a titer of 1/1024. The antibody titer was

Table 1: HIV patients description and serologic results

Characteristic	N total (%) (340 patients)	Positive to <i>Bartonella</i> N (%) (76 patients)	Negative to <i>Bartonella</i> N (%) (264 patients)	P-value
Sex				0.611
Female	82 (24.1)	20 (26.3)	62 (24.4)	
Male	258 (75.9)	56 (73.7)	202 (78.3)	
Immunitary state				0.368
≤ 200 cell/ml	47 (13.8)	7 (9.2)	40 (15.2)	
> 200 cell/ml	293 (86.2)	69 (90.8)	224 (84.8)	
AIDS ¹				0.820
Yes	102 (30)	22 (28.9)	80 (30.3)	
No	238 (70)	54 (71.1)	189 (69.7)	
Drugs abuse				0.401
Yes	196 (57.6)	47 (61.8)	149 (56.4)	
No	144 (42.4)	29 (38.2)	115 (43.6)	
Alcohol				0.704
Yes	97 (28.5)	23 (30.2)	74 (28.0)	
No	243 (71.5)	53 (69.7)	190 (72)	
HBV ^{2,3}	17 (5)	3 (3.94)	14 (5.3)	0.449
HCV⁴	170 (50)	39 (51.3)	37 (48.7)	0.795
Municipality (inhab)				0.667
>50000	194 (57.0)	45 (59.2)	149 (56.4)	
<50000	146 (43.0)	31 (40.8)	115 (43.6)	
Transmission group				0.390
Heterosexual	62 (18.2)	11 (14.5)	51 (19.3)	
Homosexual	15 (4.4)	1 (1.3)	14 (5.3)	
IDU ⁵	194 (57.1)	47 (61.8)	147 (55.7)	
Bisexual	5 (1.5)	2 (2.6)	3 (1.1)	
Vertical	3 (0.9)	0 (0)	3 (0.9)	
Unknown	61 (18)	15 (19.7)	46 (17.4)	

1: AIDS criteria: Centers for Disease Control and Prevention (CDC) category C; 2: Hepatitis B virus infection; 3: Fisher Exact test; 4: Hepatitis C virus infection ; 5: Injection drug user.

specific for *B. quintana* in one case only, with a titer of 1/128.

24.4% of women and 21.7% of men presented antibodies to *Bartonella* spp. A statistically significant increase of seropositivity against *Bartonella* spp. was observed as patient age increased (p < 0.05). Twenty-three (30.2%) patients with positive serology for *Bartonella* presented a past history of alcohol abuse. Of the 76 patients with positive serology, 47 (61.8%) were addicted to parenteral drugs and 22 (28.9%) had, at some time, being diagnosed with AIDS. Thirty-nine patients presented co-infection

between *Bartonella* and HCV, whereas in 3 patients it was between *Bartonella* and HBV. No differences were found regarding the way of transmission of the human immunodeficiency syndrome.

Discussion

Preliminary estimates of the prevalence of antibody to *Bartonella* among apparently healthy humans range from 5.88% to 24.7% [17,20]. In a study carried out on a healthy population sample from the same area (83 were men and 78 women, and the mean age with positive serology was 45.18 ± 14.26 years), the seroprevalence was 10.6% [21], a figure that is very similar to that reported in other studies. The incidence of *Bartonella*-associated disease among HIV- infected people is less known. The studies carried out show seroprevalence rates that range from 16 to 40% [18,22].

Epidemiological studies identified the major risk factors for acquiring *Bartonella* infections. *B. quintana* infection is associated with exposure to the human body louse, *Pediculus humanus* [13,23], and homeless conditions [23,24], whereas the major risk factor associated with *B. henselae* infection is cat exposure, especially cat scratches and fleas

Table 2: Pattern of IgG antibody titers to *B. henselae* and *B. quintana* in the study population (N= 340)

<i>B. henselae</i> titers	<i>B. quintana</i> titers			
	<1/64	1/64	1/128	1/256
<1/64	264	0	1	0
1/64	28	29	0	0
1/128	4	6	0	0
1/256	1	5	0	0
1/512	0	1	1	0
1/1024	0	0	1	1

[13,25-27]. *B. henselae* seroprevalence in cats in our area was 29.6%, this result confirmed the presence of infection in the main reservoir of this microorganism [28].

B. henselae infection, as in other infections caused by fastidious bacteria, gives rise for concern given the complexity of the diagnosis and the variety of presenting clinical pictures, mainly in HIV-infected patients [29]. In fact, coe-taneous BA lesions can be clinically indistinguishable from Kaposi's sarcoma, being differentiated by biopsy only. Hepatic disease caused by *Bartonella* can be indistinguishable from others infectious or malignant conditions that cause hypodense lesions demonstrable by abdominal CT [30]. All these factors make serology as a useful tool for the diagnosis of acute infections caused by *Bartonella* spp. However, it must be taken into account that there can be important limitations when dealing with HIV infected patients [31,32]. The serologic response in patients HIV with a good immunological status could be similar to that of the normal population, whereas possibly in situations of advanced immunodepression or in bacillary angiomatosis, the serologic response could show as a false negative [33].

Our study highlights in the first place an antibody seroprevalence of 22.4% to *Bartonella* species in HIV patients, which is superior to that observed in the healthy population [13,19,25], with the exception of that described in some other studies [25]. Some authors consider HIV patients as a risk group for *Bartonella* infection [34,35] (characteristic personal and hygienic habits); however, other authors do not consider this infection risk to be greater [20,34].

In our experience, a previous study carried out on a healthy population sample from the same area show a seropositive rate of 8.6% [21]. This study included 55 children and 161 adults (≥ 18 years). If children were not considered, the seroprevalence was 10.6%. In view of our HIV-infected patients, predominantly adult, seems to be higher, it could be considered HIV-infection as a risk factor.

Taking into account other studies, this difference among populations might be due to the fact that in HIV patients the infection can last longer or that these patients might become in contact more easily with some of the factors that have a direct impact on increased *Bartonella* infection, such as contact with cats (main reservoir of *B. henselae*) [16,17,24] or that they spend most of their time on the street [24,34]. However, these informations are not available in our study. We could attribute the high rate of seropositivity observed to false positives that are not directly due to HIV infection (to date no crossed- reactions have been observed between both); however, there are studies

describing crossed reactions with *Coxiella burnetii* [32,35]. On the other hand, other studies suggest that HIV-infected patients present a higher risk of Q fever than immunocompetent patients [36]. The different factors that might play an important role in the transmission of *Bartonella* spp must also be taken into account. 57.6% of seropositive patients were intravenous drug users, these findings are most likely a result of several conditions that are frequent among IVDUs: living conditions with a high probability of close contact with bacteriaemic cats, fleas, lice, and other potential vectors, repeated parenteral exposures, insufficient medical care, and malnutrition [19,33,34,37]. Other studies do not conclude that drug use might play such an important role [20].

An excessive consumption of alcohol constitutes an elevated risk factor for infection, not only for its capacity to physiologically deteriorate regular alcohol abusers (liver alterations, neurological disorders, etc.), but because in the majority of cases drinking can affect people at low socioeconomic levels (homeless) who might be in closer contact with infection-transmitting vectors [38,39].

Of special interest in these patients was to find out whether the risk for infection increased with immunodepression. In our experience, we were unable to detect a greater incidence among patients who had been diagnosed with AIDS at some given time. In like manner, we were also unable to detect a greater infection incidence in patients with levels < 200 lymphocytes CD4/ μ l, in contrast with what has been reported by some authors who claim that the prevalence of antibodies against *B. henselae* is inversely proportional to the number of CD4 lymphocytes [30,35].

Our study presented only a 13.8% of patients with low CD4 levels, which could significantly alter our results. If we take into account that HIV-induced immunodepression does not appear to significantly modify the serological response to *Bartonella* spp., serology could be useful in the diagnosis of diseases associated with these microorganisms in HIV-infected patients (acute infection and population-based epidemiological studies). PCR techniques might be of help to diagnose *Bartonella* infection in patients who are more immunodepressed, especially when the infection is subclinical. *Bartonella* infections are substantially underrecognized because of their non-specific symptomatology.

Conclusion

In conclusion, the seroprevalence of *Bartonella* spp. among HIV infected patients is greater than that of the healthy population of the same area and thus *Bartonella* infection should be considered in HIV patients.

Competing interests

Immaculada Pons, Isabel Sanfeliu, María Mercedes Nogueras, Montserrat Sala, Manuel Cervantes, M José Amengual and Ferran Segura : The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

IP carried out the analysis and interpretation of data, serological technique and the preparation and revision of manuscript.

IS participated in the study concept and design, serological technique and revision of manuscript.

MMN participated in the analysis of data and revision of manuscript.

MS participated in acquisition of epidemiological and clinical data.

MC participated in acquisition of epidemiological and clinical data.

MJA participated in the acquisition of data from laboratory.

FS participated in the study concept and design, and revision of manuscript.

Acknowledgements

We acknowledge to Jordi Real for his advice on biostatistics, Gemma Navarro who help us to acquisition information of patients and Anna Veraguas who submitted samples to us for serological technique.

Financial support- This work was supported by a FIS-0/0598 grant from "Fondo de Investigaciones Sanitarias" (Health Research Fund), Madrid (Spain) and supported in part by "Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI-CO3/14)" (Spanish Network for Research in Infectious Pathology) and "Red Española de Investigación en SIDA (RIS-G03/173)" (Spanish AIDS Research Network).

References

- Stoler MH, Bonfiglio TA, Steigbigel RT, Pereira M: **An atypical subcutaneous infection associated with acquired immune deficiency syndrome.** *Am J Clin Pathol* 1983, **80**:714-718.
- Alsmark CM, Frank AC, Karlberg EO, Legault BA, Ardell DH, Canback B, Eriksson AS, Naslund AK, Handley SA, Huvet M, La Scola B, Holmberg M, Andersson SG: **The louse-borne human pathogen *Bartonella quintana* is a genomic derivative of the zoonotic agent *Bartonella henselae*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:9716-9721.
- Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB: **Cat scratch disease and other zoonotic *Bartonella* infections.** *J Am Vet Med Assoc* 2004, **224**:1270-1279.
- Comer JA, Paddock CD, Childs JE: **Urban zoonoses caused by *Bartonella*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, and *Rickettsia* species.** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2001:91-118.
- Kosoy M, Murray M, Gilmore RD, Bai Y, Gage KL: ***Bartonella* strains from ground squirrels are identical to *Bartonella washoensis* isolated from a human patient.** *J Clin Microbiology* 2003, **41**:645-650.
- Johnson G, Ayers M, McClure SC, Richardson SE, Tellier R: **Detection and identification of *Bartonella* species pathogenic for humans by PCR amplification targeting the riboflavin synthase gene (*ribC*).** *J Clin Microbiol* 2003, **41**:1069-1072.
- Kerkhoff FT, Bermans AMC, Zee A Van der, Rothova A: **Demonstration of *Bartonella grahamii* DNA in ocular fluids of a patient with neuroretinitis.** *J Clin Microbiol* 1999, **37**:4034-4038.
- Mansueto P, Di Lorenzo G, Rizzo M, Mazzola G, Affronti M, Battista Rini G, Mansueto S: **Bartonellosis.** *Recenti Prog Med* 2003, **94**:177-185.
- Avidor B, Graidy M, Efrat G, Leibowitz C, Shapira G, Schattner A, Zimhony O, Giladi M: ***Bartonella koehlerae*, a new cat-associated agent of culture negative human endocarditis.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**:3462-3468.
- Raoult D, Roblot F, Rolain JM, Besnier JM, Loulergue J, Bastides F, Choutet P: **First isolation of *Bartonella alsatica* from a valve of a patient with endocarditis.** *J Clin Microbiol* 2004, **44**:278-9.
- Aguirrebengoa K, Benito JR, Montejo M, Bereciartua E, Perez-Irezabal J, Gonzalez-Zarate P: **Enfermedad por arañazo de gato: serie de 14 casos. Utilidad diagnóstica de la serología.** *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1999, **17**:15-18.
- Chomel BB: **Cat-Scratch disease and bacillary angiomatosis.** *Rev Sci Tech* 1999, **15**(3):1061-1073.
- Brouqui P, Lascola B, Roux V, Raoult D: **Chronic *Bartonella quintana* bacteremia in homeless patients.** *N Eng J Med* 1999, **340**:184-189.
- Raoult D, Fournier PE, Drancourt M, Marrie J, Etienne J, Cosserrat J, Cacoub P, Poinignon Y, Leclercq P, Sefton AM: **Diagnosis of 22 new cases of *Bartonella* endocarditis.** *Annals of Internal Medicine* 1996, **125**:646-652.
- Ramos JA, Vargas J, Fernandez-Rivera J, Macías J, Mira JA, Pineda JA: **Prevalencia de seropositividad para *Bartonella* spp. en pacientes adictos a drogas por vía parenteral infectados y no infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana.** *Med Clin* 2002, **119**:565-567.
- Comer JA, Diaz T, Vlahov D, Monterroso E, Childs J: **Evidence of rodent-associated *Bartonella* and *Rickettsia* infections among intravenous drugs users from Central and East Harlem, New York city.** *Am J Trop Med Hyg* 2001, **65**(6):855-860.
- Blanco JR, Oteo JA, Martínez V, Ramalle E, García A, Ibarra V: **Seroepidemiología de la infección por *Bartonella henselae* en pacientes infectados por el VIH.** *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1999, **17**:434-438.
- Pape M, Kollaras P, Mandraveli K, Tsona A, Metallidis S, Nikolaidis P, Pederson NC, Koehler JE: **Occurrence of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* among human immunodeficiency Virus-infected patients.** *Ann NY Acad Sci* 2005, **1063**:299-301.
- Zbinden R, Michael N, Sekulovski A, Graevenitz A, Nadal D: **Evaluation of commercial slides for detection of immunoglobulin G against *Bartonella henselae* by indirect immunofluorescence.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997, **16**:648-652.
- García-García JA, Baquerizo R, Vargas J, Mira JA, Merchante N, Macías J, Pineda JA: **Prevalencia de anticuerpos séricos frente a *Bartonella* spp. En una población sana del área sur de la provincia de Sevilla.** *Rev Clin Esp* 2005, **205**:541-544.
- Pons I, Sanfeliu I, Cardeñosa N, Nogueras MM, Font B, Segura F: **Serological evidence of *Bartonella henselae* infection in healthy people in Catalonia, Spain.** *Epidemiol Infect* 2008, **25**:1-5.
- Yousif A, Farid I, Baig B, Crek J, Olson P, Wallace M: **Prevalence of *Bartonella* antibodies among human immunodeficiency virus infected from Bahrain.** *Clin Infect Dis* 1997, **23**:398-9.
- Koehler JE, Sanchez MA, Garrido CS, Whitfield MJ, Chen FM, Berger TG, Rodriguez-Barradas MC, Le Boit PE, Tappero JW: **Molecular epidemiology of *Bartonella* infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis.** *N Engl J Med* 1997, **337**:1876-1883.
- Guibal F, La Salmonière P, Rybojad M, Hadjrabia S, Dehen L, Arlet G: **High seroprevalence to *Bartonella quintana* in homeless patients with cutaneous parasitic infections in downtown Paris.** *J Am Acad Dermatol* 2001, **44**:219-223.
- Koehler JE, Glaser CA, Tappero JW: ***Rochalimaea henselae* infection. A new zoonosis with domestic cat as reservoir.** *JAMA* 1994, **271**:531-535.
- Chomel BB, Pederson NC, Koehler JE, Abbott JG, Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, Kass PH, Glasser CA: ***Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California: risk factors and associa-**

- tion between bacteremia and antibody titers. *J Clin Microbiol* 1995, **33**:2445-2450.
27. Tappero JW, Mohle-Boetani J, Koehler JE, Swaminathan B, Berger TG, LeBoit PE, Smith LL, Wenger JD, Pinner RW, Kemper CA, Reingold AL: **The epidemiology of bacillary angiomatosis and bacillary peliosis.** *JAMA* 1995, **269**:770-775.
 28. Pons I, Sanfeliu I, Quesada M, Anton E, Sampere M, Font B, Pla J, Segura F: **Prevalence of *Bartonella henselae* in domestic cats in Catalonia, Spain.** *Am J Trop Med Hyg* 2005, **72**:453-457.
 29. Sala M, Font B, Sanfeliu I, Quesada M, Pons I, Segura F: **Bacillary angiomatosis caused by *Bartonella quintana*.** *Ann N Y Acad Sci* 2005:302-7.
 30. Regnery RL, Childs JE, Koehler J: **Infections associated with *Bartonella* species in persons infected with human immunodeficiency virus.** *Clin Infect Dis* 1995, **21**(Suppl 1):S24-S28.
 31. Zangwill KM, Hamilton DH, Perkins BA, Regnery RL, Plikaytis BD, Hadler JL: **Cat Scratch disease in Connecticut epidemiology, risk factors, and evaluation of a new diagnostic test.** *N Engl J Med* 1992, **329**:8-13.
 32. Dalton MJ, Robinson LE, Cooper J, Regnery RL, Olson JG, Childs JE: **Use of *Bartonella* antigens for serologic diagnosis of cat-scratch disease at a National Referral Center.** *Arch intern Med* 1995, **155**:1670-1676.
 33. García-García JA, Vargas J, Mira JA, Vergara-Lopez S, Macías J, Pineda JA: **Dinamica de anticuerpos IgG frente a *Bartonella* spp. En la enfermedad por arañazo de gato y en pacientes asintomáticos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana.** *Med Clin* 2003, **120**:949-5.
 34. Blanco JR, Orteo JA, Martínez V, Ramalle E, García A, Ibarra V: **Seroepidemiología de la infección por *Bartonella henselae* en un colectivo de riesgo.** *Rev Clin Español* 1998, **1198**:805-809.
 35. Comer JA, Flynn C, Russell L, Regnery RL, Vlahov D, Childs JE: **Antibodies to *Bartonella* Species in Inner-city intravenous drugs users in Baltimore.** *Arch Intern Med* 1996, **156**:2491-2495.
 36. Raoult D, Levy PY, Dupont HT, Chicheportiche C, Tamalet C, Gastaut JA, Salducci J: **Q fever and HIV infection.** *AIDS* 1993, **7**:81-86.
 37. Zupan S, Poljak M, Avsic-Zupanc T: **Prevalence of *Bartonella* infections in Slovenian intravenous drugs users.** *Ann N Y Acad Sci* 2003, **990**:414-418.
 38. Jackson La, Spach DH, Kippen DA, Sugg NK, Regnery RL, Sayers MH, Stamm WE: **Seroprevalence to *Bartonella quintana* among patients at a community clinic in Downtown Seattle.** *J Infect Dis* 1996, **173**:1023-26.
 39. Koehler JE, Sanchez MA, Tye S, Garrido-Rowland CS, Chen FM, Maurer T, Rodriguez-Barradas MC, Le Boit PE, Tappero JW: **Prevalence of *Bartonella* infection among human immunodeficiency virus infected patients with fever.** *Clin Infect Dis* 2003, **37**:559-66.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:

<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/8/58/prepub>

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:

http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



RESULTATS I DISCUSSIÓ

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

La infecció per *Bartonella henselae* és cada vegada més freqüent. A més d'un augment en el nombre de les formes clíniques més habituals com la malaltia per esgarrapada de gat, també s'ha incrementat el diagnòstic d'altres patologies fins ara menys freqüents com l'angiomatosi bacil·lar en pacients portadors del VIH, bacterièmies o endocarditis. (Chomel et al, 2000; Piemont et al, 2001)

La millora de les tècniques diagnòstiques fetes aquests últims anys, principalment de la PCR, ha donat una eina diagnòstica més ràpida i eficient, doncs es poden detectar els patògens directament sobre la mostra biològica. Aquesta tècnica és més sensible i més ràpida que el cultiu convencional que necessita d'un llarg període d'incubació.

La millor manera de fer el diagnòstic d'infecció per *Bartonella* sp. és realitzant totes les proves possibles, però fins el moment, la determinació d'anticossos continua sent la prova més freqüent per al diagnòstic d'infecció per *Bartonella* sp. (Sander et al, 1999).

Al llarg dels últims anys hem vist com augmentaven progressivament el nombre de pacients que passen per l'hospital amb patologies compatibles amb una infecció per *Bartonella* sp.; 45 d'aquests varen ser diagnosticats per tècniques serològiques d'infecció per *Bartonella* sp (Sanfeliu et al, 2009 annex 2).

Per poder tenir un millor coneixement d'aquestes malalties vàrem planificar diferents estudis. En primer lloc, vàrem pensar que calia conèixer la seroprevalença de *Bartonella henselae* a la població sana de la nostra àrea, això ens donaria una idea aproximada de la incidència de *Bartonella henselae* al nostre entorn. En segon lloc, vam creure interessant

fer el mateix treball en una població que presentava unes característiques d'immunitat diferents (pacients portadors del VIH), per tal de veure si obteníem resultats similars o podíem trobar-hi diferències. Per últim, volíem determinar el nivell d'infecció per *B. henselae* que tenien els gats, que són la principal reservori i font de contagi.

Per determinar el nombre total de persones sanes que havíem d'estudiar vàrem agafar una mostra representativa de la població de referència, tenint en compte la edat i el lloc de residència la mostra calculada va ser de 218 persones. Eren pacients que venien a l'hospital, per motius variats, cirurgia menor als adults o visites a urgències per patologia no infecciosa als nens; en cap cas presentaven cap manifestació clínica compatible amb aquesta malaltia. Vam controlar 218 persones (119 homes i 99 dones), amb una edat mitjana de 34.36 anys. Un 66.51% provenien de poblacions urbanes (>50000 Hab.), 27.2% en poblacions semirurals i un 6.5% en poblacions rurals (<5000 Hab.).

Si considerem com a positius els títols $\geq 1/64$, la seroprevalença de *B. henselae* obtinguda en persones sanes va ser del 8.7%. Les determinacions serològiques de *Bartonella* sp. solen presentar reaccions creuades entre espècies, principalment entre *B. henselae* i *B. quintana*; per tal de poder diferenciar la positivitat vam considerar com a positives per a *B. henselae* aquelles mostres amb anticossos només contra *B. henselae* o aquelles amb els títols de *B. henselae* que superaven dues vegades els de *B. quintana*. Cal dir que en cap cas vàrem tenir reacció positiva només enfront *B. quintana*.

Aquesta seroprevalença és menor que la referenciada per altres investigadors europeus; un 30% a Alemanya (Sander et al, 1998), un 19.8% a Grècia (Alexiou-Daniel et al, 2000), un 21.6% a Creta (Minadakis et al;2008) o un 24.7% a un estudi fet a Sevilla (García-García et al, 2005). Mentre que

és similar als trobats a Suècia (3.2%) o a la Rioja (5.88%) (McGill et al, 2005; Blanco et al, 1998).

S'han de tenir en compte també, les reaccions creuades amb altres microorganismes com *Chlamydomphila pneumoniae* o *Coxiella burnetti*, descrites a la bibliografia i que ens podrien donar lloc a falsos diagnòstics (Maurin et al, 1997; La Scola et al, 1996). A totes les mostres es va realitzar serologia per *Chlamydomphila pneumoniae* i només 8 sèrums van presentar reacció creuada. Només 2 pacients tenien un títol superior per a *C. pneumophila* (fals positiu de *Bartonella* sp.) pel que la seroprevalença podria oscil·lar entre un 6.42% i un 7.90%.

De les 19 mostres positives, 10 tenien un títol de 1/64, 4 de 1/128, 4 de 1/256 i només un era de 1/512. El fet que la majoria de títols trobats a la població sana siguin baixos, de 1/64, ens determina el punt de tall que necessitem per fer un diagnòstic serològic d'infecció aguda. Així, actualment s'agafa com a títol diagnòstic 1/128 o superior. Es recomana repetir una segona determinació per poder veure la seroconversió o l'augment del títol.

Si fem una anàlisi de la resta de paràmetres estudiats, veiem que no hi ha diferències entre sexes; els homes tenien una positivitat del 52.6%, enfront el 47.4% de les dones.

El lloc de residència (urbanes, semi-urbanes o rurals) tampoc mostra diferències estadísticament significatives, encara que els valors de positivitat van passar d'un 8.2% al medi urbà a un 11.9% al medi semi-urbà.

L'estudi fet a Sevilla que presenta una seropositivitat més elevada (24.7%) podria tenir com a factor de risc el que la seva població tenia com a lloc de residència una zona més rural i, per tant, tenia més contacte amb el camp,

els animals e, indirectament, més contacte amb els reservoris o amb els vectors de la malaltia.

Un dels factors que alguns autors consideren com a factor de risc és l'edat. En l'estudi vam fer una distribució d'edats en 5 grups: de 0-14, de 15-29, 30-44, 45-64 i majors de 65 anys. La edat mitja de les persones amb anticossos va ser de 42.83 ± 17.04 , mentre que la del seronegatiu va ser de 33.59 ± 23.56 anys ($p=0.053$).

Només en 2 grups d'edat estudiats vam trobar diferències estadísticament significatives; per una banda el grup de 30-44 anys tenien una seroprevalença d'anticossos més alta amb 8/44 positius (42%) ($P=0.042$), mentre que el grup de 0-14 anys només presentava una seroprevalença del 5.3% ($P=0.046$). Aquest últim resultat no es correlaciona amb altres estudis fets, on la seroprevalença en aquesta edat és més alta (sense arribar a tenir significació estadística). Es planteja que els nens acostumen a tenir més relació amb els animals, més jocs i per tant, tenen més risc d'esgarrapades o mossegades. Per poder explicar els nostres resultats hauríem de tenir en compte que el nostre grup d'edat de 0-14 tenia un elevat percentatge de nens menors de 2 anys (nens petits amb poc contacte amb animals), el que podria haver condicionat una desviació dels resultats. El que si documenten altres estudis, són títols d'anticossos més alts en aquest grup d'edat (diferències significatives), com si es detectessin infeccions més recents (més o menys subclíniques) (Alexiou-Daniel et al, 2000).

Si observem els pacients que hem diagnosticat en el nostre hospital, 25 (55.5%) eren nens menors de 14 anys (edat mitja de 6.9 anys); aquesta dada és comparable amb els diferents estudis on troben un nombre més alt d'anticossos a la població infantil. La resta de pacients eren adults amb una mitjana de 36.4 anys, que concorda amb la franja d'edat de 30 a 44 anys, on vàrem obtenir una taxa de seroprevalença més alta.

Les diferents professions que desenvolupen les persones de l'estudi no van presentar cap diferència estadísticament significativa, potser perquè hi havia una gran varietat de professions (administratius, mecànics, comerç, etc.) i a més teníem poc nombre d'individus a cada una d'elles, la qual cosa ens va fer difícil la interpretació dels resultats. El que es documenta en els diferents treballs publicats és que les feines que semblen tenir un risc més alt de contraure la infecció per *Bartonella henselae* són totes aquelles relacionades directament o indirectament amb el reservori; així tenen un risc més gran els veterinaris i els treballadors del camp (Minadakis et al, 2008).

El factor de risc més important per la infecció de *B. henselae* és el contacte amb animals domèstics, principalment el gat que es el reservori principal de *B. henselae* i també les puces (Billeter et al, 2008). En el nostre treball, de les 218 persones estudiades, trenta cinc tenien contacte amb animals domèstics i d'aquestes un 31.6% ($P=0.05$) eren positives. Aquest factor de risc es troba present en el 44.4% dels pacients del nostre hospital, en concret en un 36% en nens i en un 55% en adults (Sanfeliu et al, 2009 annex 2).

Si tenim en compte el factor de contacte amb animals (principalment gats) com a element important per al diagnòstic de la infecció per *Bartonella henselae*, seria bo conèixer la incidència que té a la nostra població felina. Per aquest motiu vam estudiar 115 gats provinents d'una clínica veterinària (15 dels qual es van desestimar per diferents motius, contaminats o positius per altres microorganismes). Vam obtenir 7 aïllaments de *Bartonella* sp. en gats.

En els gats també és important l'edat; esta àmpliament documentat que els gats menors de 1 any tenen una taxa d'infecció molt més elevada (Breitschwerdt et al, 2000; Koehler et al, 1994; Arvand et al, 2001). Nosaltres vam detectar 4 gats bacterièmics menors d'un any i si relacionem

aquests 4 gats positius amb el número total de gats menors d'un any, la prevalença ens augmenta fins el 12.1%. Aquesta prevalença és similar al 13% obtingut a Alemanya però inferior respecte el 53% trobat a França (Heller et al, 1997; Sander et al, 1997).

Aquestes diferències es deuen a diferents factors; el tipus de cultiu microbiològic que s'utilitza pot influir directament en l'aïllament d'aquest bacteri. S'ha comprovat que els medis acabats de fer no comercialitzats, on el suplement és la sang de conill, afavoreixen tant el creixement com l'aïllament de *Bartonella* sp. (Chomel et al, 1995). En el nostre estudi va ser impossible fer-nos els medis de cultiu ja que les mostres no arribaven d'una manera constant ni programada, a més de la dificultat que suposa trobar sang fresca de conill; per tant vam utilitzar un medi nutritiu amb un 5% de sang d'ovella (BioMérieux).

En l'estudi, totes les soques aïllades van ser *B. henselae*, encara que també es podrien haver aïllat altres espècies com *B. clarridgeiae*, tant en aïllament únic com en coinfecció (Marston et al, 1999; Chomel et al, 1999; Gurfield et al, 1997).

Un altre factor important que s'ha de tenir en compte és el factor climàtic; sembla que les altes temperatures i la humitat són elements que afavoreixen la infecció, aquests factors afecten directament el cicle biològic, incrementant la infestació per puces (Bergmans et al, 1997). També sembla incrementar la prevalença d'aquestes infeccions l'hàbitat de l'animal; així sembla que els animals de carrer presenten una taxa d'infecció més alta.

En el nostre estudi no es donava cap dels factors descrits anteriorment, un 87% eren gats domèstics, un 86% estaven sans i només un 17% estaven parasitats per puces. Això podria explicar la poca prevalença de bacterièmia per de *Bartonella* sp. que vam trobar.

En canvi, la seroprevalença del 29.6% detectada en gats, si que és comparable a altres països propers. A la literatura es descriuen seroprevalences del 8.5% a Alemanya, del 15% a Suïssa o d'un 56% a Holanda (Arvan et al, 2001; Glaus et al, 1997; Haimerl et al, 1999; Bergmans et al, 1997). Aquests valors poden augmentar fins a un 81%, si es selecciona prèviament la mostra de gats, amb alta infestació de puces i/o una bacterièmia del 70% (Chomel et al, 1999).

Encara que actualment la majoria de infeccions per *Bartonella* sp., es donen en nens i pacients immunocompetents, cada vegada observem més infeccions per *Bartonella* sp. en pacients immunodeprimits. Els pacients portadors del VIH, per les seves característiques immunològiques, són pacients més fràgils, que sovint responen de manera diferent a les infeccions; per tant, seria bo conèixer la incidència de *Bartonella henselae* en aquesta població.

Les infeccions per *B. henselae* en pacients portadors del VIH poden presentar una certa complexitat de diagnòstic. Les lesions cutànies de l'angiomatosi bacil·lar són clínicament indistingibles del sarcoma de Kaposi si no es fa una biòpsia. Les afectacions hepàtiques també són difícils de diferenciar d'altres si no es fan proves com la TAC abdominal (Regnery et al, 1995). En aquest cas la serologia sembla ser una de les proves diagnòstiques més fiables, però hem de tenir en compte que els pacients portadors del VIH, poden presentar una resposta immunològica similar a la de la població normal, tot i que a vegades una situació de immunodepressió avançada pot donar lloc a respostes negatives i per tant un fals negatiu (García-García et al, 2003)

Per poder determinar la incidència de *Bartonella henselae* en pacients portadors del VIH vam estudiar 340 pacients que controlem al nostre hospital des de l'octubre 2004 al juliol 2005. La mostra incloïa tant

pacients adults com nens del Vallès Occidental; el nombre de nens va ser baix ja que són pocs els nens portadors del VIH que són controlats.

Vam trobar una alta seroprevalença d'anticossos enfront *B. henselae* en aquests pacients portadors del VIH; 76 (22.3%) de les mostres testades eren positives com a mínim per a 1 antigen de *Bartonella* sp., 32 (42.1%) de les mostres només reaccionaven amb *B. henselae*, un pacient (1.3%) va ser positiu per *B. quintana* i 43(56.6%) eren positius als 2 antígens. Aquesta seroprevalença és molt similar a la trobada per altres autors que pot variar entre un 16 i un 40% (Pape et al, 2005; Yousif et al, 1997) i molt més alta si la comparem amb la població sana que presenta valors que van des d'un 5.88 a un 24.7% (Blanco et al, 1998; García-García et al, 2008). Si comparem els nostres resultats de seroprevalença de les dues poblacions, 22.3% en població HIV i el 10.6% en població sana (excloent nens en el cas de la població sana, per tal d'homogeneïtzar les 2 poblacions), aquestes presenten diferències estadísticament significatives ($p \leq 005$).

En trenta-quatre mostres, el valor dels títols obtinguts, no ens permetien diferenciar entre les dues espècies de *Bartonella* sp., ja que tenien títols iguals o amb només una dilució de diferència. En els 9 pacients restants els títols obtinguts per *B. henselae* eren clarament superiors (2 o més dilucions).

Dels setanta-sis pacients 57 (75%) tenien títols de 1/64, 10 (13.1%) de 1/128, 5 (6.6 %) de 1/256, 2 pacients (2.6%) de 1/512 i 2 tenien uns títols de 1/1024. El pacient que era positiu per *B. quintana* presentava un títol de 1/128. Encara que existeixen diferències entre les seroprevalences totals dels 2 grups de poblacions, els títol d'anticossos obtinguts són molt semblants, una majoria de pacients amb títols baixos. Dels 45 pacients diagnosticats durant aquests anys al nostre hospital, 5 (11.11%) eren portadors del VIH (Sanfeliu et al, 2009 annex 2).

Un d'aquests pacients va ser diagnosticat d'angiomatosi bacil·lar. Presentava febre, diarrea i presència de nòduls subcutanis. Els hemocultius i el cultiu bacteriològic convencional i per *Bartonella* de la biòpsia varen ser negatius, la determinació serològica va ser positiva amb un títol de 1/512. En la tinció de Warthin-Starry feta a la biòpsia es van poder observar cúmuls de bacils tenyits de negre compatibles amb *Bartonella* sp., però va ser la tècnica de PCR realitzada sobre material biopsiat i la posterior seqüenciació el que ens va permetre confirmar el diagnòstic d'infecció per *Bartonella quintana* (Sala et al, 2005).

Alguns autors consideren que els pacients portadors del VIH són pacients de risc per la infecció de *Bartonella* sp. ja que acostumen a tenir característiques personals o hàbits higiènics particulars (Blanco JR et al, 1998; Comer JA et al, 1996), mentre que altres no pensen que aquests factors faci incrementar el seu risc (García-García et al, 2008)

Tenint en compte altres estudis, la diferència entre els dos tipus de poblacions (sana i HIV), es podria deure a que els pacients portadors del VIH poden presentar una infecció durant més temps (Comer et al, 2001) o que aquests tinguin un contacte amb el reservori de la infecció més freqüent o continuat, doncs poden ser pacients que passen més temps al carrer (Guibal et al, 2001).

La alta seropositivitat que vam trobar la podríem atribuir a diferents elements. Es podria tractar de falsos positius degut a reaccions creuades amb altres microorganismes; hi ha estudis que descriuen reaccions creuades amb *Coxiella burnetii* (Dalton MJ et al 1995; Comer JA et al, 1996). Altres suggereixen que els pacients portadors del VIH presenten un risc més gran de patir febre Q que els pacients immunocompetents (Raoult et al, 1993).

De tots els elements estudiats, l'augment de edat va ser l'únic factor predictiu d'infecció per *Bartonella* amb significació estadística. Cap dels altres factors estudiats va presentar significació estadística, però pensem que poden tenir un paper important en la transmissió de *Bartonella sp.* i per tant també els hem de tenir en compte.

El 57.6% dels pacients seropositius eren o havien estat drogodependents. Aquest factor podria condicionar directament el seu model de vida, donant-se una alta probabilitat de contacte amb animals de carrer (gats bacterièmics, puces, polls i altres vectors potencials), punxades intravenoses contínues, insuficient atenció mèdica, desnutrició (Blanco et, 1998, Zupan et al, 2003).

Un consum elevat d'alcohol constitueix un factor de risc d'infecció, no només per la capacitat que té per deteriorar l'estat físic del pacient (alteracions en el fetge, trastorns neurològics, etc.), sinó perquè en la majoria de casos afecten a persones de baix nivell socioeconòmic (sense sostre) i per tant el contacte amb els vectors de la infecció són constants (Jackson et al, 1996; Koehler et al, 2003)

És important conèixer si el risc d'infecció augmenta amb la immunosupressió. En la nostra experiència, no vàrem detectar una major incidència entre els pacients que havien estat diagnosticats de SIDA en algun moment ni tampoc vam trobar una major incidència d'infecció en pacients amb nivells de CD4 inferiors a 200 cel/ml. Altres autors troben que la prevalença d'anticossos enfront *B. henselae* és inversament proporcional al nombre de limfòcits CD4 (Regnery et al, 1995, Comer Jet al, 1996).

Amb aquests estudi aportem l'evidència de que la infecció per *B. henselae* és freqüent a la nostra àrea i que sovint la infecció pot ser asimptomàtica.

CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONS

De l'estudi realitzat en la població sana es pot concloure que:

- 1-. La població humana sana estudiada presenta una seroprevalença davant de *Bartonella henselae* del 8.7%.
- 2-. Un 52.6% de la població sana positiva per *B. henselae* presenta; no obstant, títols baixos de 1/64.
- 3-. El 42% de les persones seropositives a *B. henselae* tenien entre 30 i 44 anys, mentre que els nens de 0 a 14 anys tenen la seroprevalença més baixa de tots els grups d'edat estudiats.
- 4-. No existeixen diferències estadísticament significatives entre sexes, lloc de residència o treball que realitzen.
- 5-. El contacte amb gats es un factor de risc per contraure infeccions per *B. henselae*.

De l'estudi realitzat en gats es pot concloure que:

- 6-. La població de gats estudiada presenta una taxa de bacterièmia per *Bartonella henselae* del 7%. Si tenim en compte només els gats menors d'un any aquesta incidència augmenta fins el 12.1%
- 7-. El cultiu microbiològic de mostres de sang de gat en medi sòlid (plaques d'agar sang) és un procediment eficient per a l'aïllament de *B. henselae*.
- 8-. Tots els gats amb cultiu microbiològic positiu presentaven anticossos enfront *Bartonella henselae* amb un títols superior o igual a 1/128.

- 9-. El 71.4% dels gats bacterièmics tenien contacte amb altres animals (gats o gossos).
- 10-. La seroprevalença de *B. henselae* en gats va ser del 29.6%.
- 11-. La Tècnica de PCR és una eina excel·lent per a la identificació de les diferents espècies de *Bartonella* i per a la detecció directa del microorganisme en mostres de biòpsia.

De l'estudi realitzat en la població portadora del VIH es pot concloure que:

- 12-. En la població portadora del Virus de la Immunodeficiència Humana (VIH) la seroprevalença davant *B. henselae* ha estat del 22.3%.
- 13-. El 75% dels pacients portadors del VIH amb serologia positiva tenien títols baixos de 1/64.
- 14-. Un 56.6% dels pacients presentaven reaccions creuades entre *B. henselae* i *B. quintana*.
- 15-. La presència d'anticossos enfront *Bartonella* sp. augmenta amb l'edat.

REFERÈNCIES

6. REFERÈNCIES

- Agan BK, Dolan MJ. Laboratory diagnosis of *Bartonella* infections. Clin. Lab. Med. 2002;22:937-962.
- Alexiou-Daniel AT, Arvanitidou M, Diza E, Antoniadis A. Occurrence of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* in healthy greek population. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2000;68:554-556.
- Anderson B, Sims K, Regnery R, Robinson L, Schmidt MJ, Goral S, Hager C, Edwards K. Detection of *Rochalimaea henselae* DNA in specimens from cat scratch disease patients by PCR. J. Clin. Microbiol. 1994;32:942-948.
- Arvan M, Klose AJ, Schwartz-porsche D, Hahn H and Wendt C. Genetic variability and prevalence of *Bartonella henselae* in cats in Berlin, Germany, and analysis of its genetics relatedness to a strain from Berlin that is pathogenic for humans. J. Clin. Microbiol. 2001;39:743-746.
- Arvand M, Schad SG. Isolation of *Bartonella henselae* DNA from the peripheral blood of a patient with cat scratch disease up to 4 months after the cat scratch injury. J. Clin. Microbiol. 2006;44:2288-2290.
- Azevedo ZM, Higa LY, Boechat MB, Klaplauch F. Cat-scratch disease caused by *Bartonella quintana* in an infant:an unusual presentation. Rev. Soc Bras. Med. Trop. 2000;33:313-317.
- Avidor B, Kletter Y, Abulafia S, Golan Y, Ephros M, Giladi M. Molecular diagnosis of cat scratch disease: a two-step approach. J. Clin. Microbiol. 1997;5:1924-1930.
- Avidor B, Graidy M, Efrat G, Leibowitz C, Shapira G, Schattner A, Zimhony O, Giladi M. *Bartonella koehlerae*, a new cat-associated agent of culture-negative human endocarditis. J. Clin. Microbiol. 2004;42:3462-3468.
- Batterman HJ, Peek JA, Loutit JS, Falkow S, Tompkins LS. *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* adherence to and entry into cultured human epithelial cells. Infect. Immunity. 1995;63:4553-4556.
- Blanco JR, Oteo JA, Martinez V, Ramalle E, Garcia A, Ibarra V. Seroepidemiología de la infección por *Bartonella henselae* en un colectivo de riesgo. Rev. Clin. Esp. 1998;12:805-809.
- Blanco JR, Raoult D. Infecciones por *Bartonella*. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2005;25:313-320.

- Barnes A, Bell SC, Isherwood DR, Bennett M, Carter SD. Evidence of *Bartonella henselae* infection in cats and dogs in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 2000;147:673-677.
- Barka NE, Hadfield T, Patnaik M, Schwartzman WA, Peter JB. EIA for detection of *Rochalimaea henselae*-reactive IgG, IgM, and IgA antibodies in patients with suspected cat-scratch disease. *J. Infect. Dis.* 1993;167:1503-1504.
- Bass JW, Vincent JM, Persons DA. The expanding spectrum of *Bartonella* infections: I. Bartonellosis and trench fever. *J. Pediatr. Infect. Dis.* 1997;16:2-10.
- Bergh K, Bevanger L, Hanssen I, Løseth K. Low prevalence of *Bartonella henselae* infections in Norwegian domestic and feral cats. *APMIS* 2002;110:309-314.
- Bergmans AMC, Groothedde JW, Schellekens JKP, van Embden JD, Ossewaarde JM, Schouls LM. Etiology of cat scratch disease: comparison of polymerase chain reaction detection of *Bartonella* (formerly *Rochalimaea*) and *Afipia felis* DNA with serology and skin tests. *J. Infect. Dis.* 1995;171:916-923.
- Bergmans AMC, Jong CMA, Amerongen G, Schot CS, Schouls LM. Prevalence of *Bartonella* species in domestic cats in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35:2256-2261.
- Bergmans AM, Peeters MF, Schellekens JF, Vos MC, Sabbe LJ, Ossewaarde JM, Verbakel H, Hooft HJ, Schouls LM. Pitfalls and fallacies of cat scratch disease serology: evaluation of *Bartonella henselae*-based indirect fluorescence assay and enzyme-linked immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 1997;35:1931-1937.
- Bermond D, Heller R, Barrat F, Delacour G, Dehio C, Alliot A, Monteil H, Chomel BB, Boulouis HL, Piemont Y. *Bartonella birlesii* sp. Nov., isolated from small mammals (*Apodemus* sp.). *Int. J. Sys. Evol. Microb.* 2000;50:1973-1979.
- Bermond D, Boulouis HJ, Heller R, Van Laere G, Monteil H, Chomel BB, Sander A, Dehio C, Pièmont Y. *Bartonella bovis*. sp. Nov. and *Bartonella capreoli* sp. Nov., isolated from european ruminants. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002;52:383-390.
- Billeter SA, Levy MG, Chomel BB, Breitschwerdt EB. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Med Vet. Entomol.* 2008;22:1-15.

Birtles RJ, Harrison TG, Saunders NA, Molyneux D, Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* com. 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.

Birtles RJ. Differentiation of *Bartonella* species using restriction endonuclease analysis of PCR amplified 16S rRNA GENES. Fems. Microbiol. Lett. 1995;129:261-266.

Birtles RJ, Raoult D. Comparison of partial citrate synthase gene (*gltA*) Sequences for phylogenetic analysis of *Bartonella* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 1996;46:891-897.

Boulouis HJ, Chomel BB, Les Bartonelloses, maladies infectieuses émergentes. Rev. Prat. 2004;54:1982-1986.

Blanco JR, Oteo JA, Martínez V, Ramalle E, Garcia A, Ibarra V. Seroepidemiología de la infección por *Bartonella henselae* en pacientes infectados por el VIH. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 1999;17:434-438.

Bogue CW, Wise JD, Gray GF, Edwards KM. Antibiotic therapy for scratch disease. JAMA 1989;262:813-816.

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.

Bouza E, Menasalvas A, Muñoz P, Vasallo J, Moreno MM, Garcia-Fernandez MA. Infective endocarditis. A prospective study at the end of the twentieth century. Medicine 2001;80:298-307.

Branley J, Wolfson C, Waters P, Gottlieb T, Bradbury R. Prevalence of *Bartonella henselae* bacteremia, the causative agent of cat scratch disease, in an Australian cat population. Pathology 1996;238:262-265.

Breitschwerdt EB, Kordick DL. *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. Clin. Microbiol Rev. 2000;13:428-438.

Breitschwerdt EB, Hegarty Bc, Magi R, Hawkins E, Dyer P. *Bartonella* species as a potential cause of epistaxis in dogs. J. Clin. Microbiol. 2005;43:2529-2533.

Breitschwerdt EB, Sontakke S, Cannedy A, Hancock SI, Bradley JM. Infection with *Bartonella weisii* and detection of *Nanobacterium* antigens in a North Carolina beef herd. J. Clin. Microbiol. 2001;39:879-882.

Breitschwerdt EB, Magg RC. A confusing case of canine vector-borne disease: clinical signs and progression in a dog co-infected with *Ehrlichia canis* and *Bartonella vinsoni* ssp. *berkhoffii*. Parasit. Vectors. 2009; 26-2 Suppl 1:S3.

Brenner J, O'Connor S, Winkler H, Steigerwalt A. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the familia *Bartonellaceae* from the order *Rickettsiales*. Int. J. Sys. Bacteriol. 1993;43:777-786.

Brenner SA, Rooney JA, Manzewitsch P, Regnery RL. Isolation of *Bartonella (Rochalimaea) henselae*: Effects of methods of blood collecting and handling. J. Clin. Microbiol. 1997;35:544-547.

Chamberlin J, Laughlin LW, Romero S, Solorzano N, Gordon S, Andre RG, Pachas P, Friedman H, Ponce C, Watts D. Epidemiology of endemic *Bartonella bacilliformis*: A prospective cohort study ion a peruvian mountain valley community. J. Infect. Dis. 2002;186:983-990.

Chang C, Chomel BB, Kasten RW, Heller R, Kocan KM, Ueno H, Yamamoto K, Bleich VC, Pierce BM, Gonzales BJ, Swiftt PK, Boyce WM, Jang SS, Boulouis HJ, Piemont Y. *Bartonella* sp. isolated from wild and domestic ruminants in North America. Emerg. Infec. Dis. 2000;6:306-310.

Chia JKS, Nakata MM, Lami JLM, Park SS, Ding JC. Azitromycin for the treatment of cat-scratch disease. Clin. Infect. Dis. 1998;26:193-194.

Childs JE, Rooney JL, Cooper JL, Olson JG, Regnery RL. Epidemiologic observations on infection with *Rochalimaea* species among cats living in Baltimore MD. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1994;204:1775-1778.

Chomel BB, Abbott RC, Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, Kass PH, Glaser CA, Pedersen NC, Koehler JE. *Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. J. Clin. Microbiol. 1995;33:2445-2450.

Chomel BB, Gurfield AN, Boulouis HJ, Kasten RW, Piemont Y. Réservoir félin de l'agent de la maladie des griffes du chat, *Bartonella henselae*, en région parisienne: résultats préliminaires. Rec. Méd. Vét. 1995;171:841-845.

Chomel BB., Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, Chi B, Yamamoto K, Roberts-Wilson J, Gurfield A, Abbott R, Pedersen NC, Koehler JE. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. J. Clin. Microbiol. 1996;34:1952-1956.

Chomel BB, Carlos ET, Kasten RW, Yamamoto K, Chang CC, Calos RS, Abenes MV, Pajares CM. *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* infection in domestic cats from Philippines. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1999;60:593-597.

Chomel BB. Cat-scratch disease. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2000;19:136-150.

Chomel BB, Boulouis HL; ,Petersen H, Kasten RW, Yamamoto K, Chang CC, Gandoin C, Bouillin C and Hew CM. Prevalence of *Bartonella* infection in domestic cats in Denmark. Vet. Res. 2002;33:205-213.

Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB. Cat scratch disease and other zoonotic *Bartonella* infections. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2004;224:1270-1279.

Chomel BB, Boulouis HJ. Zoonoses dues aux bactéries du genre *Bartonella*: nouveaux réservoirs? Nouveaux vecteurs?. Bull. Acad. Natle. Méd. 2005;3:465-480.

Chomel BB, Boulouis HJ, Maruyama S, Breitschwerdt EB. *Bartonella* sp. in pets and effect on human health. Emerg. Infect. Dis. 2006;12:389-394.

Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB, Kasten RW, Vayssier-Taussat M, Birtles RJ, Koehler JE, Dehio C. Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. Vet. Res. 2009;40:29.

Clarridge JE, Raich TJ, Pirwani D, Simon B, Tsai L, Rodriguez-Barradas MC, Regnsery R, Zollo A, Jones DC, Rambo C. Strategy tom detect and identify *Bartonella* species in a routine clinical laboratory yields *Bartonella henselae* from human immunodeficiency virus-positive patient and a unique *Bartonella* strain from his cat. J. Clin. Microbiol. 1995;33:2107-2113.

Comer JA, Flynn C, Russell L, Regnery RL, Vlahov D, Childs JE. Antibodies to *Bartonella* Species in Inner-city intravenous drugs users in Baltimore. Arch. Intern. Med. 1996;156:2491-2495.

Comer JA, Diaz T, Vlahov D, Monterroso E, Childs J. Evidence of rodent-associated *Bartonella* and *Rickettsia* infections among intravenous drugs users from Central and East Harlem, New York city. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2001;65:855-860.

Dalton MJ, Robinson LE, Cooper J, Regnery RL, Olson JG, Childs JE. Use of *Bartonella* antigens for serologic diagnosis of cat-scratch disease at a National Referral Center. Arch. Intern. Med. 1995;155:1670-1676.

- Daly JS, Worthington MG, Brenner DJ, Moss CW, Hollis DG, Weyant RS, Steigerwalt AG, Weaver RE, Daneshvar MI, O'Connor SP. *Rochalimaea elizabethae* sp. nov. isolated from patient with endocarditis. J. Clin. Microbiol. 1993;31:872-881.
- Debré R, Lamy M, Jammet ML, Costil L, Mozziconacci P. La maladie des griffes du chat. Soc. Méd. Hôp. Paris. 1950;66:76-79.
- Dehio C, Lanz C, Pohl R, Behrens P, Bermond D, Piémont Y, Pelz K, Sander A. *Bartonella schoenbuchii* sp. nov., isolated from the blood of wild roe deer. Int J. Syst. Evol. Microbiol. 2001;50:1557-1565.
- Dehio C. Molecular and cellular basis of *Bartonella* pathogenesis. Annu. Rev. Microbiol. 2004;58:365-390.
- Del Prete R, Fumarola D, Fumarola L, Basile V, Mosca A, Miragliotta G. Prevalence of antibodies to *Bartonella henselae* in patients with suspected cat scratch disease (CSD) in Italy. Eur. J. Epidemiol. 1999;15:583-587.
- Del Prete R, Fumarola D, Ungari S, Fumarola L, Miragliotta G. Polymerase chain reaction detection of *Bartonella henselae* bacteraemia in an immunocompetent child with cat-scratch disease. Eur. J. Pediatr. 2000;159:356-359.
- Dermers DM, Bass JW, Vincent JM, Person DA, Noyes DK, Staeger CM, Samlaska CP, Lockwood NH, Regnery RL, Anderson BE. Cat-scratch disease in Hawaii: Etiology and seroepidemiology. J. Pediatr. 1995;127:23-26.
- Dracourt M, Raoult D. Proposed test for the routine identification of *Rochalimaea* species. Eur J. Clin. Microbiol. Infect. 1993;12:710-713.
- Droz A, Chi B, Horn E, Steigerwalt A, Whitney AM, Brenner DJ, . *Bartonella koehlerae* sp. nov., isolated from cats. J. Clin. Microbiol. 1999;37:1117-1122.
- Fabbi M, De Giuli L, Tranquillo M, Bragoni R, Casiragli M and Genchi C. Prevalence of *Bartonella henselae* in Italian stray cats: Evaluation of serology to assess the risk of transmission of *Bartonella* to humans. J. Clin. Microbiol. 2004;42:264-268.
- Engvall EO, Fasth C, Brändström B, Fermér C, Blomqvist G, Englund L. Prevalence of *Bartonella* in young, healthy cats in Sweden. Veterinary Record 2003;152: 366-369.
- Eremeeva ME, Gerns HL, Lydy SL, Goo JS, Ryan E, Mathew SS, Ferraro MJ, Holden JM, Nicholson WL, Dasch GA, Koehler JE. Bacteremia, Fever, and

Splenomegaly Caused by a Newly Recognized *Bartonella* Species. N. Engl. J. Med. 2007;356:2381-2387.

Fenollar F, Sire S, Raoult D. *Bartonella vinsoni* subsp. *arupensis* as an agent of blood culture-negative endocarditis in a human. J. Clin. Microbiol. 2005;43:945-947.

Fournier PE, Lelievre H, Eykyn SJ, Mainardi JL, Marrie TJ, Brunel F. Epidemiologic and clinical characteristics of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* endocarditis: a study of 48 patients. Medicine 2001;80:245-251.

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) faeces. J. Med. Entomol. 1998;35:625-628.

Fournier PE, Taylor C, Rolain JM, Barrassi L, Smith G, Raoult D. *Bartonella australis* sp. nov. from kangaroos, Australia. Emerg. Infect. Dis. 2007;13:1961-1962.

García-García JA, Vargas J, Mira JA, Vergara-Lopez S, Macías J, Pineda J A. Dinámica de anticuerpos IgG frente a *Bartonella* sp. en la enfermedad por arañazo de gato y en pacientes asintomáticos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. Med. Clin. 2003;120:949-945.

García-García JA, Baquerizo R, Vargas J, Mira JA, Merchante N, Macías J, Pineda JA. Prevalencia de anticuerpos séricos frente a *Bartonella* sp. En una población sana del área sur de la provincia de Sevilla. Rev. Clin. Esp. 2005;205:541-544.

George TI, Manley G, Koehler JE, Hung VS, McDermott M, Bollen A. Detection of *Bartonella henselae* by polymerase chain reaction in brain tissue of an immunocompromised patient with multiple enhancing lesions. Case report and review of the literature. J. Neurosurg. 1998;89:640-644.

Glaus T, Hofmann-Lebmann R, Greene C, Glaus B, Wolfensberger C and Luitz H. Seroprevalence of *Bartonella henselae* infection and correlation with disease status in cats in Switzerland. J. Clin. Microbiol. 1997;35:2883-2885.

Guibal F, La Salmonière P, Rybojad M, Hadjrabia S, Dehen L, Arlet G. High seroprevalence to *Bartonella quintana* in homeless patients with cutaneous parasitic infections in downtown Paris. J. Am. Acad. Dermatol. 2001;44:219-223.

Gundi VA, Bourry O, Davous B, Raoult D, La Scola B. *Bartonella clarridgeiae* and *B. henselae* in dogs, Gabon. Emerg. Infect. Dis. 2004;10:2261-2262.

- Gundi VA, Davoust B, Khamis A, Boni M, Raoult D, La Scola B. Isolation of *Bartonella rattimassiliensis* sp. nov. and *Bartonella phoceensis* sp. nov. from European *Rattus norvegicus*. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42:3816-3818.
- Gurfield, A.N., H.J. Boulouis, B.B. Chomel, R. Heller, R.W. Kasten, K.Yamamoto and Y. Piemont. Coinfection with *Bartonella clarridgeiae* and *Bartonella henselae* and with different *Bartonella henselae* strains in domestic cats. *J.Clin.Microbiol.* 1997;35:2120-2123.
- Haimerl, M., A. M. Tenter, K. Simon, M. Rommel, J. Hinger, and I. B. Autenrieth. Seroprevalence of *Bartonella henselae* in cats in Germany. *J. Med. Microbiol.* 1999;48:849-856.
- Harrison TG, Doshi N. Serological evidence of *Bartonella*_sp. infection in the UK. *Epidemiol. Infect.* 1999;123:233-240.
- Heller R, Artois M, Xemar V, Briel D, Gehin H, Jaulhac B, Montiel H and Piemont Y. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in stray cats. *J. Clin. Microbiol.* 1997;35:1327-1331.
- Heller R, Riegel P, Hansmann Y, Delacour G, Bermond D, Dehio C, Lamarque F, Monteil H, Chomel BB, Piémont Y. *Bartonella tribocorum* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rats. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 1998;48:1333-1339.
- Heller R, Kubica M, Mariet P, Riegel P, Delacour G, Dehio C, Lamarque F, Kasten R, Boulouis HJ, Monteil H, Chomel BB, Piémont Y. *Bartonella alsatica* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rabbits. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 1999;49:283-288.
- Henn JB, VanHorn BA, Kasten RW, Kachani M, Chomel BB. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* antibodies in Moroccan dogs. *Am. Trop. Med. Hyg.* 2006;74:222-223.
- Hjelm E, McGill S, and G. Blomqvist. Prevalence of antibodies to *Bartonella henselae*, *B. elizabethae* and *B. quintana* in Swedish domestic cats. *Scand. J. Dis.* 2002;34:192-196.
- Hercík K, Hàsová V, Janecek J, Branny P. Molecular evidence of *Bartonella* DNA in Ixodid ticks in Czechia. *Folia. Microbiol.* 2007;52:503-509.
- Houpikian P, Raoult D. 16S/23S rRNA intergenic spacer regions for phylogenetic analysis, identification, and subtyping of *Bartonella* species. *J. Clin. Microbiol.* 2001;39:2768-2778.
- Jackson LA, Perkins BA, Wenger JD. Cat scratch disease in the United States: an analysis of three national database. *Am. J. Public. Health.* 1993;83:1707-1711.

Jackson LA, Spach DH, Kippen DA, Sugg NK, Regnery RL, Sayers MH, Stamm WE. Seroprevalence to *Bartonella quintana* among patients at a community clinic in Downtown Seattle. *J. Infect. Dis.* 1996;173:1023-1026.

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.

Just FT, Gilles J, Pradel I, Pfalzer S, Lengauer H, Hellmann K, Pfister K. Molecular evidence for *Bartonella* sp. in cat and dog fleas from Germany and France. *Zoonoses Public Health* 2008;55:514-520.

Kelly PJ; Eoghain GN, Raoult D. Antibodies reactive with *Bartonella henselae* and *Ehrlichia canis* in dogs from the communal lands of Zimbabwe. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 2004;75:116-120.

Kelly P, Rolain JM, Maggi R, Sontakke S, Keene B, Hunter S, Lepidi H, Breitschwerdt KT, Breitschwerdt EB. *Bartonella quintana* endocarditis in dogs. *Emerg. Infect. Dis.* 2006;12:1869-1872.

Klein JL, Nair SK, Harrison TG., Hunt I, Fry NK and Friedland JS. Prosthetic valve endocarditis caused by *Bartonella quintana*. *Emerg. Infect. Dis.* 2002;8:202-203.

Koehler JE, Quinn FD, Berger TG, LeBoit PE, Tappero JW. Isolation of *Rochalimaea* species from cutaneous and osseous lesions of bacillary angiomatosis. *N. Engl. J. Med.* 1992;327:1625-1631.

Koehler JE, Tappero JW. AIDS commentary: bacillary angiomatosis and bacillary peliosis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* 1993;17:612-624.

Koehler JE, Glaser CA, Tappero JW. *Rochalimaea henselae* infection. A new zoonosis with the domestic cat as reservoir. *JAMA.* 1994;271:531-535.

Koehler JE, Sanchez MA, Garrido CS, Whitfeld MJ, Chen FM, Berger TG, Rodriguez-Barradas MC, LeBoit PE, Tappero JW. Molecular epidemiology of *bartonella* infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis. *N. Engl. J. Med.* 1997;337:1916-1917.

Koehler JE, Sanchez MA, Tye S, Garrido-Rowland CS, Chen FM, Maurer T, Rodriguez-Barradas MC, Le Boit PE, Tappero JW. Prevalence of *Bartonella* infection among human immunodeficiency virus infected patients with fever. *Clin. Infect. Dis.* 2003;37:559-566.

Kosek M, Lavarello R, Gilman RH, Delgado J, Maguiña C, Verastegui M, Lescano AG, Mallqui V, Kosek JC, Recavarren S, Cabrera L. Natural history

of infection with *Bartonella bacilliformis* in nonendemic population. J. Infect. Dis. 2000;182:865-872.

Kordick DL, Hilyard EJ, Hadfiel TL, Wilson KH, Steigerwalt AG, Brenner DJ, Breitschwerdt EB. *Bartonella clarridgeiae*, a new recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease). J. Clin. Microbiol. 1997;35:1813-1818.

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;37:1536-1547.

Kosoy M, Murray M, Gilmore RD, Bai Y, Gage L. *Bartonella* strains from ground squirrels are identical to *Bartonella washoensis* isolated from a human patients. J. Clin. Microbiol. 2003;41:645-650.

Kosoy M, Morway C, Sheff KW, Colbon J, Chalcraft L, Dowell SF, Peruski LF, Maloney SA, Baggett H, Sutthirattana S, Sidhirat A, Mayurama S, Kabeya H, Chomel BB, Kasten R, Popov V, Robinson J, Kruglov A, Petersen LR. *Bartonella tamiae* sp. Nov a newly recognized pathogen isolated from three human patients from Thailand. J. Clin. Microbiol. 2008;46:772-775.

Kreisel D, Pasque MK, Damiano RJ, Medoff G, Kates A, Kreisel FH, and Lawton JS. *Bartonella* species-induced prosthetic valve endocarditis associated with rapid progression of valvular stenosis. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 2005;130:567-568.

La Scola B, Raoult D. Serological cross-reactions between *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae* and *Coxiella burnetii*. J. Clin. Microbiol. 1996;34:2270-2274.

La Scola B, Raoult D. Culture of *Bartonella quintana* and *B. henselae* from human samples: a 5 year experience (1993 to 1998). J. Clin. Microbiol. 1999;37:1899-1905.

La VD, Tran-Hung L, Aboudharam G, Raoult D, Drancourt M. *Bartonella quintana* in domestic cat. Emerg. Infect. Dis. 2005;11:1287-1289.

Larson AM, Dougherty MJ, Nowowiejski DJ, Welch DF, Matar GM, Swaminathan B, Colyle MB. Detection of *Bartonella (Rochalimeae) quintana* by routine acridine orange staining of broth blood cultures. J. Clin. Microbiol. 1994;6:1492-1496.

Lawson PA, Collins MD. Description of *Bartonella clarridgeiae* sp nov isolated from the cat and patient with *Bartonella henselae* septicemia. Med. Microbiol. Lett. 1996;5:664-673.

- LeBoit PE, Berger TG, Egbert BM, Beckstead JH, Yen TS, Stoler MH. Bacillary angiomatosis. The histopathology and differential diagnosis of a pseudoneoplastic infection in patients with human immunodeficiency virus disease. *Am. J. Surg. Pathol.* 1989;13:909-920.
- Lesprit P, Noel V, Chazouilleres P, Brun-Buisson C, and Deforges L. Cure of *bartonella* endocarditis of a prosthetic aortic valve without surgery: value of serologic follow-up. *Clin. Microbiol. Infect.* 2003;9:239-241.
- Lin JW, Chen C, Chen WC, Chomel BB, Chang CC. Isolation of *Bartonella* species from rodents in Taiwan including a strain closely related to *Bartonella rochalimae* from *Rattus norvegicus*. *J. Med. Microbiol.* 2008;57:1496-1501.
- Maillard R, Riegel P, Barrat F, Bouillin C, Thibault D, Gandoin C, Halos L, Lemanche C, Alliot A, Guillot J, Piémont Y, Boulouis HJ, Vayssier-Taussat M. *Bartonella chomelii* sp. Nov., isolated from french domestic cattle (*Bos taurus*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004;54:215-220.
- Maguina C, Gotuzzo E. Bartonellosis new old. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 2000;14:1-21.
- Maguina C, Garcia PJ; Cordero L, Spach DH. Bartonellosis (Carrión's disease) in the modern era. *Clin. Infect. Dis.* 2001;33:772-779.
- Margileth A M. Antibiotic therapy for cat-scratch disease: clinical study of therapeutic outcome in 268 patients and a review of the literature. *Pediatr. Infect. Dis.* 1992;11:474-478.
- Margileth A M. Cat scratch disease. *Adv. Pediatr. Infect. Dis.* 1993;8:1-21.
- Marston EL, Finkel B, Regnery RL, Winoto IL, Graham RR, Wignal S, Simanjuntak G, Olson JG. Prevalence of *bartonella henselae* and *bartonella clarridgeiae* in an urban indonesian cat population. *Clin. and Diagnos. Labor. Immu.* 1999; 6:41-44.
- Maruyama S, Kabeya H, Nogami S, Sakai H, Suzuki J, Suzuki H, Sugita H, Katsube Y. Three cases of cat scratch disease diagnosed by indirect immunofluorescence antibody assay and/or polymerase chain reaction of 16S rRNA gene of *Bartonella henselae*. *J. Vet. Med. Sci.* 2000;62:1321-1324.
- Maruyama S, Sakai T, Morita Y, Tanaka S, Kabeya H, Boonmar S, Poapolathep A, Chalarmchaikit T, Chang CC, Kaster RW, Chomell BB, Katsube Y. Prevalence of *Bartonella* species and 16S rRNA Gene Types of *Bartonella henselae* in domestic cats in Thailandia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001;65:783-787.

- Maurin M, Gasquet S, Ducco C, Raoult D. MICs of 28 antibiotic compounds for 14 *Bartonella* (formerly *Rochalimaea*) isolates. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1995;39:2387-2391.
- Maurin M, Raoult D. *Bartonella* (*Rochalimaea*) *quintana* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996;9:273-292.
- Maurin M, Birtles R, Raoult D. Current knowledge of *Bartonella* species. *Eur J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1997;16:487-506.
- Maurin M, Erb F, Etienne J, Raoult D. Serological cross-reactions between *Bartonella* and *Chlamydia* species: implications for diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 1997;35:2283-2287.
- McGill S, Wesslen L, Hjelm E, Holmberg M, Auvinen MK, Berggren K, Grandin-Jarl B, Johnson U, Wikström S, Friman G. *Bartonella* sp. seroprevalence in healthy Swedish blood donors. *Scand. J. Infect. Dis.* 2005;37:723-730.
- Maruyama S, Boonmar S, Morita Y, Sakay T, Tanaka S, Yamaguchi F, Kabeya H, Katsube Y. Seroprevalence of *Bartonella henselae* and *Toxoplasma gondii* among healthy individuals in Thailand. *J. Vet. Med. Sci.* 2000;62:635-637.
- Minadakis G, Chochlakis D, Kokkini S, Gikas A, Tselentis Y, Psaroulaki A. Seroprevalence of *Bartonella henselae* antibodies in blood donors in Crete. *Scan. J. Infect. Dis.* 2008;40:846-847.
- Mouritsen CL, Litwin CM, Maiese RL, Segal SM, Segal GH. Rapid polymerase chain reaction-based detection of the causative agent of cat scratch disease (*Bartonella henselae*) in formalin-fixed, paraffin-embedded samples. *Hum. Pathol.* 1997;28:820-826.
- Musso D, Dracourt M, Raoult D: Lack of bactericidal effect of antibiotics except aminoglycosides on *Bartonella* (*Rochalimaea* *henselae*). *J. Antimicrob. Chemother.* 1995;36:101-108.
- O'Connor S P, Dorsch M, Steigerwalt A G, Brenner D J, Stackebrandt E. 16S rRNA sequences of *Bartonella bacilliformis* and cat scratch disease *bacillus* reveal phylogenetic relationships with the alpha-2 subgroup of the class *Proteobacteria*. *J. Clin. Microbiol.* 1991;29:2144-2150.
- Oteo JA, Castilla A, Arosey A, Blanco JR, Ibarra V, Morano LE. Endocarditis due to *Bartonella* sp. Three new clinical cases and Spanish literature review. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2006;24:297-301.

Piémont Y, Heller R. Bartonellosis. II. Other *Bartonella* responsible for human diseases. Ann. Biol. Clin. 1999;57:29-36.

Piémont Y, Bermond D. Maladies provoquées par les *Bartonella*. Ann. Biol. Clin. 2001;59:593-604.

Pinaud H. Conjunctivite infectieuse transmise par les animaux. Ann. Ocul. 1889;101:252-253.

Pape M, Kollaras P, Mandraveli K, Tsona A, Metallidis S, Nikolaidis P, Pederson NC, Koehler JE. Occurrence of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* among human immunodeficiency Virus-infected patients. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2005; 1063: 299-301.

Ramos JA, Vargas J, Fernandez-Rivera J, Macías J, Mira JA, Pineda JA. Prevalencia de seropositividad para *Bartonella* sp. en pacientes adictos a drogas por vía parenteral infectados y no infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. Med. Clin. 2002;119:565-567.

Raoult D, Levy PY, Dupont HT, Chicheportiche C, Tamalet C, Gastaut JA, Salducci J. Q fever and HIV infection. AIDS 1993;7:81-86.

Raoult D, Fournier PE, Dracourt M, Marrie TJ, Etienne J, Cosserat J, Cacoub P, Poinson Y, Leclercq P, Sefton AM. Diagnosis of 22 new cases of *Bartonella* endocarditis. Ann. Intern. Med. 1996;125:646-652.

Raoult D, Roblot F, Roilan JM, Besnier JM, Loulergue J, Bastides F, Choutet P. First isolation of *Bartonella alsatica* from a valve of a patient with endocarditis. J. Clin. Microbiol. 2006;44:278-279.

Regnery RL, Anderson BE, Clarridge JE, Rodriguez-Barradas MC, Jones DC, Carr JH. Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile human immunodeficient virus-positive patient. J. Clin. Microbiol. 1992;30:265-274.

Regnery RL, Olson JG, Perkins BA, Bibb W. Serological response to "*Rochalimaea henselae*" antigen in suspected cat-scratch disease. Lancet 1992;339:1443-1445.

Regnery RL, Childs JE, Koehler J. Infections associated with *Bartonella* species in persons infected with human immunodeficiency virus. Clin. Infect. Dis. 1995;21:94-98.

Regnery RL, Marano N, Jameson P. A fourth *Bartonella* species, *Bartonella weissii*, species nova, isolated from domestic cat. Ann. N.J. Acad. Sci. 2006;1078:410-415.

Relman DA, Loutit JS, Schmidt TM, Falkow S and Tompkins S. The agent of bacillary angiomatosis; an approach to the identification of uncultured pathogens. *N. Engl. J. Med.* 1990;23:1573-1580.

Rodriguez-Barradas MC, Bandres JC, Hamill RJ, Trial J, Clarridge JEL, Baughn RE, Rossen RD. In vitro evaluation of the role of humoral immunity against *Bartonella henselae*. *Infect. Immunity.* 1995;63:2367-2370.

Rolain JM, Brouqui P, Koehler JE, Maguira C, Dolan MJ, Raoult D. Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2004;48:1921-1933.

Roux V, Eykyn SJ., Wyllie S, Raoult D. *Bartonella vinsoni* subsp. *Berkhoffii* as an agent of afebrile blood culture-negative endocarditis in a human. *J. Clin. Microbiol.* 2000;36:1698-1700.

Roy AF, Corstvet RE, Tapp RA, Oreilly KL, Cox HU. Evaluation and use of a nested polymerase chain reaction assay in cats experimentally infected with *Bartonella henselae* genotype I and *Bartonella henselae* genotype II. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2001;13:312-322

Rydkina EB, Roux V, Gagua EM, Predtechenski AB, Tarasevich IV, Raoult D. *Bartonella quintana* in body lice collected from homeless persons in Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 1999;5:176-178.

Sader HS, Hollis RJ, Pfaller MA. The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases. *Clin. Lab. Med.* 1995;15:407-431.

Sala M, Font B, Sanfeliu I, Quesada M, Pons I, Segura F. Bacillary angiomatosis caused by *Bartonella quintana*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005;1063:302-307.

Sander A, Bühler C, Pelz K, Von Cramm E, Bredt W. Detection and isolation of two *Bartonella henselae* variants in domestic cats in Germany. *J. Clin. Microbiol.* 1997;35:265-274.

Sander A, Posselt M, Oberle K, Bredt W. Seroprevalence of antibodies to *Bartonella henselae* in patients with scratch disease in healthy controls: evaluation and comparison of two commercial serological test. *Clin. and Diagn. Lab. Immunol.* 1998; 5:486-490.

Sander A, Posselt M, Bohm N, Ruess M, Altwegg M. Detection of *Bartonella henselae* DNA by two different PCR assays and determination of the genotypes of strains involved in histologically defined cat scratch disease. *J. Clin. Microbiol.* 1999;37:993-997.

- Sander A, Berner R, Ruess M. Serodiagnosis of cat scratch disease: response to *Bartonella henselae* in children and a review of diagnostic methods. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2001;20:392-401.
- Sanogo YO, Zeaiter Z, Caruso G, Merola F, Shpynov S, Brouqui P, Raoult D. *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks (*Acarini: Ixodidae*) removed from humans, Belluno province, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 2003;9:329-332.
- Spach DH, Callis KP, Paauw DS, Houze YB, Schoenknecht FD, Welch DF, Rosen H, Brenner DJ. Endocarditis caused by *Rochalimaea quintana* in patient infected with human immunodeficiency virus. *J. Clin. Microbiol.* 1993;31:692-694.
- Stoler MH, Bonfiglio TA, Steigbigel RT, Pereira M. An atypical subcutaneous infection associated with acquired immune deficiency syndrome. *Am. J. Clin. Pathol.* 1983;80:714-718.
- Schwartzman WA, Nesbit CA, Baron EJ. Development and evaluation of a blood-free medium for determining growth curves and optimizing growth of *Rochalimaea henselae*. *J. Clin. Microbiol.* 1993;31:1882-1885
- Scherer DC, DeBuron-Connors I, Minnick MF. Characterization of *Bartonella bacilliformis* flagella and effect of anti-flagellin antibodies on invasion of human erythrocytes. *Infect. Immun.* 1993;61:4962-4971.
- Schmidt A. *Bartonella* and *Afipia* species emphasizing *Bartonella henselae*. *Krager* 1998;1:98-112.
- Schimdt HU, Kaliebe T, Poppinger J, Bühler C, Sander A. Isolation of *Bartonella quintana* from an HIV-positive patient with bacillary angiomatosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1996;15:736-741.
- Solano-Gallego L, Bradley J, Hegarty B, Sigmon B, Breitschwerdt EB. *Bartonella henselae* IgG antibodies are prevalent in dogs from south-eastern USA. *Vet. Rev.* 2004;35:585-595.
- Tabar MD, Altet L, Francino O, Sánchez A, Ferrer L, Roura X. Vector-borne infections in cats: molecular study in Barcelona area (Spain). *Vet. Parasitol.* 2008;151:332-336.
- Tsukahara M, Tsuneoka H, Lino H, Ohno K, Murano I. *Bartonella henselae* infection from dog. *Lancet* 1998;352:1682.
- Tierno PM, Inglima K, Parisi MT. Detection of *Bartonella (Rochalimaea) henselae* bacteremia using Bact/Alert blood culture system. *Am. J. Clin. Pathol.* 1995;104:530-536.

- Ueno H, Muramatsu Y, Chomell BB, Hohdatsu T, Koyama H, Morita C. Seroepidemiological survey of *Bartonella (Rochalimaea) henselae* in domestic cat in Japan. *Microbiol. Immunol.* 1995;39:339-341.
- Vikram HR, Bacani AK, DeValeria PA, Cunningham SA, Cockerill FR. Bivalvular *Bartonella henselae* prosthetic valve endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45:4081-4084.
- Yamamoto K, Chomell BB, Lowenstein LJ. *Bartonella henselae* antibodies prevalence in free-ranging and captive wild felids from California. *J. Wild. Dis.* 1998;34:56-63.
- Yousif A, Farid I, Baig B, Crek J, Olson P, Wallace M. Prevalence of Bartonella antibodies among human immunodeficiency virus infected from Bahrain. *Clin. Infect. Dis.* 1997;23:398-399.
- Walls T, Moshal K, Trounce J, Hartley J, Harris K and Davies G. Broad-range polymerase chain reaction for the diagnosis of *Bartonella henselae* endocarditis. *J. Paediatr. Child. Health.* 2006;42:469-471.
- Welch DF, Hensel DM, pickett DA, San Joaquin VH, Robinson A, Slater LN. Bacteremia due to *Rochalimaea henselae* in a child: practical identification of isolates in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 1993;31:2381-2386.
- Welch DF, Slater LN. 1995. *Bartonella*. *Manual of Clinical Microbiology*, Ed6. Washington, ASM Press 690-695.
- Wolfson C, Branley J, Gottlieb T. The E test for antimicrobial susceptibility testing of *Bartonella henselae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1996;38:963-968.
- Wong MT, Thornton DC, Kennedy RC, Dolan MJ. A chemically defined liquid medium that supports primary isolation of *Rochalimaea (Bartonella) henselae* from blood and tissues specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1995;33:742-744.
- Zangwill KM, Hamilton DH, Perkins BA, Regnery RL, Plikaytis BD, Hadler JL, Cartter ML, Wenger JD. Cat scratch disease in Connecticut. Epidemiology, risk factors, and evaluation of a new diagnostic test. *N. Engl. J. Med.* 1993;329:8-13.
- Zanutto MS, Mamizuka EM, Raiz-Junior R, Lima TM, Diogo CL, Okay TS, Hagiwara MK. Experimental infection and horizontal transmission of *Bartonella henselae* in domestic cats. *Rev. Inst. Med. Tro. S. Paulo.* 2001;43:257-261.
- Zbinden R, Michael N, Sekulovski A, Graevenitz A, Nadal D. Evaluation of commercial slides for detection of immunoglobulinG against *Bartonella*

henselae by indirect immunofluorescence. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1997;16:648-652.

Zupan S, Poljak M, Avsic-zupanc T. Prevalence of *Bartonella* infections in slovenian intravenous drug user. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2003;990:414-418.

ANNEXES

7. ANNEXES

7.1 Article annex 1

José Ramón Blanco, Isabel Jado, Mercedes Marín, Isabel Sanfeliu, Aránzazu Portillo, Pedro Anda, Immaculada Pons y José Antonio Oteo.

Diagnóstico microbiológico de las infecciones por patógenos bacterianos emergentes: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia*, *Tropheryma whippelii*.

Enferm Infecc Microbiol Clin 2008;26:573-81.

Diagnóstico microbiológico de las infecciones por patógenos bacterianos emergentes: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia*, *Tropheryma whippelii*

José Ramón Blanco^a, Isabel Jado^b, Mercedes Marín^c, Isabel Sanfeliu^d, Aránzazu Portillo^a, Pedro Anda^e, Immaculada Pons^d y José Antonio Oteo^a

^aÁrea de Enfermedades Infecciosas. Centro de Rickettsiosis y Enfermedades Transmitidas por Artrópodos Vectores. Hospital San Pedro CIBIR. Logroño.

^bLaboratorio de Espiroquetas y Patógenos Especiales. Servicio de Bacteriología. Unidad de Alertas y Emergencias. Instituto de Salud Carlos III. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid. ^cServicio de Microbiología Clínica-Enfermedades Infecciosas. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. ^dLaboratorio de Microbiología. Servicio de Análisis Clínicos. UDIAT-Centro Diagnóstico. Corporació Parc Taulí. Sabadell. Barcelona. ^eLaboratorio de Espiroquetas y Patógenos Especiales. Servicio de Bacteriología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid. España.

***Ehrlichia*/*Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia* y *Tropheryma whippelii* constituyen un claro ejemplo de bacterias de difícil cultivo que causan enfermedades emergentes y reemergentes de potencial gravedad e importancia en salud pública. En los últimos años la disponibilidad de técnicas de biología molecular y de cultivo celular ha permitido que muchas de estas especies se hayan implicado en patología humana. El desarrollo de todos estos aspectos, con especial hincapié en las técnicas microbiológicas y criterios diagnósticos, se puede consultar en el procedimiento microbiológico SEIMC número 27: "Diagnóstico microbiológico de las infecciones por patógenos bacterianos emergentes: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia* y *Tropheryma whippelii*" (2.ª ed., 2007) (www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/).**

Palabras clave: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia*, *Tropheryma whippelii*, técnicas de laboratorio y procedimientos.

Microbiological diagnosis of emerging bacterial pathogens: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia*, and *Tropheryma whippelii*

***Ehrlichia*/*Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia* and *Tropheryma whippelii* are fastidious bacterial organisms, considered the causative agents of potentially severe emerging and re-emerging diseases with repercussions on public health. The recent availability of advanced molecular biology and cell culture techniques has led to the implication of many of these species in human pathologies. These issues are extensively covered in number 27 of the SEIMC microbiological procedure—Diagnóstico**

microbiológico de las infecciones por patógenos bacterianos emergentes: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia* y *Tropheryma whippelii* (Microbiological diagnosis of *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia* and *Tropheryma whippelii* infections) (2nd ed., 2007) (www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/).

Key words: *Anaplasma*. *Bartonella*. *Rickettsia*. *Tropheryma whippelii*. Laboratory techniques and procedures.

Introducción

Las infecciones que se tratan en esta revisión tienen en común, con la excepción de la enfermedad de Whipple, la propiedad de ser vehiculadas por artrópodos vectores (piojos, pulgas, garrapatas, trombicúlidos) y de ser bacterias de difícil cultivo. Esta última característica es la que ha hecho que hasta hace pocos años los diagnósticos microbiológicos se hayan realizado mediante la detección de anticuerpos. En los últimos años la disponibilidad de técnicas de biología molecular y de cultivo celular ha permitido que muchas de estas especies se hayan implicado en patología humana.

Anaplasmosis humana (ehrlichiosis humana granulocítica)

Con los términos ehrlichiosis y anaplasmosis denominamos a un grupo de infecciones bacterianas transmitidas por garrapatas duras (*Ixodidae*), que afectan a hombres y animales. Son de distribución universal y están causadas por diferentes especies de los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, y *Neorickettsia* (familia *Anaplasmataceae*). Taxonómicamente, pertenecen al orden Rickettsiales (alfa₁ proteobacteria), y se caracterizan por ser gramnegativas, pleomórficas y de crecimiento intracelular obligado. Se diferencian de las *Rickettsia* spp. en que se replican en unas vacuolas derivadas de la membrana celular de las células que infectan, principalmente leucocitos y plaquetas^{1,2}. No crecen en los medios de cultivo habituales, precisando para su crecimiento líneas celulares (células promielocíticas HL-60 y precursores mielomonocíticos). No se tienen

Correspondencia: Dr. J.R. Blanco.
Área de Enfermedades Infecciosas.
Centro de Rickettsiosis y Enfermedades Transmitidas por Artrópodos Vectores.
Hospital San Pedro CIBIR.
Piqueras, 98. 26006 Logroño. España.
Correo electrónico: jrblanco@riojasalud.es

TABLA 1. Especies de *Ehrlichia* y *Anaplasma* implicadas en patología humana

Especies de <i>Ehrlichia</i> / <i>Anaplasma</i>	Diana	Vector	Distribución geográfica
<i>E. chaffeensis</i>	Monocitos	<i>Amblyomma americanum</i> <i>Dermacentor variabilis</i>	Norteamérica Centroamérica
<i>A. phagocytophilum</i>	Granulocitos	<i>Ixodes ricinus</i>	Europa Norteamérica Norte de África
<i>E. ewingii</i>	Granulocitos	<i>A. americanum</i>	Norteamérica
<i>N. sennetsu</i>	Monocitos	Desconocido	Japón Malasia

TABLA 2. Propuestas para la definición de casos de anaplasmosis humana del ESCAR

Anaplasmosis humana confirmada

- Fiebre con antecedente de exposición o picadura de garrapata
y
- Demstración de infección por *Anaplasma phagocytophilum* por seroconversión o aumento de cuatro veces el título de anticuerpos*
o
- Resultado de PCR positivo con posterior secuenciación de los amplicones demostrando ADN específico de *Anaplasma* en sangre
o
- Aislamiento de *A. phagocytophilum* en cultivo de sangre

Probable anaplasmosis humana

- Fiebre con antecedente de exposición o picadura de garrapata
y
- Presencia de un título estable de anticuerpos frente a *A. phagocytophilum* en suero agudo y convalescente si el título es cuatro veces el punto de corte**
o
- Resultado de PCR positivo sin posterior secuenciación
o
- Presencia de mórulas intracitoplasmáticas en el frotis sanguíneo

*Por ensayos de inmunofluorescencia, usando tanto antígeno intracelular como purificado, en laboratorio de referencia o con el kit de MRL Diagnostics (Cypress, California, EE.UU.).

**Usando los cebadores específicos de especie.

ESCAR: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Study Group for *Coxiella*, *Rickettsia*, *Anaplasma* and *Bartonella*; PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

con la tinción de Gram, aunque se pueden poner de manifiesto en las células que infectan, en una especie de agregados citoplasmáticos denominados "mórulas" mediante las tinciones de Wright y Giemsa^{1,2}.

En la tabla 1 se muestran las diferentes especies implicadas en patología humana con sus dianas y vectores. En Europa, sólo tenemos constancia de la existencia de la anaplasmosis humana (AH) y la única garrapata implicada en su transmisión es *Ixodes ricinus*, guardando la AH y la enfermedad de Lyme un inminente paralelismo, ya que comparten vector, alguno de los reservorios y como tal, ambiente epidemiológico. La mayor incidencia de estas in-

fecciones se produce en los meses en los que las garrapatas están más activas (primavera-verano y principio de otoño). En Europa llama la atención la alta prevalencia de *Anaplasma phagocytophilum* encontrada en *I. ricinus* (hasta el 45%) y los pocos casos diagnosticados en humanos.

A pesar de que las dianas de *Ehrlichia chaffeensis*, *A. phagocytophilum* y *Ehrlichia ewingii*, productoras, respectivamente, de ehrlichiosis humana monocítica, AH y ehrlichiosis humana granulocítica en inmunodeprimidos son diferentes, presentan un cuadro clínico muy superponible. En Europa no existen datos sobre la presencia de otras ehrlichiosis humanas diferentes a AH.

La AH es una enfermedad febril aguda en la que la mayoría de los pacientes recuerdan la picadura de una garrapata en los días/semanas previas. Se han comunicado más casos en varones. El período de incubación varía entre 5 y 21 días. La mayor parte de los casos europeos se producen entre abril y octubre con un pico en julio, lo que coincide con los meses de más actividad de la garrapata. Los pacientes presentan un cuadro febril de comienzo súbito (> 38,5 °C), malestar general, cefalea, mialgias y artralgias. Además pueden existir otras manifestaciones clínicas: respiratorias (tos); digestivas (náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal) y neurológicas (meningitis). La presencia de exantema es excepcional. En la AH europea las manifestaciones clínicas parecen menos graves que en las series americanas. Algunos casos de AH se presentan como una neumonía atípica. Entre las complicaciones de estas afecciones se han descrito, entre otras, coagulación intravascular diseminada (CID), distrés respiratorio del adulto, neuropatías periféricas, parálisis facial y rabdomiolisis. La inmunodepresión (leucopenia) provocada en ocasiones se puede complicar con el desarrollo de infecciones oportunistas (neumonía micótica) que pueden ser mortales. En Norteamérica el 0-5% de los pacientes fallecen y la mayoría de las muertes se deben a infecciones oportunistas o a enfermedades concomitantes, aspectos no descritos en la literatura médica europea². Durante la fase aguda la mayoría de los pacientes presentan leucopenia, trombopenia y una elevación moderada de las transaminasas. Estas alteraciones se suelen resolver en la AH europea en unos 14 días. En los pacientes con signos meníngeos el líquido cefalorraquídeo (LCR) suele ser normal².

Se puede dar el caso de que coexista más de una infección transmitida por garrapatas en un mismo paciente, ya que *I. ricinus* transmite también la enfermedad de Lyme, la babesiosis y la encefalitis centroeuropea. En la tabla 2 se recogen los criterios diagnósticos de AH.

Técnicas diagnósticas

Para el aislamiento de *A. phagocytophilum* se debe obtener sangre durante la fase aguda de la enfermedad, que es cuando existe la mayor concentración de leucocitos infectados en sangre periférica. La sangre debe ser extraída preferiblemente en tubos de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), y preservada a temperatura ambiente no más de 48 h o congelada a -20°C antes de la inoculación en los medios de cultivo. La sangre infectada con *A. phagocytophilum* recogida en tubos de heparina también se ha mostrado útil para el cultivo durante 10 días a temperatura ambiente y hasta 13 días conservada a 4°C . No se recomienda utilizar tubos de estos tubos, ya que comprometen su posterior utilización para la posible amplificación del genoma mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa [PCR]³. En el caso de afectación neurológica se debe recoger LCR. En la tabla 3 se recogen las muestras necesarias para la mayoría de las técnicas de diagnóstico que actualmente se llevan a cabo en los laboratorios de microbiología. Dado que la carga microbiana en este tipo de infecciones es menor que en el caso de otras bacterias, se debe recoger mayor cantidad de muestra para obtener un rendimiento óptimo.

Observación de mórulas

Para su observación lo mejor es preparar las extensiones de sangre periférica inmediatamente tras la extracción de sangre. Deben secarse al aire y conservarse a temperatura ambiente para su observación. La sensibilidad es muy baja en Europa³.

Cultivo

Se realiza en muy pocos centros y exige un laboratorio con un nivel mínimo de seguridad de tipo 3. La línea celular más empleada para el cultivo es la de células promilo-cíticas leucémicas HL-60. La infección puede ser comprobada mediante tinciones de Giemsa, y las mórulas son visibles a los 3-7 días de la inoculación o mediante PCR³.

Detección molecular

Estos métodos no están estandarizados y pueden mostrar resultados discrepantes. Se ha logrado la detección de ADN de *A. phagocytophilum* de sangre y de suero en fase aguda. En la actualidad se dispone de múltiples dianas, siendo las más sensibles las que amplifican un fragmento del gen 16S ARNr³.

TABLA 3. Muestras necesarias para el diagnóstico de *Anaplasma*, *Bartonella* y *Tropheryma whippelii*

Muestra	Recogida	Transporte (tiempo y temperatura)	Conservación (tiempo y temperatura)	Prueba diagnóstica	Nota
Muestras comunes para el diagnóstico de <i>Anaplasma</i>, <i>Bartonella</i> y <i>T. whippelii</i>					
Suero	Tubo de serología	≤ 24 h, $2-8^{\circ}\text{C}$	$+24$ h, -20°C	IFI	
Sangre con EDTA	Tubo con EDTA	≤ 48 h, TA $+48$ h, -20°C	$+48$ h, -20°C (no varias descongelaciones)	PCR	
Sangre citratada	Tubo con citrato	≤ 48 h, TA $+48$ h, -20°C	$+48$ h, -20°C (no varias descongelaciones)	PCR	
Otras muestras necesarias para el diagnóstico de <i>Anaplasma</i>					
Sangre heparinizada	Tubo con heparina	≤ 24 h, TA $+24$ h, -80°C	$+24$ h, -80°C (no varias descongelaciones)	Cultivo ^a	^b
Otras muestras necesarias para el diagnóstico de <i>Bartonella</i>					
Biopsia ^c , hemocultivo ^d	De manera aséptica, enviar al laboratorio con agua destilada	≤ 24 h, TA $+24$ h, -80°C	$+24$ h, -80°C (no varias descongelaciones)	Cultivo, PCR	
Otras muestras necesarias para el diagnóstico de <i>T. whippelii</i>					
Sangre heparinizada	Tubo con heparina	≤ 24 h, TA $+24$ h, -80°C	$+24$ h, -80°C (no varias descongelaciones)	Cultivo ^a	^b
Biopsia de órganos afectados	De manera aséptica, enviar al laboratorio con agua destilada	≤ 24 h, TA $+24$ h, -80°C	$+24$ h, -80°C (no varias descongelaciones)	Cultivo, PCR, inmunohistología	
Líquidos estériles	De manera aséptica, enviar al laboratorio con agua destilada	≤ 24 h, TA $+24$ h, -80°C	$+24$ h, -80°C (no varias descongelaciones)	Cultivo, PCR	

^aMuy laborioso, se requiere personal especializado e instalaciones con nivel de bioseguridad 3.

^bEvitar el uso de heparina para muestras en las que se vaya a realizar diagnóstico molecular, puesto que este anticoagulante puede inhibir la PCR.

^cGanglios o adenopatías, válvulas cardíacas, piel, etc.

^dInmunodeprimidos o con sospecha de endocarditis.

IFI: inmunofluorescencia indirecta; PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

Serología

Es la técnica más utilizada y la inmunofluorescencia indirecta (IFI) es la más empleada. Disponemos de diferentes antígenos para el diagnóstico de la AH. Su mayor limitación es la existencia de reacciones cruzadas entre las diferentes especies de *Ehrlichia* y *Anaplasma*. Al no existir en Europa ninguna evidencia que demuestre la presencia de otras ehrlichiosis humanas diferentes de AH, ante un cuadro clínico sugestivo, una serología positiva ha de hacernos pensar en AH. También se han descrito reacciones cruzadas con otros *Rickettsiales*. Su limitación es la falta de sensibilidad en fases agudas. Se debe extraer un segundo suero (de 14 a 21 días) para observar seroconversión³.

El diagnóstico de la anaplasmosis/ehrlichiosis requiere un alto índice de sospecha. Los hallazgos de laboratorio (trombopenia, leucopenia, aumento de transaminasas) y los antecedentes epidemiológicos nos deben hacer sospechar esta posibilidad. Estas infecciones han de ser tenidas en cuenta en individuos previamente sanos que presentan fiebre tras realizar actividades al aire libre y en aquéllos con el antecedente de picadura de garrapata y que no responden al tratamiento con betalactámicos o macrólidos, especialmente en áreas endémicas para la enfermedad de Lyme.

Las anaplasmosis/ehrlichiosis se previenen evitando la picadura de las garrapatas. Ante la sospecha clínica se debe iniciar tratamiento de forma empírica. El tratamiento de elección, incluido los menores de 8 años, es la doxiciclina. En embarazadas el tratamiento de elección es rifampicina. La respuesta al tratamiento es buena y los síntomas se resuelven en 24-48 h. En ausencia de respuesta se ha de descartar otras posibilidades diagnósticas o coinfección por otros agentes².

Infección por *Bartonella* spp.

Las *bartonellas* son bacterias gramnegativas, aerobias, no móviles, que se comportan como intracelulares facultativos. Hasta 1993 *Bartonella bacilliformis* era la única especie de *Bartonella* implicada en patología humana. En los últimos años, las técnicas de biología molecular y de cultivo han permitido implicar en patología humana a casi una decena de especies de *Bartonella* (tabla 4)⁴. Las principales especies implicadas en nuestro país en patología humana son *B. henselae* y *B. quintana*.

Una de las características de las infecciones por *Bartonella* spp. consiste en que una misma especie puede pro-

ducir diferentes manifestaciones clínicas⁴. *B. henselae* es el agente principal responsable de la enfermedad por arañazo de gato (EAG). Entre 1 y 3 semanas después de haber sufrido un arañazo y/o mordedura por gatos/perros, el 60-90% de los pacientes presenta una pápula o pústula en la zona de inoculación que se acompañan en el 85-100% de los casos de adenopatías localregionales (axilares, cervicales o inguinales). El proceso suele ser benigno y en la mayoría de los casos se resuelve de forma espontánea. *B. quintana* es el agente responsable de la fiebre de las trincheras o fiebre de los 5 días (quintana). Unos 15-25 días después de sufrir una picadura por piojos los pacientes presentan fiebre, cefalea e intensos dolores óseos (pretibiales). La fiebre evoluciona cada 5 días, pero en cada brote es menos intensa que en la anterior. En la actualidad estamos asistiendo a un rebrote de la misma (*urban trench fever*) en vagabundos y alcohólicos⁵. *B. henselae* y *B. quintana* son los agentes responsables de la angiomatosis bacilar (AB). Se trata de un proceso proliferativo vascular que afecta a la piel (úlceras, nódulos o pápulas hiperpigmentadas, no pruginosas, que sangran con facilidad) o a otros órganos (médula ósea, bazo, hígado). Produce lesiones óseas líticas muy dolorosas. El cuadro clínico se da fundamentalmente en inmunodeprimidos (VIH < 100 CD4). Un cuadro asociado al anterior es la peliosis hepática. Se trata de una lesión parenquimatosa hepática que cursa con dilatación de las sinusoides hepáticas. En estos pacientes está contraindicada la biopsia hepática. *B. henselae* es la única especie implicada. Mención especial merecen las endocarditis por *bartonella*. Estas endocarditis cursan con cultivo negativo (ECN). En la actualidad, y según series, representan hasta el 17% de todos los casos de endocarditis. *B. quintana* es la especie implicada con más frecuencia (hasta en el 80%)^{4,6}. Los pacientes con endocarditis por *B. quintana* no presentan valvulopatía previa, a diferencia de lo que se observa en la debida a *B. henselae*^{4,6}. Desde el punto de vista clínico, la clínica es superponible al resto de las endocarditis. Es importante conocer que existen reacciones cruzadas entre *Bartonella* spp. y *Chlamydia* spp.⁷ por lo que ante una endocarditis por *Chlamydia* spp. se debe descartar que no corresponda en realidad a una endocarditis por *Bartonella* spp. Por último, debemos estar atentos a la infección por *B. bacilliformis* en pacientes procedentes de Sudamérica (en especial de los Andes peruanos). La fiebre de Oroya es su forma aguda (fiebre elevada, escalofríos, artralgias, estupor). Se debe a la invasión masiva de los eritrocitos por *B. bacilliformis*, lo que origina su hemólisis. La forma cró-

TABLA 4. Especies de *Bartonella* implicadas en patología humana

Especies de <i>Bartonella</i>	Vector	Reservorio	Manifestaciones clínicas
<i>B. alsatica</i>	Desconocido	Conejos	Endocarditis
<i>B. bacilliformis</i>	<i>Lutzomyia verrucarrun</i>	Hombre	Enfermedad de Carrión, verruga peruana, bacteriemia
<i>B. clarridgeiae</i>	<i>Ctenocephalides felis</i>	Gatos	EAG
<i>B. elizabethae</i>	<i>Xenopsylla cheopis</i>	Ratas	Endocarditis
<i>B. grahamii</i>	<i>Ctenophthalmus nobilis</i>	Ratón campestre	Neuroretinitis
<i>B. henselae</i>	<i>Ctenocephalides felis</i>	Gatos	EAG, angiomatosis bacilar, endocarditis, peliosis hepática
<i>B. koehlerae</i>	<i>Ctenocephalides felis</i>	Gatos	Endocarditis
<i>B. quintana</i>	<i>Pediculus humanus</i>	Hombre	Fiebre de las trincheras, angiomatosis bacilar, linfadenopatía crónica, endocarditis
<i>B. vinsonii</i> sub. <i>berkhoffii</i>	Desconocido	Perros, coyotes	Endocarditis
<i>B. vinsonii</i> sub. <i>arupensis</i>	Desconocido	Roedores	Endocarditis

EAG: enfermedad por arañazo de gato.

nica es la verruga peruana y se caracteriza por la presencia de lesiones cutáneas de aspecto vascular que sangran con facilidad.

Técnicas diagnósticas

El diagnóstico microbiológico se basa en técnicas serológicas, de PCR y el cultivo⁷. En la tabla 3 se recogen las muestras necesarias para la mayoría de las técnicas de diagnóstico que actualmente se llevan a cabo en los laboratorios de microbiología.

Serología

Es la técnica más utilizada (IFI, ELISA). La presencia de variantes antigénicas (*B. henselae* Houston, *B. henselae* Marsella) puede explicar la existencia de discordancias serológicas. También se debe estar atento a la posibilidad de reacciones cruzadas con otras especies (*Chlamydia*, *Coxiella burnetii*)⁷. El punto de corte diagnóstico para pacientes con EAG es IgG 1:64 y para los de endocarditis, 1:800.

Detección molecular

La amplificación mediante PCR de los genes de la citrato sintasa (*gltA*) y de la fracción 16S del ARN ribosomal son útiles para su diagnóstico. Otro cebador útil para la diferenciación de las especies de *Bartonella* spp. es la que emplea los primers complementarios de la región intergénica del 16S-23S ARNr. La PCR en tiempo real es más sensible y específica y es especialmente útil en pacientes con endocarditis por *Bartonella* spp. en los que sólo se dispone de suero⁸.

Cultivo

Aunque estas bacterias son consideradas microorganismos exigentes o fastidiosos, pueden ser cultivadas en agar sangre con un 5% de sangre de cordero o agar chocolate. Su cultivo requiere de incubaciones prolongadas, en una atmósfera enriquecida con CO₂ (5%) y a una temperatura de 37 °C (excepto *B. bacilliformis* que sólo crece a 28-30 °C)⁴. El tiempo mínimo de incubación variará dependiendo del tipo de cultivo de que se trate. Si es un cultivo primario o una muestra directa de paciente, se deberá incubar durante un mínimo de 2 meses. Los subcultivos de *Bartonella* spp. precisan de 3 a 10 días. La rentabilidad diagnóstica mejora si antes del cultivo se someten los tubos de sangre a congelación (24 h a -85 °C) y posterior descongelación a temperatura ambiente, ya que lisa los hematíes, o bien si se emplean hemocultivos de lisis-centrifugación, que lisa directamente los hematíes. Dado que estas bacterias producen poco CO₂, es posible que el sistema de hemocultivos automatizado no detecte el crecimiento de bacterias, por lo que en aquellos casos en los que se sospeche la infección se debe realizar una siembra en un medio sólido que se debe mantener de forma prolongada.

El tratamiento depende de cada especie y de las manifestaciones clínicas que produzca⁴. En algunos casos, como la EAG, no suele ser preciso el uso de antibióticos. En la fiebre de las trincheras se utiliza doxiciclina y gentamicina; en la AB, eritromicina. En los pacientes con ECN en los que se sospeche la infección por *Bartonella* spp. una opción consiste en administrar gentamicina junto con ceftriaxona asociado o no a doxiciclina. Por último, en pacien-

tes con fiebre de Oroya el tratamiento de elección es el cloranfenicol y en los que presentan la verruga peruana, la rifampicina.

Infecciones por *Rickettsia* spp.

El género *Rickettsia* está constituido por especies de pequeños cocobacilos gramnegativos pleomórficos, inmóviles y aerobios que se comportan como patógenos intracelulares obligados y están relacionados serológicamente. Se tiñen razonablemente bien con los métodos de Giemsa, Castañeda y Giménez y débilmente con la tinción de Gram.

Las rickettsiosis constituyen un grupo de enfermedades zoonóticas de distribución geográfica heterogénea cuya gravedad varía desde formas benignas y autolimitadas a infecciones fulminantes de elevada mortalidad. La mayoría de los casos se adquieren por picadura de garrapatas, piojos o pulgas que están infectados por el microorganismo. El hombre es un huésped accidental en el ciclo biológico de las rickettsias. Diversos mamíferos, fundamentalmente pequeños roedores, ganado y perros, contribuyen a perpetuar la infección y cerrar el ciclo biológico de la bacteria. Un hecho de especial interés con relación a la epidemiología de las rickettsiosis reside en que la distribución de una especie determinada, en general, coincide con la distribución de la garrapata vector. Hasta el año 1991 sólo se conocían cinco enfermedades rickettsiales^{9,10}. Desde entonces, gracias al desarrollo de los métodos de cultivo y de las técnicas de biología molecular, se han descrito otras muchas (tabla 5). Las rickettsias se clasifican en dos grupos atendiendo a las bases clínicas y a los agentes etiológicos responsables: el grupo de las fiebres manchadas (GFM) y el de las fiebres tíficas (GFT) (tabla 5). Las rickettsias pertenecientes al GFM muestran una distribución global. La mayoría se transmite por garrapatas y están muy relacionadas serológicamente. Los representantes del GFT son dos: *R. prowazekii*, responsable del tifus exantemático epidémico, y *R. typhi*, que produce el llamado tifus murino o endémico.

Los principales síntomas de una rickettsiosis aparecen a los 6-10 días después de la picadura y se caracterizan por cefalea, erupciones maculopapulares, dolores musculares, linfadenopatía local y una o varias escaras en el punto de inoculación^{9,10}. A partir del sitio de entrada del agente, la infección se extiende por la circulación venosa invadiendo el endotelio de capilares, venas y arterias, donde se multiplica y produce una vasculitis más o menos generalizada. En los casos más graves, las rickettsiosis suelen ir acompañadas de edema pulmonar, neumonía intersticial y erupción hemorrágica. Las alteraciones del sistema nervioso central suelen ser relativamente frecuentes y pueden provocar distintos cuadros clínicos. Algunas de ellas derivan en importantes secuelas como sordera, pérdida de visión y paraplejía, entre otros defectos neurológicos^{9,10}.

Técnicas diagnósticas

El diagnóstico microbiológico se basa en técnicas serológicas, de PCR y el cultivo^{9,11}. En la tabla 6 se recogen las muestras necesarias para la mayoría de las técnicas de diagnóstico que actualmente se llevan a cabo en los laboratorios de microbiología.

TABLA 5. Rickettsiosis de las fiebres manchadas y del grupo tífus

Enfermedad	Microorganismo	Vector	Distribución
Rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas			
Fiebre botonosa	<i>R. conorii</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Mediterráneo, África, India, Mar Negro
DEBONEL/TIBOLA	<i>R. slovacae</i>	<i>Dermacentor marginatus</i> , <i>D. reticulatus</i>	Europa
Fiebre manchada de Israel	<i>R. conorii israelensis</i>	<i>R. sanguineus</i>	Israel, Portugal
Rickettsiosis asociada a linfangitis	<i>R. sibirica mongolitimonae</i>	<i>Hyalomma asiaticum</i> , <i>H. truncatum</i>	China, África, Francia
Innominada	<i>R. helvetica</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Europa, Japón
Innominada	<i>R. aeschlimannii</i>	<i>H. marginatum</i> , <i>R. appendiculatus</i>	Europa, África
Innominada	<i>R. massiliae</i>	<i>R. sanguineus</i>	Francia
Fiebre por garrapatas en África	<i>R. africae</i>	<i>Amblyomma hebraeum</i> , <i>A. variegatum</i>	África, Isla de Guadalupe
Fiebre de Astracán	<i>R. conorii caspiensis</i>	<i>R. sanguineus</i> , <i>R. pumilio</i>	Astracán, Kosovo, Chad
Tífus garrapatas Norte de Asia	<i>R. sibirica</i>	<i>D. nutalli</i> , <i>D. marginatus</i> , <i>D. silvarum</i>	Antigua URSS, Pakistán
Innominada	<i>R. heilongjiangensis</i>	<i>D. silvarum</i>	China, Este de Rusia
Fiebre manchada de Japón	<i>R. japonica</i>	<i>Ixodes ovatus</i> , <i>D. taiwanensis</i> <i>Haemaphysalis longicornis</i>	Japón
Fiebre manchada de las Montañas Rocosas	<i>R. rickettsii</i>	<i>D. andersoni</i> , <i>D. variabilis</i> , <i>A. cajennensis</i> , <i>A. aureolatum</i> , <i>R. sanguineus</i>	América
Innominada	<i>R. parkeri</i>	<i>A. maculatum</i>	EE.UU.
Tífus garrapatas Queensland	<i>R. australis</i>	<i>I. holocyclus</i> , <i>I. tasmanii</i>	Australia
Fiebre manchada Islas Flinders	<i>R. honei</i>	<i>Aponomma hydrosauri</i>	Australia, Tailandia
Innominada	<i>R. marmionii</i>	Desconocido	Australia
Rickettsiosis pustulosa	<i>R. akari</i>	<i>Allodermanyssus sanguineus</i>	EE.UU., Ucrania, Turquía
Tífus murino	<i>R. felis</i>	<i>Ctenocephalides felis</i> , <i>C. canis</i>	EE.UU., México, Europa
Innominada	<i>Candidatus R. kellyi</i>	Desconocido	India
Innominada	<i>R. monacensis</i>	<i>I. ricinus</i>	España
Rickettsiosis del grupo tífus			
Tífus exantemático	<i>R. prowazekii</i>	<i>Pediculus humanus corporis</i>	Universal
Tífus murino	<i>R. typhi</i>	<i>Xenopsylla cheopis</i> , <i>C. felis</i>	Universal

Tinción de Giménez

Las muestras de tejidos pueden examinarse microscópicamente mediante esta tinción, que permite visualizar las rickettsias, pero no diferencia en cuanto a especie ni tampoco otros microorganismos, por lo que su detección suele ser dudosa.

Serología

La serología está limitada por las reacciones cruzadas entre el GFM y el GFT^{9,11}. La IFI es una de las técnicas más sensibles y la más ampliamente utilizada en la actualidad para el diagnóstico de las rickettsiosis exantemáticas. Los antígenos están comercializados, estandarizados y prefijados en los portaobjetos sobre los que se añaden diluciones seriadas del suero del paciente. La confirmación del diagnóstico requiere detectar una seroconversión, que se produce en la fase de convalecencia, entre la tercera y cuarta semanas. Para una correcta interpretación de los resultados de serología, se deben tener en cuenta los datos de reactividad basal de la población en zonas endémicas. Como técnicas experimentales, para evitar la reactividad cruzada, en algunos casos se utilizan ensayos de *immunoblotting* con sueros sometidos a absorciones con antígenos heterólogos^{9,12}. Este método da como resultado un

considerable aumento de la especificidad, si bien tiene una baja sensibilidad.

Cultivo

Para el cultivo de las rickettsias del GFM se requiere Minimum Esencial Medium (medio MEM) sin antibiótico suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10% (concentración final [CF]), 2 mM de glutamina CF y el 0,2% (CF) de aminoácidos no esenciales. La incubación de los cultivos se lleva a cabo a 33-35 °C en ausencia de CO₂. Para *R. typhi* se requiere el mismo medio suplementado con SBF al 2% (CF). El diagnóstico definitivo de las rickettsiosis requiere el aislamiento e identificación de la especie a partir del cultivo^{9,11,13}. El cultivo se lleva a cabo en células VERO E6 o fibroblastos L92. El efecto citopático producido no es muy característico ni específico de especie y, aunque puede aparecer a las 24-48 h postinoculación, generalmente se necesitan 5-7 días para su desarrollo. El cultivo se puede acelerar si se inocula la muestra sobre una monocapa de las células susceptibles previamente crecidas sobre un portaobjetos circular (*shell vial*, SV), seguida de una centrifugación. Después de 5-7 días de incubación se procede a detectar la presencia de la bacteria mediante tinción de Giménez, IFI con anticuerpos especí-

TABLA 6. Muestras necesarias para el diagnóstico de las rickettsiosis

Muestra	Recogida	Transporte (tiempo y temperatura)	Conservación (tiempo y temperatura)	Prueba diagnóstica	Nota
Suero	Tubo de suero	≤ 24 h, 2-8 °C	+ 24 h, -20 °C	IFI	
Sangre con EDTA	Tubo con EDTA	≤ 24 h, 2-8 °C	+ 24h, -20 °C	PCR	El EDTA ^a dificulta el cultivo
Sangre citratada	Tubo con citrato	≤ 24 h, 2-8 °C	+ 24 h, -60/-80 °C (no varias descongelaciones)	PCR, Cultivo ^b	
Sangre heparinizada	Tubo con heparina	≤ 24 h, 2-8 °C	+ 24h, -60/-80 °C (no varias descongelaciones)	Cultivo	La heparina ^c puede inhibir la PCR
LCR	Tubo estéril	≤ 24 h, 2-8 °C	+ 24 h, -20 °C	PCR	
Biopsia cutánea	Asepsia en la toma de la muestra. Colocar el tejido en un tubo o frasco estéril con suero fisiológico estéril para prevenir la desecación	≤ 24 h, 2-8 °C	+ 24 h, -20 °C	Microscopia ^d , PCR	Muestra de la escara de inoculación
Contenido de pápulas/máculas	Tubo/torunda estéril	≤ 24 h, 2-8 °C	+ 24 h, -20 °C	PCR	

^aEl EDTA levanta la monocapa de células Vero dificultando el cultivo.

^bMuy laborioso, se requiere personal especializado e instalaciones con nivel de seguridad 3, por lo que sólo se realiza en laboratorios de referencia e investigación.

^cEvitar el uso de heparina para muestras en las que se vaya a realizar diagnóstico molecular, puesto que este anticoagulante puede inhibir la PCR.

^dPrevia tinción de tejido infectado, incluyendo la lesión de inoculación, por el método de Giménez.

IFI: inmunofluorescencia indirecta; PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

ficos o PCR. Este procedimiento resulta muy laborioso, requiere personal especializado e instalaciones con nivel de seguridad 3. Su principal limitación es su baja sensibilidad, por lo que se no se recomienda en el caso de que el paciente haya comenzado con la antibioterapia. Sin embargo, es la técnica diagnóstica más específica, fundamental para la obtención de antígenos, para el estudio de la sensibilidad a antibióticos y la determinación de las especies de *Rickettsia* presentes en un área.

Detección molecular

Las técnicas moleculares, como la PCR, permiten un diagnóstico rápido y específico al detectar ADN de rickettsia en tejidos infectados, cultivos y garrapatas. Por el momento, la mayor parte de las técnicas descritas son de desarrollo propio (*in house*), y no están comercializadas. Los genes más comúnmente analizados son los que codifican dos proteínas de la membrana externa: *rOmpA* (presente en todas las especies excepto *R. helvetica*, *R. australis*, *R. bellii* y *R. canadensis*) y *rOmp B* (presente en todas las especies excepto *R. helvetica*, *R. bellii* y *R. massiliae*)^{9,11,14,15}. También se utiliza el gen *gltA*, que codifica la citrato sintetasa (válido para todas la rickettsias), el gen que codifica la proteína de 17-kDa (válido para todas las rickettsias del GFM) y el gen D (válido para la mayoría de las especies). Recientemente, se ha desarrollado una PCR-RLB (*reverse line blotting*) que utiliza como diana el espacio intergénico 23S-5S ARNr¹⁶ que, junto con una hibridación en fase reversa utilizando sondas especie-específicas, permite la identificación de la especie implicada sin necesidad de secuenciación. Este método es altamente sensible y específico, tanto para muestras clínicas como ambientales. Cuando se busque una mayor sensibilidad, hay que recurrir a

PCR anidadas y posterior hibridación en fase reversa. La PCR a tiempo real permite obtener resultados en muy poco tiempo (menos de 1 h)¹⁷. Todas estas ventajas hacen que la PCR se presente como la prueba ideal para el diagnóstico de estas infecciones, aunque existen algunas desventajas, como son la limitación para realizar pruebas de sensibilidad a los antibióticos y la imposibilidad de coleccionar los aislados para futuras investigaciones.

Las rickettsiosis se previenen evitando la picadura de los artrópodos vectores. El tratamiento de las rickettsiosis deba iniciarse sobre la base proporcionada por datos clínico-epidemiológicos. El tratamiento de elección para la infección por rickettsias es la doxiciclina. En niños puede utilizarse en algunos casos la azitromicina.

Enfermedad de Whipple

La enfermedad de Whipple (EW) es una infección multisistémica causada por *Tropheryma whippelii*, un bacilo grampositivo aerobio que no tiñe bien con la tinción de Gram. Gracias a las modernas técnicas de biología molecular esta bacteria ha sido incluida dentro del grupo de los actinomicetos.

Por el momento, no se conoce su incidencia real. Afecta, principalmente, a varones de mediana edad, raza blanca y origen europeo que residen en el medio rural. Como muchas enfermedades infecciosas la EW cursa con signos y síntomas poco específicos. Los síntomas más frecuentes son la pérdida de peso (85-100%), la diarrea con signos de malabsorción (72-85%), las artralgiás (simétricas, migratorias) (65-90%) y el dolor abdominal (60-72%)¹⁸. Otras manifestaciones son las neurológicas (oftalmoplejia supra-

nuclear, mioclonías), cardíacas (ECN) y la hiperpigmentación de la piel.

Técnicas diagnósticas

El diagnóstico es complejo dada la amplia variedad de síntomas que se pueden presentar. Al no existir ningún signo ni síntoma específico, la confirmación del diagnóstico mediante pruebas de laboratorio es fundamental. En la tabla 3 se recogen las muestras necesarias para la mayoría de las técnicas de diagnóstico que actualmente se llevan a cabo en los laboratorios de microbiología.

Cultivo

En el año 2000 se consigue su cultivo gracias al empleo de medios celulares con líneas de fibroblastos humanos¹⁹. En los cultivos celulares se multiplica activamente en el interior de las células, pero sobrevive tanto intracelular como extracelularmente, por lo que no se trata de un patógeno intracelular estricto.

Detección molecular

El estudio por PCR de la región ITS 16S-23S (*internal transcribed spacer*) y del dominio III del gen que codifica el 23S ARNr de varias cepas descritas ha demostrado cierta heterogeneidad; se han descrito cuatro genotipos. Los métodos basados en PCR son, por el momento, los únicos abordables en laboratorios de diagnóstico microbiológico que permiten confirmar su diagnóstico, ya que el cultivo y la serología sólo están disponibles en laboratorios de investigación y la microscopía electrónica no es fácilmente abordable. Por el momento, no existen técnicas comerciales de PCR para su detección. Las PCR empleadas se basan en la amplificación de distintas regiones de su genoma, aunque hay pocas referencias a la sensibilidad y sensibilidad de cada una²⁰. La PCR realizada en formato convencional, *seminested-PCR* o *nested-PCR* incrementan la sensibilidad de detección y la PCR a tiempo real con sondas tipo Taqman o FRET aporta mayor especificidad. Del mismo modo, se han empleado iniciadores para diversas regiones; las más utilizadas son las PCR específicas del gen 16S ARNr, *rpoB*, *hsp65*, el dominio III del ARNr 23S, la región intergénica 16S-23S ARNr y regiones repetidas del genoma²⁰. La detección de la bacteria por PCR universal del gen 16S rARN y su posterior secuenciación como parte del diagnóstico de sospecha de una infección bacteriana (no específicamente de *T. whippelii*), aunque válida en muestras ordinariamente estériles, debe ser confirmada con el análisis de otras dos regiones diferentes y específicas del genoma de *T. whippelii*. Recientemente, se han publicado algoritmos para ayudar al diagnóstico de la EW considerando los resultados de la tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS) y del análisis por PCR²¹. Hay autores que consideran la PCR una técnica complementaria del estudio histológico y recomiendan su empleo cuando se sospecha la enfermedad y el estudio histológico es negativo o en muestras del sistema nervioso central (SNC). Otros recomiendan realizar conjuntamente las dos técnicas, ya que consideran que la tinción de PAS tiene falsos negativos y no es completamente específica de la EW. Si ambas técnicas (PCR y PAS) son positivas, se considera el diagnóstico probado. Si sólo uno de los test es positivo, se considera el diagnóstico probable y se debe descartar la enfermedad por análisis de otro tejido (si está disponible

también por serología o análisis inmunohistoquímico). Si sólo la PCR es positiva, se deben analizar dos regiones de ADN diferentes en la misma muestra o emplear muestras de localizaciones distintas (LCR, líquido articular, adeno-patías, etc.). Cuando se establece un diagnóstico de certeza, se debe analizar LCR con PCR incluso en ausencia de manifestaciones neurológicas. La detección de *T. whippelii* por PCR se debe realizar siempre en muestras de válvulas cardíacas de pacientes con ECN²².

Sin tratamiento antibiótico, la enfermedad tiene una evolución fatal. Por el momento, no hay ensayos clínicos ni estudios comparativos y prospectivos sobre su tratamiento. El tratamiento recomendado consiste en ceftriaxona o penicilina G asociada a estreptomina durante 2 semanas seguido de un tratamiento oral, durante al menos 1 año, con cotrimoxazol. En los alérgicos a las sulfamidas se puede sustituir el cotrimoxazol por doxiciclina asociada a hidroxicloroquina⁴. En la mayoría de los pacientes el tratamiento antibiótico conduce a una rápida mejoría de los síntomas. La efectividad del tratamiento se puede monitorizar mediante la PCR de *T. whippelii*, que se hace negativa a las 2 semanas del inicio del tratamiento.

Bibliografía

- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, description of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophilum*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51:2145-65.
- Oteo JA, Brouqui P. Ehrlichiosis y anaplasmosis humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005;23:375-80.
- Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, Birtles RJ, Bjoersdorff A, Blanco JR, et al. ESCMID Study Group on Coxiella, Anaplasma, Rickettsia and Bartonella; European Network for Surveillance of Tick-Borne Diseases. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10:1108-32.
- Blanco JR, Raoult D. Enfermedades producidas por *Bartonella* spp. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005;25:313-20.
- Brouqui P, La Scola B, Roux V, Raoult D. Chronic *Bartonella quintana* bacteremia in homeless patient. *N Engl J Med*. 1999;340:184-9.
- Raoult D, Fournier PE, Vandenesch F, Mainardi JL, Eykyn SJ, Nash J, et al. Outcome and treatment of *Bartonella* endocarditis. *Arch Intern Med*. 2003;163:226-30.
- Maurin M, Eb F, Etienne J, Raoult D. Serological cross-reaction between *Bartonella* and *Chlamydia* species: implications for diagnosis. *J Clin Microbiol*. 1997;35:2283-7.
- Zeaier Z, Fournier PE, Greub G, Raoult D. Diagnosis of *Bartonella* endocarditis by real-time nested PCR assay using serum. *J Clin Microbiol*. 2003;41:919-25.
- Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clinical Microbiology Rev*. 1997;10:694-719.
- Blanco JR, Oteo JA. Rickettsiosis in Europe. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1078:26-33.
- La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol*. 1997;35:2715-27.
- Eremeeva ME, Balayeva NM, Raoult D. Serological response of patients suffering from primary and recrudescent typhus: comparison of complement fixation reaction, Weil-Felix test, microimmunofluorescence, and immunoblotting. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1994;1:318-24.
- La Scola B, Raoult D. Diagnosis of Mediterranean spotted fever by cultivation of *Rickettsia conorii* from blood and skin samples using the centrifugation-shell vial technique and by detection of *R. conorii* in circulating endothelial cells: a 6-year follow-up. *J Clin Microbiol*. 1996;34:2722-7.
- Fournier PE, Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rompA. *Int J Syst Bacteriol*. 1998;48:839-49.

15. Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (*OmpB*). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2000;50:1449-55.
16. Jado I, Escudero R, Gil H, Jiménez-Alonso MI, Sousa R, García-Pérez AL, et al. Molecular method for identification of *Rickettsia* species in clinical and environmental samples. *J Clin Microbiol*. 2006;44:4572-6.
17. Svraka S, Rolain J, Bechah Y, Gatabazi J, Raoult D. *Rickettsia prowazekii* and real-time polymerase chain reaction. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:428-32.
18. Durand DV, Lecomte C, Cathébras P, Rousset H, Goudeau P. Whipple disease: clinical review of 52 cases. *Medicine (Baltimore)*. 1997;76:170-84.
19. Raoult D, Birg ML, La Scola B, Fournier PE, Enea M, Lepidi H, et al. Cultivation of the bacillus of Whipple's disease. *N Engl J Med*. 2000;342:620-5.
20. Fenollar F, Raoult D. Molecular techniques in Whipple's disease. *Expert Rev Mol Diagn*. 2001;1:299-309.
21. Fenollar F, Puechal X, Raoult D. Whipple's disease. *N Engl J Med*. 2007;356:55-66.
22. Marín M, Muñoz P, Sánchez M, Del Rosal M, Rodríguez-Créixems M, Bouza E. *Tropheryma whippelii* infective endocarditis as the only manifestation of Whipple's disease. *J Clin Microbiol*. 2007;45:2078-81.

7.2 Article annex 2

Isabel Sanfeliu, Valentí Pineda, Immaculada Pons, Jacobo Pérez, Bernat Font, Ferran Segura.

Description of *Bartonella* sp. Infections in General Hospital of Catalonia, Spain.

Clin Microbiol Infect 2009; Published Online May 18

Description of *Bartonella* spp. infections in a general hospital of Catalonia, Spain

I. Sanfeliu¹, E. Antón^{2,4}, V. Pineda^{3,4}, I. Pons^{2,4}, J. Perez³, B. Font² and F. Segura^{2,4}

¹Microbiology Laboratory, UDIAT Centre Diagnòstic, Corporació Parc Taulí, Sabadell, Barcelona,

²Department of Infectious Diseases, Corporació Parc Taulí – Institut Universitari (UAB), Sabadell, Barcelona, ³Paediatrics Department, Corporació Parc Taulí, Sabadell, Barcelona and ⁴Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain

INTRODUCTION

Bartonella is the main agent of cat scratch disease (CSD) and is transmitted to humans after a skin injury caused by a cat scratch or bite [1]. Generally benign, it is characterised by regional lymphadenopathy; however, it may produce a wide spectrum of clinical symptoms with life-threatening complications such as atypical disseminated forms like bacteraemia and endocarditis and bacillary angiomatosis, the last commonly associated with human immunodeficiency virus infection (HIV) [2].

In this study, the characteristics of *Bartonella henselae* and *B. quintana* infections in a Spanish general hospital have been analysed.

METHODS

The study was performed in Sabadell Hospital, which admits 406 000 inpatients. We carried out a retrospective revision of the clinical chart of all patients who had a serological test for *Bartonella* spp. and showed a positive result between January 1998 and November 2007.

The serum samples were tested by immunofluorescence assay (IFA) using a commercially available antigen (*Bartonella* IFA IgG Substrate slide, Focus Technologies, Herndon, VA, USA). The kit for detecting IgG antibodies, which uses Vero cells infected in different spots with *B. henselae* and *B. quintana*, was used according to the manufacturer's instructions.

In a previous study carried out on a healthy population sample from the same area (stratified by age, sex and demographic area according to the real population) [3], *Bartonella henselae* seroprevalence was 8.7% and more than half of the samples had only 1/64 titres. Therefore titre $\geq 1/128$ was chosen as a cut-off to be considered positive for *Bartonella* spp. infection in our patients.

Serological tests against cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr (EBV) and *Toxoplasma* were carried out in order to rule out these diagnoses.

RESULTS

Forty-five *Bartonella* spp. seropositive patients were found. Twenty-five of them were children (12 males), with a mean age of 6.9 (1–14 years), and the other 20 were adults (15 males), with a mean age of 36.4 (15–62 years).

All the children were immunocompetent patients. Nine of them had a history of contact with cats. The typical symptomatology of CSD, with localised lymph node, was present in 18 with different localisations: cervical, axillary, inguinal, submaxillary and supraclavicular, with cervical being the most prevalent in 12 cases. Only six of them presented with fever. Atypical symptomatology was seen in five of them: fever of unknown origin, spleen lesions in two, erythema nodosum or pneumonia. In three cases the lymph node was extracted and in two cases the lymph node histological results were obtained showing a granulomatous necrotising lymphadenitis (Table 1). All the children recovered well, eight of them received different antibiotic treatments, mainly β -lactams or macrolides.

Among the adult patients, five were infected with HIV and eleven had had contact with cats. Sixteen had localised lymph nodes (cervical, axillary, inguinal, submaxillary), and one HIV patient had mediastinum and retroperitoneal nodes. Ten subjects had fever. Four patients showed an atypical symptomatology (rash, headache, endocarditis) and skin nodular lesions were observed in one HIV patient. In nine cases, the histology of the lymph nodes was obtained, with the diagnosis of chronic granulomatous necrotising lymphadenitis in six of them. The other diagnoses were: follicular hyperplasia, reactive lymphadenitis and lymphoid cellularity. We

Corresponding author and reprint requests: Isabel Sanfeliu Sala, Microbiology Laboratory, UDIAT Centre Diagnòstic, Corporació Parc Taulí, Parc Taulí s/n, Sabadell 08208, Barcelona, Spain
E-mail: isanfeliu@tauli.cat

No conflicts of interest declared.

Table 1. Adult and child patients with atypical symptomatology

Case	Age (year)	Sex	Cat	Clinical picture	Anti-IgG <i>Bartonella henselae</i> (1)	Histology	Treatment
1(2)	37	M	Unk	Fever, HIV, skin nodules	1/512 (3)	Proliferation neovascular	Doxycycline + gentamicin
2	54	F	Yes	Fever, rash	1/128, 1/128	-	S. resolution
3	31	M	No	Headache, fever, meningoencephalitis	1/256, 1/128	-	S. resolution
4	59	M	Unk	Fever, endocarditis	1/256, 1/256	-	Ceftriaxone/4 w
5	13	F	Yes	Fever, splenic abscesses	1/128, 1/128	-	Ceftriaxone
6	7	M	Unk	UOF	1/128, 1/128, 1/64	-	-
7	9	M	Unk	Erythema nudosum	1/1024, 1/1024	-	-
8	3	M	Unk	Cervical LN, fever pneumonia	>1/256, 1/256, 1/128	-	Gentamicin + clarythromycin
9	4	F	No	Splenomegaly	1/128	-	-

Cat, cat contact; M, male; F, female; Unk, unknown; LN, lymph node; UOF, unknown origin fever; IFI (IgG), more than one result for follow-up; S. resolution, spontaneous resolution.

(1) Titres from *B. quintana* were negative or \leq two dilutions from *B. henselae* except case 1. (2) Skin modules PCR positive to *B. quintana*. (3) Titres from *B. henselae*, *B. quintana* 1/512.

obtained a biopsy of one of the lesions from the patient with skin lesions showing a neovascular proliferation and the Warthin-Starry silver stain showed numerous small, dark staining organisms. The patient was diagnosed with bacillary angiomatosis. The PCR and DNA sequencing products identified the organism as a *B. quintana*. The patient was treated with doxycycline and gentamicin, achieving the resolution of the process (Table 1). The other ten patients also received different antibiotic treatment with good evolution.

Except for five adults and three children, serological tests for *Toxoplasma*, CMV and EBV could be conducted in all patients. Only one adult patient showed a positive result to IgM for *Toxoplasma* and one child to EBV IgM.

CONCLUSIONS

A *Bartonella* infection is present in our area. Excluding other aetiologies such as CMV, EBV and *Toxoplasma*, the possibility of a cat scratch infection, when patients present with fever, lymph nodes and a history of cat contact, should be considered. This disease has also been considered in HIV patients who could present

with more serious infections such as a bacillary angiomatosis. Atypical clinical forms are not uncommon. The PCR techniques might be helpful for the diagnosis of *Bartonella* infection in immunodepressed patients or when the other tests do not allow differentiation from other infectious aetiologies [4,5]. An accurate history, searching for contact with cats, and a combination of diagnostic criteria, including serological and molecular tests and histological findings, may allow the diagnosis of these diseases.

REFERENCES

- Anderson BE, Neuman MA. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1997; **10**: 203–219.
- Tsukahara M, Tsuneoka H, Iino H, Murano I, Takahashi H, Uchida M. *Bartonella henselae* infection as a cause of fever of unknown origin. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 1990–1991.
- Pons I, Sanfeliu I, Cardenosa N, Nogueras MM, Font B, Segura F. Serological evidence of *Bartonella henselae* infection in healthy people in Catalonia, Spain. *Epidemiol Infect* 2008; **25**: 1–5.
- Agan BK, Dolan MJ. Laboratory diagnosis of *Bartonella* infections. *Clin Lab Med* 2002; **22**: 937–962.
- Hansmann Y, DeMartino S, Piémont Y *et al.* Diagnosis of cat scratch disease with detection of *Bartonella henselae* by PCR: a study of patients with lymphnode enlargement. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 3800–3806.

