

***PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO***

**Estudo das bartoneloses humanas e da  
*Bartonella henselae*:  
infecção experimental, microbiologia, microscopia de luz  
e eletrônica de transmissão**

***CAMPINAS***

***2001***

***PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO***

**Estudo das bartoneloses humanas e da  
*Bartonella henselae*:  
infecção experimental, microbiologia, microscopia de luz  
e eletrônica de transmissão**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção do título de  
Doutor em Clínica Médica, área de Clínica Médica.*

***ORIENTADORA: PROFA. DRA. APARECIDA MACHADO DE MORAES***

***CAMPINAS***

***2001***

UNIDADE DU  
Nº CHAMADA T/UNICAMP  
V543e  
V 47876  
TOMOS 16-837102  
C D X  
PREÇO R\$ 11,00  
DATA 15-02-02  
Nº CPD \_\_\_\_\_

CM00163803-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP**

V543e

Velho, Paulo Eduardo Neves Ferreira

Estudo das bartoneloses humanas e da *Bartonella henselae*: infecção experimental, microbiologia, microscopia de luz e eletrônica de transmissão / Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Aparecida Machado de Moraes

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doenças. 2. Camundongos. 3. Virulência. 4. Bactéria-Patogênica. I. Aparecida Machado de Moraes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

---

**Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado**

---

---

**Orientador(a):** *Profa Dra. Aparecida Machado de Moraes*

---

*Aparecida Machado de Moraes*

---

**Membros:**

---

1. Profa. Dra Celina Wakisaka Maruta

*Celina Wakisaka Maruta*

2. Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara

*Mitika Kuribayashi Hagiwara*

3. Prof. Dr. Luis Jacintho da Silva

*Luis Jacintho da Silva*

4. Prof. Dr. Cármino Antonio de Souza

---

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

---

**Data: 24/07/2001**

---

## ***DEDICATÓRIA***

***À Lorena e a meus filhos, Daniel e Elias***

*Esta tese é para os três. Pelas horas que deixei de  
lhes dedicar e por serem, na verdade, a razão da  
minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

*“A glória de Deus está nas coisas encobertas,  
mas a honra do homem, em descobri-las”*

*Provérbio de Salomão*

**A DEUS,**

*Por dar-me a honra de desvendar um pouquinho do Seu  
mistério e grandeza, mas, sobretudo, pelo prazer de  
encontrá-Lo na Ciência.*

**A MEUS PAIS,**

*Todas as oportunidades que tenha na vida usarei  
para agradecer-lhes o caráter e os valores que  
me imprimiram. Esta tese tem muito de vocês.*

***À Profa. Dra. Aparecida Machado de Moraes,***

*Minha gratidão vai além da sua orientação.*

*Sua amizade e conselhos sábios permitiram-me chegar até aqui.*

*Inúmeras vezes busquei palavras que traduzissem este sentimento.*

*Nunca as encontrei.*

***À Profa. Dra. Maria Leticia Cintra,***

*Sem seu conhecimento e orientação, este trabalho não se concluiria.*

*Sua competência associada a um espírito humilde, sempre disposto a auxiliar, será constante exemplo para minha vida.*



***À Profa. Dra. Ana Maria Uthida-Tanaka,***

*Fui acolhido pela senhora como um de seus filhos.*

*Não me considero merecedor de tanto privilégio.*

*Seu estímulo, ensinamentos e confiança em mim depositada jamais os esquecerei.*

***Ao Prof. Dr. Mário E. Camargo,***

*De todas as boas coisas que o desafio de escrever esta tese me proporcionaram, conhecê-lo foi a melhor delas.*

*Sua vivacidade, competência e caráter até agora me impressionam.*

MARCONI & LACATOS, 1996, mencionam que há os que classificam uma pesquisa como individual ou grupal. A segunda seria realizada por uma equipe formada de especialistas de vários campos do conhecimento humano.

Este trabalho foi, sem dúvida, o resultado de um esforço coletivo. Só a colaboração de todos possibilitou a sua conclusão.

Para mim é uma tarefa penosa expressar minha gratidão nestas linhas por dois motivos. O primeiro porque me parece impossível transformar em palavras o sentimento de profundo reconhecimento àqueles que me permitiram chegar à fase de escrever esta parte do trabalho. O segundo porque, estou certo, não poderei lembrar-me de todos. Foram muitos.

Contudo, estes temores não me impedirão de agradecer, de forma pessoal e sincera, ainda que imperfeita, aos que se seguem e registrar aqui que o melhor de tudo é, no final desta etapa, poder chamá-los de amigos.

A Rovilson Giglioli, por sua disponibilidade e paciência em ajudar-me e em ensinar-me. A Chico, José Raimundo e Daniela, por tolerarem minha falta de experiência em manipular os animais e por cuidarem deles e de mim.

A todos os funcionários do laboratório de microbiologia do Hospital das Clínicas, na pessoa de sua atual chefe, a Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber. Em especial a Shirley, Ângela, Ana e Rosa que, além de agüentarem-me por lá, como os demais, interrompendo sua rotina, colocaram a “mão na massa” ao me ensinarem.

A Fátima, Lucinha e dona Geralda, funcionárias da microscopia eletrônica. Entre muitas risadas, cafés e pãezinhos, recebi incentivo constante e extrema dedicação em auxiliar-me. As belas fotos, em parte apresentadas neste estudo, serão lembrança constante destes momentos. Vocês me possibilitaram ver a grandeza de Deus na pequenez ampliada das bartonelas!

Aos demais funcionários do Departamento de Anatomia Patológica. Sempre pedindo favores e procurando pela dra. Letícia, recebi, de cada um, a ajuda que precisei.

Aos funcionários do Núcleo de Medicina Experimental do Laboratório de Anatomia Patológica e ao Prof. Dr. Konradin Metze, muito obrigado.

A Delma e Christiane do Cemib. Pela tolerância que tiveram com as minhas dificuldades em administrar o pouco tempo e por sempre arrumarem um jeito de resolver os meus problemas.

À Profa. Dra. Sandra Regina Fernandes. Sua dedicação na tradução do manuscrito foi um presente para mim. Mais uma vez obrigado.

Ao Prof. Dr. Walter Belda Júnior. Seu apoio no início de minha pós-graduação será sempre lembrado.

À dra. Natasha Shhessarenko pela realização da sorologia na fase que precedeu o que agora é exposto. Sua companhia no estudo das bartonelas foi muito agradável. Também a Tereza do laboratório de imunologia do Fleury, em São Paulo.

À Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka, que cuidou das bactérias que me foram fornecidas. Sua paixão por este gênero se expressou no trabalho que ajudou o Marcelo a fazer. Sou grato aos dois.

À Profa. Dra. Maria Irma Seixas Duarte, à Carla Pagliari e à Rosana. Ainda teremos muito a aprender sobre essas bactérias.

À Renata, secretária da subcomissão de pós-graduação da Clínica Médica. Enfim, chegamos à entrega da tese. Bom para mim, melhor para você. Obrigado.

Aos professores que participaram da banca de qualificação, Prof. Dr. Sigisfredo Brenelli e Profa. Dra. Lucila Costellat, pela contribuição que trouxeram e pelo grande estímulo.

Ao Prof. Dr. Elemir Macedo de Souza por ter sugerido o diagnóstico do primeiro caso de angiomatose bacilar do serviço e por ter despertado em mim a curiosidade em conhecer as bartonelas. À dra. Luciane Lombello, que muitas vezes ouviu minhas inseguranças e preocupações. Por tantas vezes “quebrar meu galho”. A todos os residentes e estagiários que passaram na Disciplina desde que lá cheguei. Todos ouviram muito sobre as bartonelas e tiveram que ser pacientes comigo. Aos funcionários do setor de Dermatologia do HC, por sempre poder contar com vocês.

A minha família e amigos que sofreram comigo as dores da “gestação” deste trabalho. O “pós-termo” está para nascer! Sem seu estímulo, possivelmente, teria desistido.

*Capes e Faep,*

*Pelo apoio financeiro que possibilitou a realização de parte deste estudo.*

	<i>PÁG.</i>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xxxiii</i>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	37
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	41
2.1. As doenças.....	43
2.1.1. Doença de Carrión.....	43
2.1.1.1. Etiologia.....	43
2.1.1.2. Epidemiologia.....	44
2.1.1.3. Clínica e tratamento	44
2.1.1.3.1. Febre de Oroya.....	44
2.1.1.3.2. Verruga peruana.....	46
2.1.1.4. Diagnóstico.....	47
2.1.2. Febre das trincheiras.....	47
2.1.2.1. Etiologia.....	47
2.1.2.2. Epidemiologia.....	49
2.1.2.3. Clínica.....	49
2.1.2.4. Diagnóstico.....	51
2.1.2.5. Tratamento.....	51
2.1.3. Doença da arranhadura do gato.....	51
2.1.3.1. Etiologia.....	52

2.1.3.2. Epidemiologia.....	55
2.1.3.3. Clínica.....	58
2.1.3.3.1. Doença típica.....	58
2.1.3.3.2. Doença atípica.....	60
2.1.3.3.2.1. Síndrome oculoglandular de Parinaud.....	60
2.1.3.3.2.2. Manifestações neurológicas.....	61
2.1.3.3.2.3. Outras.....	62
2.1.3.4. Diagnóstico.....	63
2.1.3.5. Tratamento.....	65
2.1.4. Angiomatose bacilar.....	66
2.1.4.1. Etiologia.....	67
2.1.4.2. Epidemiologia.....	68
2.1.4.3. Clínica.....	70
2.1.4.4. Diagnóstico.....	75
2.1.4.5. Tratamento.....	78
2.1.5. Outras.....	79
2.1.5.1. Bacteremia e septicemia.....	79
2.1.5.2. Endocardite.....	80
2.1.5.3. Alterações neurológicas e psiquiátricas.....	81
2.1.5.4. Linfadenopatia crônica.....	82
2.1.5.5. Síndrome da fadiga crônica.....	83
2.1.5.6. Portador assintomático.....	83

2.2. As bartonelas.....	84
2.2.1. Taxonomia.....	84
2.2.2. Descrição do gênero e espécies.....	91
2.2.3. Ultra-estrutura.....	91
2.2.4. A <i>Bartonella henselae</i> .....	93
2.3. Diagnóstico.....	96
2.3.1. Exame direto.....	96
2.3.2. Bacteriologia.....	96
2.3.3. Sorologia.....	99
2.3.4. Detecção gênica por técnicas de biologia molecular.....	102
2.3.5. Microscopia.....	103
2.4. Tratamento e prevenção.....	104
2.5. Espécies de interesse associadas às bartonelas.....	107
2.6. Estudos experimentais relacionados.....	109
2.7. Os camundongos imunodeficientes.....	131
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>133</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>137</b>
4.1. Objetivo 1.....	139
4.2. Objetivos 2, 3 e 4.....	139
4.2.1. Animais e bactéria.....	139
4.2.2. Modelo experimental.....	141
4.2.2.1. Fase A.....	141

4.2.2.2. Fase B.....	142
4.2.2.3. Fase C.....	143
4.2.3 Técnicas.....	143
4.2.3.1. Observação clínica.....	143
4.2.3.2. Exame direto.....	143
4.2.3.3. Bacteriologia.....	143
4.2.3.4. Microscopia de luz do fígado e do baço.....	144
4.2.3.5. Microscopia das colônias.....	145
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>147</b>
5.1. Objetivo 1.....	149
5.2. Objetivo 2.....	149
5.2.1. Observação clínica.....	149
5.2.2. Exame direto.....	150
5.2.3. Bacteriologia.....	150
5.3. Objetivo 3.....	152
5.3.1. Microscopia de luz do fígado e do baço.....	152
5.4. Objetivo 3.....	153
5.4.1. Macroscopia das colônias.....	153
5.4.2. Microscopia das colônias.....	154
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>163</b>
6.1. O presente estudo.....	165
6.2. Os resultados.....	165



6.2.1. Objetivo 1.....	165
6.2.1.1. As bartonelas.....	165
6.2.1.2. As bartoneloses.....	167
6.2.1.3 Os modelos experimentais.....	178
6.2.2. Objetivo 2.....	183
6.2.3. Objetivo 3.....	186
6.2.4. Objetivo 4.....	187
6.3. Considerações gerais.....	188
6.4. Prioridades de pesquisa.....	193
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>195</b>
<b>8. SUMMARY.....</b>	<b>199</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>203</b>
<b>10. APÊNDICE (disponível apenas no CD).....</b>	<b>229</b>



*RESUMO*

As bartoneloses humanas são um grupo de doenças cuja patogênese é pouco conhecida. A *Bartonella henselae* é uma das mais estudadas bactérias deste gênero. Ainda assim, pouco se sabe sobre sua virulência e sua relação com o hospedeiro. O objetivo deste estudo foi observar se passagens desses microorganismos *in vivo* determinariam alterações ultra-estruturais nas mesmas. Para isso foram selecionados camundongos isogênicos fêmeas, de 4 a 7 semanas de vida, que foram inoculados com cepa padrão de *B. henselae* (I). Estas foram recuperadas inicialmente de animais geneticamente imunodeficientes (II) e então inoculadas em imunocompetentes. Colônias de bactérias obtidas desta última passagem (III) foram comparadas com colônias I e II à microscopia eletrônica de transmissão. Perda de fímbrias e abundante formação de *blebs* foram as alterações morfológicas mais encontradas nas colônias III. Também, no sexto dia após as inoculações, os animais foram sacrificados e as principais alterações histológicas encontradas foram proliferação endotelial, observada nos animais imunodeficientes, e reação granulomatosa incipiente, observada em um dos camundongos imunocompetentes inoculados. Estes achados são concordantes com aqueles observados clínica e histologicamente nas doenças humanas causadas por bactérias deste gênero. São discutidos, também, outros achados ultra-estruturais e da microscopia de luz do fígado e do baço dos camundongos, além das observações bacteriológicas e do exame direto do sangue dos camundongos. Este estudo demonstrou que passagens *in vivo* da *B. henselae* induziram-na a alterações morfológicas. Estas alterações poderiam explicar a maior virulência das bactérias das colônias III, sugerida pelos resultados encontrados. A maioria destes achados não foi previamente descrita, assim, novos estudos sobre a patogênese da infecção pelas bartonelas deverão considerar as informações ora apresentadas.



## *INTRODUÇÃO*

As bartonelas são hoje representadas por pequenas bactérias gram-negativas, de crescimento lento, microaerófilas, cocobacilares, que crescem melhor em meios enriquecidos com sangue e numa atmosfera com 5% de gás carbônico. Fazem parte da família *Bartonellaceae* e mantêm relação filogenética remota com os membros da ordem *Rickettsiales* (SLHESSARENKO, 1998).

Até recentemente, quando se escrevia sobre bartonelose, fazia-se referência à doença de Carrión (DC), doença bifásica própria da região dos Andes. Desde que BRENNER et al. (1993) propuseram a unificação do gênero *Rochalimaea* com o *Bartonella*, a *B. bacilliformis*, responsável por esta doença, deixou de ser a única espécie deste gênero. Assim, as doenças causadas por bartonelas incluem a febre das trincheiras (FT), a doença da arranhadura do gato (DAG), a angiomatose bacilar (AB), além de quadros de bacteremia febril, septicemia e endocardite, entre outras manifestações (ANDERSON & NEUMAN, 1997; BASS, VINCENT, PERSON, 1997a; BASS, VINCENT, PERSON, 1997b; RAOULT, 1999).

MAURIN & RAOULT (1996) referem que “o espectro clínico das manifestações induzidas pela infecção por bartonelas é surpreendente” e WALKER et al. (1996) incluem espécies deste gênero entre as responsáveis por zoonoses bacterianas emergentes. Para SPACH & KOEHLER (1998) o gênero *Bartonella* representa um fascinante grupo de patógenos emergentes.

A verruga peruana é clinicamente indistinguível da AB e ocorre após um quadro febril e imunossupressor chamado de febre de Oroya (GARCIA et al. 1990; GARCIA-CACERES & GARCIA, 1991; MITCHELL & MINNICK, 1995).

Os achados histológicos, nestas doenças, parecem estar relacionados ao estado imunológico do hospedeiro: reação granulomatosa nas lesões da DAG e proliferação vascular na verruga peruana, na AB e na peliose bacilar hepática. A DAG ocorre mais em pacientes imunocompetentes e a AB e a peliose bacilar hepática em imunodeficientes (SPACH, 1992; TOMPKINS, 1994; PIÉMONT & HELLER, 1999).

A resposta imune e a patogênese das bartonelas são pouco conhecidas, e a inexistência de um modelo animal apropriado limita seu estudo (DEHIO & SANDER, 1999). A *B. henselae* pode ser responsável por todas as manifestações clínicas resumidamente descritas acima, exceto a DC e FT, respectivamente causadas pelas *B. bacilliformis* e *B. quintana*.

A infecção experimental vem sendo realizada, predominantemente, em gatos, conhecido reservatório de espécies deste gênero, porém os resultados obtidos nem sempre são concordantes, inclusive os histológicos (CHOMEL et al., 1996; GREENE et al., 1996; HIGGINS et al., 1996; REGNERY et al., 1996; UENO et al., 1996; ABBOTT et al., 1997; GUPTILL et al., 1997; GUPTILL et al., 1998; FOIL et al., 1998).

Há múltiplas variáveis associadas, entre elas a virulência da bactéria, o estado imunológico do hospedeiro, as concentrações dos inóculos, a via de administração e a participação de vetores no desenvolvimento da infecção.

Batterman e colaboradores demonstraram, por microscopia eletrônica, a perda de expressão de fímbrias na *B. henselae* após múltiplas passagens em laboratório, aventando sua importância como determinante da patogênese desta infecção (BATTERMAN et al. 1995).

A formação de granulomas no fígado de camundongos imunocompetentes infectados experimentalmente com *B. henselae* foi obtida após, pelo menos, quatro passagens *in vivo* da bactéria. Na discussão do estudo, é mencionada a possível importância deste procedimento em aumentar a virulência das bactérias (REGNATH et al., 1998).

Camundongos isogênicos imunocompetentes e outros, de mesma linhagem, com a imunidade celular comprometida geneticamente, foram inoculados com a mesma bactéria e apenas os imunodeficientes mostraram alteração clínica, quatro dias depois (VELHO et al., 1998).

No presente projeto de pesquisa, estudaram-se as bartoneloses humanas e as características morfológicas de uma cepa de *B. henselae*, antes e depois da passagem *in vivo*, em camundongos, à microscopia eletrônica de transmissão. Além disso, foram analisadas as alterações determinadas no fígado e no baço desses animais, tanto imunocompetentes quanto imunodeficientes.



*REVISÃO  
BIBLIOGRÁFICA*

## 2.1. AS DOENÇAS

### 2.1.1. Doença de Carrión

A DC é assim chamada porque Daniel Alcides Carrión, em 1885, um estudante de medicina peruano, tentou demonstrar que duas enfermidades endêmicas em seu país, a febre de Oroya e a verruga peruana, eram fases de uma mesma infecção. Inoculou-se com material extraído de paciente com manifestação clínica da verruga peruana, vindo a falecer, durante quadro febril, como o da febre de Oroya.

Duas grandes epidemias de um quadro febril e hemolítico aconteceram, em torno de 1870, durante a construção da linha férrea que ligaria a capital, Lima, à cidade de Oroya, 4 mil metros acima do nível do mar, nos Andes. Mais de 8 mil trabalhadores, procedentes do Chile e de outras regiões do Peru, faleceram nesses episódios, e a doença ficou conhecida como febre de Oroya. (GARCIA-CACERES & GARCIA, 1991; BASS, VINCENT, PERSON, 1997a).

A verruga peruana, primeiramente reportada no século 17 (BASS, VINCENT, PERSON, 1997a), acontecia na mesma região, caracterizando-se por tumores vasculares da pele, da mucosa e dos órgãos internos, que se instalavam insidiosamente em 1-2 meses e duravam meses ou anos. As lesões eram chamadas verrugas.

#### 2.1.1.1. Etiologia

Em 1909, foi creditado a Alberto Barton, médico peruano, a descrição do agente etiológico da DC, a *B. bacilliformis* (BASS, VINCENT, PERSON, 1997a). Ela é parasita intracelular de eritrócitos e células endoteliais, de grande motilidade e pleomórfico. Pequeno, de 0,2 nm a 0,5 nm de diâmetro por 1 nm a 2 nm de comprimento, é multiflagelado-unipolar e cora-se em vermelho-violeta à coloração de Giemsa em esfregaços sangüíneos (GARCIA et al., 1990; BASS, VINCENT, PERSON, 1997a).



ALEXANDER (1995), pelas diferenças clínicas entre a bartonelose ocorrida no Equador e a clássica DC, sugeriu que a doença é causada por outro microorganismo, chamando-o de *B. verrugiforme*. Outra possibilidade para justificar o quadro mais brando observado naquele país seria “um processo de adaptação imunológica entre a população local e o parasita”. É transmitida por artrópodes de hábito noturno, *Lutzomyia verrucarum*, de limitado alcance de vôo. Não existem evidências de reservatórios em animais ou plantas (GARCIA-CACERES & GARCIA, 1991).

### **2.1.1.2. Epidemiologia**

Endêmica entre os paralelos 5°N e 13°S, de leste a oeste dos Andes, entre mil e 3 mil metros acima do nível do mar, a DC se estende do sudoeste da Colômbia, do Equador, até o centro do Peru. (GARCIA-CACERES & GARCIA, 1991).

Descobertas da era pré-colombiana, em artesanias e múmias, reforçam a teoria de que esta doença, em suas duas fases, existe na América do Sul antes da sua colonização (ALEXANDER, 1995; GARCIA-CACERES & GARCIA, 1991).

Nas áreas endêmicas, 60% da população é soropositiva para a bactéria e 10% a 15%, portadora assintomática. Os portadores assintomáticos são o maior reservatório da doença (GARCIA-CACERES & GARCIA, 1991; BASS, VINCENT, PERSON, 1997a).

Casos de verruga peruana fora da área endêmica, como o descrito por MATTEELLI et al. (1994), acontecem entre pessoas que viajam para estas regiões.

### **2.1.1.3. Clínica e tratamento**

#### **2.1.1.3.1. Febre de Oroya**

Em pacientes não imunes à *B. bacilliformis*, a primo infecção pode caracterizar-se por uma febre banal com mialgias e que regride espontaneamente. Porém, em 15% dos casos mantém-se como uma bacteremia crônica assintomática. A infecção também pode ocorrer como uma fase hemolítica aguda, a febre de Oroya, grave, três semanas após a exposição. Evidências não documentadas sugerem que é mais grave em indivíduos não nativos da região. Acompanha febre, que pode ser baixa e insidiosa ou abrupta e alta, mal-estar, mialgias e artralgias.

De 80% a 100% dos eritrócitos circulantes podem ser parasitados. A lise conseqüente pode resultar, em poucos dias, numa queda destes a menos de 1 milhão/mm<sup>3</sup> e haver complicações como dispnéia, angina, delírios e coma. Há infiltração maciça do sistema retículo endotelial caracterizada pela formação de *clumps* bacterianos que ocluem parcialmente a luz capilar e é traduzida, clinicamente, em hepato-espleno e linfonodomegalia.

Em sua revisão, **BASS, VINCENT, PERSON (1997a)** comentaram que um sinal de boa evolução na febre de Oroya é a mudança do formato das bactérias nos eritrócitos, inicialmente bacilares e em grande número, assumindo forma cocóide antes de desaparecerem.

A mortalidade, na era pré-antibiótica, era de 40% a 85% e, ainda hoje, 8% dos pacientes vão a óbito tanto pela anemia grave quanto pela instalação de um estado de imunodeficiência. O paciente fica susceptível a septicemias por gram-negativos, freqüentemente salmonelas, e reativação de infecções concomitantes como tuberculose, toxoplasmose e amebíase. Uma bacteremia assintomática pode persistir até 15 meses depois da fase aguda (**GARCIA et al., 1990; GARCIA-CACERES & GARCIA, 1991; MITCHELL & MINNICK, 1995; RAOULT, 1999**).

O tratamento se faz com tetraciclina ou cloranfenicol, sendo este último preferido por sua ação contra salmonelas. A resposta é rápida, interrompendo esta fase. Transfusão sangüínea, por vezes, se faz necessária.

Para **GARCIA-CACERES & GARCIA (1991)**, esta forma de imunodeficiência adquirida causada na febre de Oroya é peculiar, de graus variados, e necessita de maiores estudos para sua compreensão. Ela é comprovada pela negatificação dos testes tuberculínicos e de reações de fixação de complemento. Igualmente, há uma inversão da relação de linfócitos T helper/supressor.

### 2.1.1.3.2. Verruga peruana

De duas a oito semanas após a aparente recuperação da fase febril, o paciente pode apresentar lesões angiomatosas, papulosas, pápulo-tumorais ou nodulares. Estas lesões, de 0,2 a 4 cm de diâmetro, aparecem em surtos, predominantemente na face e nas extremidades. Podem persistir por meses ou até anos e ser acompanhadas de febre, dores ósseas e/ou articulares. A gravidade da erupção é variável e parece não estar relacionada ao tratamento antibiótico prévio. Esta é a fase tecidual e crônica da DC. É autolimitada e não deixa cicatrizes, exceto quando as lesões se infectam secundariamente. (GARCIA-CACERES & GARCIA, 1991; ALEXANDER, 1995).

Três formas de lesões cutâneas são descritas. Uma erupção miliar, com pápulas de 0,2 a 0,3 mm de diâmetro, outra com lesões com 8 a 10 mm e, ocasionalmente, lesões dolorosas, grandes e profundas, próximas a articulações e que podem ulcerar e sangrar (BASS, VINCENT, PERSON, 1997a).

A verruga peruana reflete uma imunidade parcial à *B. bacilliformis* (NOSAL, 1997). Histologicamente, as lesões da verruga peruana mostram proliferação de células endoteliais da vasculatura terminal da derme e subcutâneo. Importante achado é o infiltrado inflamatório, agudo e crônico, mesmo em lesões não-ulceradas, que acompanha a presença de *B. bacilliformis* no interstício e no interior das células endoteliais. Nestas células podem estar contidas em vacúolos, estruturas citoplasmáticas, chamadas de inclusões de Rocha-Lima. As lesões podem ter vasos mais diferenciados e ectásicos, clínica e histologicamente semelhantes ao granuloma piogênico. Atípicas celulares podem ser encontradas, especialmente em lesões mais sólidas, com luzes inaparentes e células fusiformes que lembram o sarcoma de Kaposi.

A AB, outra bartonelose, se não pelos dados epidemiológicos, pode ser indistinguível da verruga peruana.

A eficácia antibiótica nesta fase é questionável (BASS, VINCENT, PERSON, 1997a).

#### **2.1.1.4. Diagnóstico**

O diagnóstico é mais frequentemente estabelecido pela cultura da bartonela ou sua observação em esfregaços sangüíneos corados com Giemsa, na fase febril. Nas verrugas, o agente pode ser observado em cortes histológicos corados também com o Giemsa, no citoplasma de células endoteliais (BASS, VINCENT, PERSON, 1997a).

#### **2.1.2. Febre das trincheiras**

A FT foi reconhecida como entidade clínica na epidemia da Primeira Grande Guerra, em 1915. A febre causada pela *B. quintana* foi raramente relatada afora as epidemias relacionadas às guerras mundiais. Contudo, é provável que, desde a Idade Média, a doença já fosse conhecida (MAURIN & RAOULT, 1996).

Na primeira epidemia é estimado que mais de 1 milhão de pessoas tenham sido afetadas, predominando em militares, tanto das tropas alemãs quanto dos aliados.

Adquirida, provavelmente, por soldados alemães da população russa, onde a infecção era endêmica, esta disseminou-se por toda a Europa. Com o final da guerra, houve declínio acentuado da epidemia e, assim, o seu interesse médico. Com a Segunda Guerra Mundial, a infecção tornou-se reemergente. Manteve-se endêmica na Polônia, Leste Europeu, no norte da África, na Rússia e, possivelmente, na China (BASS, VINCENT, PERSON, 1997a).

##### **2.1.2.1. Etiologia**

Como inicialmente imaginou-se que o agente causador era um parasita intracelular obrigatório, este foi considerado uma riquetsia. Entre outros nomes, foi-lhe proposto *Rickettsia rocha-limae* (MAURIN & RAOULT, 1996) em homenagem ao Dr. Henrique da Rocha Lima, grande anatomopatologista brasileiro, estudioso do tifo exantemático e outras riquetsioses.

Com o isolamento do agente a partir de amostras sangüíneas de pacientes com FT em meio de ágar-sangue sem células, este já não mais poderia ser considerado no gênero *Rickettsia*, sendo criado então o gênero *Rochalimaea*. Foram VINSON, VARELA, MOLINA-PASQUEL (1969) que satisfizeram os postulados de Koch, induzindo a clínica da FT em voluntários inoculados com *Rochalimaea quintana*, isolada de pacientes com a doença, definindo assim sua etiologia.

Em 1993, BRENNER et al. sugeriram a transferência de todas as espécies deste gênero para o gênero *Bartonella*, família *Bartonellaceae*, removendo-as da ordem *Rickettsiales*, baseados em relações filogenéticas e na inexistência de patógeno intracelular obrigatório entre as bartonelas.

Foi também Rocha Lima quem demonstrou a posição extracelular da bactéria no lúmen intestinal de piolhos, inferindo que o relacionamento entre eles é de comensalismo. Foi uma das confirmações de que estes artrópodes eram vetores da infecção, justificando a efetividade de medidas de desinfestação no controle da transmissão da doença, tomadas já durante a primeira epidemia (MAURIN & RAOUT, 1996).

A observação de médicos oficiais foi de que “a doença ocorria primariamente quando um número grande de pessoas vivia junto, em circunstâncias apertadas e não-higiênicas”. Embora o piolho da cabeça seja capaz de transmitir a doença experimentalmente, é o piolho do corpo (*Pediculus humanus* var. *corporis*) o vetor mais envolvido, podendo transmitir a doença a voluntários susceptíveis, cinco a dez dias após o contato com pessoas infectadas.

A *B. quintana* foi demonstrada na saliva e nas fezes dos piolhos e infectam o homem quando a pele está lesada. As fezes secas dos piolhos mantêm-se infectantes por vários meses. Em circunstâncias epidêmicas, piolhos foram coletados de 15% a 40% de pessoas aparentemente saudáveis. O agente pode ser isolado da saliva e da urina dos doentes. A presença de *B. quintana* em carrapatos recuperados de pacientes com quadro semelhante à FT, no norte da África, já foi referida (MAURIN & RAOULT, 1996; BASS, VINCENT, PERSON, 1997a).

### 2.1.2.2. Epidemiologia

De distribuição possivelmente universal, a *B. quintana* causa infecção de forma endêmica ou epidêmica, sobretudo em populações com prevalente infestação por piolhos, com más condições de higiene pessoal e de saneamento (MAURIN & RAOULT, 1996).

Em nossos dias, a descrição de quadros febris em indigentes (SPACH et al., 1995) causados pela mesma bactéria tem sugerido menção de “febre das trincheiras urbanas dos dias modernos” (ANDERSON & NEUMAN, 1997).

A reemergência da FT foi confirmada em Marselha, em Seattle, em Baltimore e em Burundi, sempre associadas a condições humildes de vida. Dos pacientes sem domicílio avaliados em Marselha, 30% eram sorologicamente positivos para *B. quintana*. Neste trabalho há referência sobre a soropositividade de 20% entre aqueles de Seattle e 10% de soropositividade entre os usuários de droga avaliados em Baltimore. De 104 profissionais que trabalhavam com piolhos em um laboratório polonês, após a Segunda Grande Guerra, 90 desenvolveram FT e, dentre os 14 restantes, aparentemente assintomáticos, cinco desenvolveram bacteremia crônica e baixos títulos de anticorpos. Nesse trabalho, o isolamento de *B. quintana* foi obtido de hemoculturas de pacientes que tinham tido FT há mais de oito anos (BROUQUI et al., 1999).

### 2.1.2.3. Clínica

A doença é também conhecida como febre quintana ou dos cinco dias, febre da perna ou da tíbia, dadas suas manifestações clínicas, e, ainda, febre de Wolhynian, distrito polonês onde a doença aconteceu de forma epidêmica.

Com período de incubação de 15 a 25 dias, a FT pode ser assintomática até doença grave. Aproximadamente metade dos infectados tem um quadro gripal, de instalação abrupta, porém, sem sintomas respiratórios e de curta duração. Pode ocorrer febre alta e prolongada por semanas, sugerindo febre tifóide (BASS, VINCENT, PERSON, 1997a; RAOULT, 1999).

As manifestações observadas classicamente nas tropas eram de episódios febris de instalação aguda. Duravam de três a cinco dias, com pico em torno de 40° C nos primeiros dias, quando sintomas como cefaléia frontal e retro-ocular e dor nos ossos, sobretudo os ossos longos das pernas, eram também mais intensos. Pródomo de dois ou mais dias acontecia.

Os sintomas sofriam remissão por vários dias, com exacerbação clínica paroxística três a cinco vezes, ou mais, num período de aproximadamente um ano. Recaídas em indivíduos saudáveis, após este período, já foram descritas.

Usualmente, os ataques sucessivos diminuía em intensidade. Fraqueza, mal-estar, dispnéia, vertigem, dores lombares e abdominais, calafrios, sudorese intensa, diarreia, constipação, anorexia, náusea, agitação e insônia podiam acompanhar o quadro. Língua saburrosa, enantema conjuntival e dor no aparelho locomotor eram também freqüentes. (MAURIN & RAOULT, 1996).

Máculas ou pápulas eritematosas com 1 cm de diâmetro eram observadas no tronco da maioria dos pacientes. Esplenomegalia ocorria já no primeiro dia de doença (BASS, VINCENT, PERSON, 1997a).

Sintomas neurológicos como depressão e resposta anormal a estímulos foram relatados (MAURIN & RAOULT, 1996).

Formas crônicas, raramente relatadas, manifestavam-se por uma astenia importante associadas a episódios subfebris repetidos.

Leucocitose, às custas de polimorfonucleares, freqüentemente acompanhavam estágios febris da doença. Anemia também podia acontecer (RAOULT, 1999).

Estudos em voluntários mostraram que há susceptibilidade a reinfecção com três a seis meses do quadro inicial, embora anticorpos específicos possam ser detectados após semanas da primeira infecção, podendo persistir por anos (BASS, VINCENT, PERSON, 1997a).

Considerando as descrições de bacteremias por *B. quintana*, especialmente entre pacientes não domiciliados, pode-se imaginar que, transmitida a bactéria por um piolho infectado, algumas pessoas desenvolverão o quadro clássico e agudo da FT e outras, infecção crônica. Estes poderão desenvolver linfonodopatia crônica e, especialmente os imunodeficientes, AB, sem comprometimento hepático (BROUQUI et al., 1999).

#### **2.1.2.4. Diagnóstico**

Fora das epidemias, o diagnóstico clínico não é possível pela similaridade com várias doenças agudas e crônicas.

O principal diagnóstico diferencial é com tifo exantemático, em pacientes com infestação por piolhos do corpo, embora este apresente um quadro cutâneo mais exuberante e mortalidade significativa.

Cultura para o isolamento do agente, sorologia e técnicas moleculares serão referidas adiante.

#### **2.1.2.5. Tratamento**

Não existem trabalhos controlados sobre a susceptibilidade antibiótica de pacientes com FT. Contudo, resposta dramática tem sido observada com o uso de tetraciclina ou cloranfenicol, com desaparecimento dos sintomas em um a dois dias. Alguns pacientes tratados, porém, apresentaram recrudescência, não se conhecendo o real efeito destas drogas sobre o agente (BASS, VINCENT, PERSON, 1997a).

### **2.1.3. Doença da arranhadura do gato**

Robert Debré, professor de pediatria na Universidade de Paris, já em 1931, observou um menino com adenite supurativa epitroclear e múltiplas arranhaduras de gato na mão homolateral. Mas só em 1950, este mesmo professor e seus colaboradores fizeram a primeira publicação da doença que já chamavam de DAG (CARITHERS, 1985). Ela já era conhecida como entidade clínica, tanto que, em 1946, Harry Rose aspirou dos linfonodos



de seu colega Franklin Hanger, que havia sido arranhado por seu gato, 20 ml de conteúdo purulento, utilizando este material como antígeno para a realização de testes intradérmicos. Houve intensa reação em Hanger e também em pacientes com adenites seguidas a arranhaduras de gatos. Deste então, o teste intradérmico de Rose e Hanger passou a ajudar no diagnóstico de casos suspeitos (CARITHERS, 1970).

### 2.1.3.1. Etiologia

A etiologia da linforreticulose benigna, como também é chamada, foi objeto de várias investigações. Entre os agentes que foram implicados como responsáveis, estão vírus, micobactéria atípica e clamídia (HADFIELD et al., 1985).

Em 1983, WEAR et al. identificaram, à coloração de Warthin-Starry e de Brown-Hopp, pequenos bacilos argirófilos e gram-negativos, pleomórficos, isolados, em cadeias ou agrupados, encontrados na parede dos capilares, em macrófagos ao longo dos sinusóides e próximos ao centro germinativo de linfonodos de pacientes com diagnóstico de DAG. Utilizando soro de pacientes convalescentes, coraram intensamente estas bactérias com técnica de imunoperoxidase, o que não acontecia com soro de indivíduos sem história de tal doença.

Demonstraram depois a presença de microorganismos, com a mesma morfologia na lesão cutânea primária de três pacientes com DAG (MARGILETH et al., 1984) e isolaram, a partir do cultivo de dez linfonodos acometidos, bactéria idêntica à já demonstrada em tecidos, que foi chamada de “bacilo da doença da arranhadura do gato” (ENGLISH et al., 1988).

Uma cepa isolada foi enviada ao *Center for Disease Control* (CDC) e foi identificada, com outras três cepas isoladas de pacientes com a mesma doença. Um novo gênero foi proposto: *Afipia* (Afip do acróstico de *Armed Forces Institute of Pathology*), onde foi primeiramente identificado por WEAR et al. (1983). A espécie foi chamada de *felis* pela sua relação com o gato doméstico, *Felis domesticus*, suposto reservatório do agente (BRENNER et al., 1991). Assim, a *Afipia felis* foi considerada o agente da DAG.

Na revisão de **SLHESSARENKO (1998)**, há referência a vários estudos questionando tal fato, porém, além dos casos inicialmente isolados pelo grupo de Wear e English, **BRENNER et al. (1991)** isolaram a *A. felis* de linfonodos de dois pacientes pediátricos.

Outros autores relataram o isolamento da bactéria isolada ou associada a outro agente posteriormente descrito, a *B. henselae*, em espécimes de pacientes com DAG. **GILADI et al. (1998)** concluem que raramente a *A. felis* é causa isolada da DAG e que evidências indiretas sugerem que deva ser muito mais associada à etiologia do que normalmente se considera.

A *A. felis* possivelmente integra a microbiota fixadora de nitrogênio que habita solo e água. (**BERGMANS et al., 1995**).

Em 1990, **SLATER et al.** reconheceram um novo patógeno gram-negativo, responsável por quadros de febre e bacteremia persistente em pacientes imunodeficientes e imunocompetentes. Observou-se semelhança deste organismo com a então chamada *Rochalimeae quintana*.

**RELMAN et al. (1990)** identificaram, em pacientes imunodeficientes com AB, utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) seqüências gênicas de microorganismos intimamente relacionados a *R. quintana*. Comparando-os com os de bacilos visualizados nas lesões da DAG, sugeriram ser o agente etiológico desta doença.

**REGNERY et al. (1992a)** cultivaram um bacilo do sangue de um paciente febril e soropositivo para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), e a análise bioquímica, microscópica, molecular e da composição dos ácidos graxos caracterizou o microorganismo como pertencente ao gênero *Rochalimeae*. Outros microorganismos, independentemente isolados, inclusive o de **SLATER et al. (1990)**, de Oklahoma, foram comparados e, utilizando a PCR com polimorfismos do comprimento de fragmentos de restrição, RFLP, foram considerados idênticos àquele que **REGNERY et al. (1992a)** chamaram de Houston-1. Todos eles diferiam das outras duas espécies do gênero já conhecidas. Nova espécie foi então criada para caracterizar estas bactérias, sendo chamada de *R. henselae*, em homenagem a

Diane Hensel, microbiologista que se destacou no isolamento e na identificação das mesmas. No mesmo número da revista, **WELCH et al. (1992)**, que trabalhavam em cooperação com os primeiros, mostravam que, além de bacteremia febril, esta nova espécie causava também septicemia, AB e peliose bacilar hepática.

No mesmo ano, **REGNERY, MARTIN, OLSON (1992)** publicaram o isolamento da *R. henselae* do sangue de um gato assintomático, o que se repetiu três semanas após. Com esta observação, os autores concluíram que gatos serviam de reservatórios para estas bactérias. Ainda neste ano, **REGNERY et al. (1992b)** utilizando teste de imunofluorescência indireta relataram o achado de anticorpos contra *R. henselae* no soro de 88% de 41 pacientes com diagnóstico clínico de DAG e em 3% de um grupo controle de 107 indivíduos. Os mesmos grupos, testados pela mesma técnica, não detectaram anticorpos contra *A. felis*. Também mostravam, por PCR, que em cinco reagentes para intradermoreação, utilizados no diagnóstico desta doença, o DNA encontrado era de *R. henselae* e não de *A. felis*.

**DOLAN et al. (1993)** descreveram o isolamento de *R. henselae* dos linfonodos de dois pacientes com manifestação clássica da DAG. Assim, as evidências indiretas da etiologia da doença por este microorganismo se confirmaram.

Como já referido, após a sugestão de **BRENNER et al. (1993)** de transferir todas as *Rochalimeae* spp. para o gênero *Bartonella*, esta classificação foi amplamente aceita. Posteriormente, houve reconhecimento de que a *B. henselae* é o agente causador da maioria dos casos.

**ANDERSON & NEUMAN, em 1997**, referiram existir uma pequena, mas significativa, porcentagem de pacientes com DAG que não apresentavam evidências de infecção por bartonelas. Este índice chega de 5% a 15%, quando a avaliação sorológica é conduzida em pacientes com critérios rígidos de diagnóstico da linforreticulose benigna. Para eles, o papel da *A. felis* na etiopatogenia da doença ainda precisava ser mais bem estabelecido.

Cogitaram que este microorganismo fosse capaz de causar linfonodomegalia e sintomas clínicos, como os encontrados na DAG. Porém, novos estudos seriam necessários para definir sua participação, ou, talvez, de outros agentes, na etiologia desta porcentagem de casos em que a *B. henselae* não parecia ser a responsável.

Uma nova espécie de bartonela foi descrita em 1996 por LAWSON & COLLINS e chamada de *B. clarridgeiae*. Ela foi isolada de um gato, cujo dono apresentava septicemia por *B. henselae*. KORDICK et al. em 1997, isolaram este patógeno de um veterinário com quadro de DAG. Sua relevância, no contexto da DAG, ainda permanece obscura, como já havia mencionado REGNERY et al. (1996).

Neste último trabalho, os autores comentam que, embora a sororreatividade a antígenos de *B. quintana* tenha sido observada em vários pacientes com DAG, este microorganismo nunca havia sido recuperado de pacientes com o quadro clínico e nem mesmo de gatos. Nenhuma outra espécie de bartonela descrita, além da *B. henselae* e *B. clarridgeiae*, era associada a esta doença.

Recentemente, AZEVEDO et al. (2000) descreveram caso brasileiro da doença típica causada por *B. quintana*.

### 2.1.3.2. Epidemiologia

DEHIO & SANDER (1999) referiram que a doença é descrita na maioria dos países do mundo e é a mais freqüente expressão da infecção por bartonelas. É uma doença comum, sendo a principal causa de linfonodomegalia benigna em crianças e adultos jovens. Nos Estados Unidos da América, em todas as suas regiões, são aproximadamente 24 mil casos ao ano com mais de 2 mil internações anuais (BASS, VINCENT, PERSON, 1997b; LOUTIT, 1997).

O envolvimento do gato doméstico, *Felis domesticus*, é reconhecido mesmo antes da descrição da doença, como já mencionado. CHOMEL et al. (1996) comentam que um terço dos lares norte-americanos tem pelo menos um gato.

Na Holanda, a incidência de DAG é de 2 mil casos por ano, e a prevalência de gatos bacterêmicos estimada em 400 mil (BERGMANS et al., 1997a).

Sua relação nesta zoonose é tão importante que o contato com gatos é um dos critérios diagnósticos. Porém, numa pequena porcentagem de pacientes, a história de contato com animais não está presente. Achados sugerem que cachorros domésticos, como os gatos, também sirvam de reservatório para a *B. henselae* (MARGILETH, 1993; TSUKAHARA et al., 1998).

CARITHERS (1985) propôs que o agente entraria em contato com o organismo por meio de uma perda de continuidade da pele a partir do contato com o gato, presente em 99,1% dos 1.200 pacientes por ele acompanhados. Para ele, tanto a mordida de outros mamíferos, quanto a transmissão por objetos inanimados estaria descartada.

Para BASS, VINCENT, PERSON (1997b), em sua revisão, a incidência da DAG é proporcional à densidade da população de gatos, a idade deles e a exposição da população a estes; também à prevalência e ao grau da infestação por pulgas, *Ctenocephalides felis*, a climas quentes e úmidos, relacionados com posição geográfica e sazonalidade.

ZANGWILL et al. (1993) encontraram que pacientes com DAG mais freqüentemente eram proprietários de um gato de 12 meses ou menos, com pulgas ou carrapato, não completamente domiciliados e que foram arranhados ou mordidos por ele. Em seu estudo, do tipo caso-controle, concluíram que, ser arranhado ou mordido por filhotes de gato trazia um risco sete vezes maior de contrair a doença em relação aos indivíduos que não possuíam estes animais. A presença de filhotes com pulgas aumentava em dez vezes o risco de adoecer em relação aos que não possuíam gatos.

Para eles, a maior ocorrência da doença no outono e no inverno se justificaria pelo fato de as gatas, com freqüência, iniciarem uma gestação na primavera ou no começo do outono, estando os filhotes aptos à transmissão no final do verão. Também, nesta época, a procriação de pulgas atinge seu pico. BOYLER & CHERRY (1992) mencionam que esta variação sazonal ocorre em países de clima temperado, não sendo observada em países tropicais.

**CHOMEL et al. (1996)**, retirando pulgas de gatos bacterêmicos e colocando-as em filhotes SPF (livre de patógenos específicos), em condições controladas, demonstraram que estes se tornaram bacterêmicos, o que não aconteceu com estes animais, quando colocados para conviver com gatos bacterêmicos sem pulgas. Comprovaram, assim, a transmissão entre gatos pelas pulgas e o seu potencial envolvimento, indireto, porém substancial, na doença humana, por amplificar o tamanho do reservatório felino.

Os gatos normalmente são assintomáticos, mesmo quando bacterêmicos. Isto vem sendo demonstrado por trabalhos experimentais com gatos e será discutido mais a frente.

Estudos têm sido conduzidos por todo o mundo demonstrando altos índices de soroprevalência e bacteremia nestes animais, conforme revêem **BERGMANS et al. (1997a)**.

Trabalho sobre soroprevalência à infecção por *B. henselae* realizado no Brasil foi conduzido na cidade de São Paulo, demonstrando que de 102 gatos não domiciliados, do Centro de Zoonoses, 46% possuíam anticorpos anti-*B. henselae* (**SLHESSARENKO et al., 1996**).

A transmissão inter-humana não é referida, segundo **BASS, VINCENT, PERSON (1997b)**.

Embora **ZANGWILL et al. (1993)**, em estudo epidemiológico com 60 pacientes, tenham sugerido que a doença seja mais comum em adultos do que anteriormente reconhecido em publicações por pediatras, a doença é mais incidente em pacientes menores de 18 anos de idade. Para **CARITHERS (1985)**, avaliando 1.200 pacientes, o pico de incidência foi entre 3 e 10 anos.

Parece não haver diferença no acometimento entre sexos, com os trabalhos mostrando índices ora pouco maiores para o sexo feminino, ora o masculino, como exemplificam, respectivamente, os dois últimos trabalhos citados.

**CARITHERS, em 1985**, mencionou que a doença não acontecia em epidemias e parecia não ser facilmente adquirida, reportando-se à baixa ocorrência de mais de um caso na mesma família, mesmo quando esta possui várias crianças. Referiu, porém, que muitas

peessoas tinham a doença sem reconhecê-la, justificando o desenvolvimento de imunidade sugerido pela positividade do teste cutâneo. Em 578 contactantes familiares de seus pacientes, 18,5% tinham a reação positiva. Mencionou também a positividade em 36% dos contactantes familiares que referiam gostar de gatos contra 0,8% naqueles que não gostavam deles. Retestando 12 pacientes com mais de 10 anos de história da doença, todos foram positivos, sugerindo que o mesmo se mantenha positivo por toda a vida.

No estudo de **DALTON et al. (1995)** os títulos mais altos de anticorpos anti-*B. henselae* detectados no CDC foram seis a oito semanas após a instalação da doença e declinaram depois, mantendo anticorpos detectáveis por um ano.

**BASS, VINCENT, PERSON (1997b)**, considerando que a recorrência da doença é rara, supõem haver imunidade por toda a vida.

Tem sido descrita em vários pacientes soropositivos para o HIV, com Aids (síndrome da imunodeficiência adquirida humana) ou não (**GUCCION et al., 1996; LOUTIT, 1997**).

### **2.1.3.3. Clínica**

A doença é benigna, subaguda e autolimitada, podendo estar associada a significativa morbidade. Os raros relatos de morte durante quadro de encefalite foram questionados por **BASS, VINCENT, PERSON, (1997b)**. Estes autores referem que a forma clássica da doença vem sendo chamada de DAG típica e as demais manifestações clínicas como atípicas.

#### **2.1.3.3.1. Doença típica**

Acontece em pacientes imunocompetentes e tem curso clínico bastante previsível.

É observada em 89% dos casos, segundo **SCHWARTZMAN (1992)**.

O período de incubação é de poucos dias a várias semanas. Segundo **CARITHERS (1985)** de três a cinco dias do trauma cutâneo ao aparecimento da lesão primária. Esta caracteriza-se por uma pápula eritematosa, não-pruriginosa, no local do trauma ou numa extremidade deste, quando se trata de arranhadura. Em dois a três dias torna-se vesiculosa e crostosa, permanecendo por alguns dias, envolvendo para uma mácula de até dois a três meses de duração. Este autor tem o maior índice de encontro da lesão primária, 92,6% dos pacientes, em sua maior série. Sua presença deve ser exaustivamente procurada na história e no exame físico e uma cicatriz superficial, lembrando a cicatriz deixada pela varicela, poderá ser encontrada após este período. Seu tamanho é de poucos milímetros a 1 cm de diâmetro. No couro cabeludo, embora freqüente, pode ser de difícil visualização. Para **NOSAL (1997)**, em 50% dos casos está localizada nos membros superiores. Pode apresentar-se como pústula ou nódulo e evoluir com ulceração.

A linfonodomegalia unilateral é considerada a marca da doença. **CARITHERS (1985)** encontrou 85% dos seus 1.200 pacientes com comprometimento de um só linfonodo.

Quando há linfonodopatia de mais de um gânglio, usualmente dois ou no máximo quatro linfonodos são acometidos. O raro comprometimento não contíguo de linfonodos corresponde à inoculação em diferentes sítios ou muito próximo à linha média.

O crescimento do linfonodo se dá de uma a três semanas. O aumento do volume é progressivo e atinge 5 cm em média, podendo chegar a até 12 cm. É móvel, fibroelástico e não aderido a planos profundos. Mantem-se estacionário por duas a três semanas e envolvem em mais duas ou três semanas, com duração total da doença de dois a três meses. Alguns casos são mais protraídos, podendo durar vários meses. A pele suprajacente pode tornar-se tensa, quente e eritematosa. Pode ocorrer flutuação do linfonodo e supuração em 10% dos casos, se não forem drenados, o que se deveria fazer por aspiração com agulha (**MARGILETH, 1993; BASS, VINCENT, PERSON, 1997b**).

Como a linfonodomegalia é regional e a maior parte dos ferimentos com gatos acontece nos braços e nas mãos, os linfonodos mais acometidos são, em ordem decrescente, axilares, cervicais, submandibulares, inguinais, pré-auriculares, femurais, claviculares e epitrocleares.



A febre, em geral, é baixa ou moderada (37,8°C a 39,5°C), de aproximadamente sete dias de duração. Para os 1.200 casos relatados por **CARITHERS (1985)**, 41% não apresentaram febre e apenas 9% tiveram temperatura maior de 39°C. Alguns pacientes tiveram anorexia, mal-estar, cefaléia, artralgia e mialgia.

### **2.1.3.3.2. Doença atípica**

Um aparente aumento na incidência de casos atípicos tem sido observado na literatura que, segundo **BASS, VINCENT, PERSON (1997b)**, reflete um maior reconhecimento clínico destas formas.

Pacientes com febre alta ou com linfonodos bilateralmente acometidos são raros e portanto atípicos. Outras manifestações não usuais são:

#### **2.1.3.3.2.1. Síndrome oculoglandular de Parinaud (SOGP)**

A síndrome foi descrita por Parinaud, no final do século 19. Referia-se a três pacientes com um tecido de granulação envolvendo a conjuntiva e não a córnea, com regressão espontânea em 4-5 meses, sem deixar cicatrizes e com linfonodopatia pré-auricular ipsilateral que evoluiu para supuração antes da quinta semana e mantiveram-se enfartados. (**WEAR et al. 1985**).

Caracteriza-se por conjuntivite unilateral acompanhada de linfonodopatia regional.

Várias doenças já foram associadas ao quadro, entre elas tuberculose, tularemia, sífilis e linfogranuloma venéreo. **PRESME & MARCHAND (1950)** associaram-na a DAG.

É a manifestação atípica mais freqüente. Dos 1.200 pacientes acompanhados por **CARITHERS (1985)**, 5% tiveram apresentação não-clássica e, destes, 80% a SOGP.

Segundo **HUANG & DREYER (1996)**, a DAG é a causa mais freqüente desta síndrome.

A inoculação, embora possa ser direta, provavelmente seja veiculada pelas mãos do paciente. A conjuntiva palpebral é acometida com maior freqüência e apresenta tecido de granulação de diferentes tamanhos. É indolor, não-pruriginosa e não-purulenta (**CARITHERS, 1985**).

#### **2.1.3.3.2.2. Manifestações neurológicas**

A encefalite é a manifestação neurológica mais freqüente. Publicado por **STEVENS (1952)**, o primeiro caso ocorreu em um menino com adenopatia epitroclear e axilar à direita e febre. Uma semana após o início do quadro apresentou crise convulsiva generalizada que se repetiu várias vezes nos dias seguintes. O teste cutâneo para a DAG foi positivo. Nesta mesma revisão relata-se que a encefalopatia acontece uma a seis semanas após o aparecimento da adenopatia, sendo acompanhada de febre em 50% dos pacientes. A convulsão é freqüentemente o primeiro sinal de envolvimento neurológico e pode ser focal ou generalizada, durando de poucos minutos a um estado de mal convulsivo. A melhora é usualmente rápida e acontece com 2 a 14 dias de doença.

Toda criança em estado de mal convulsivo deve ser cuidadosamente examinada à procura de adenomegalia, bem como investigado contato prévio com gatos. Outra alteração pode ser a súbita alteração do nível de consciência, variando de letargia a coma.

O líquido é normal na maioria dos casos e, quando alterado, mostra discreta pleocitose às custas de linfócitos (**CARITHERS, 1985**).

Além da encefalopatia, pode ocorrer a síndrome da neuroretinite estrelar de Leber, caracterizada por perda visual com escotoma central, unilateral na maioria dos casos, edema do disco óptico e formação estrelar a partir da mácula. Acomete crianças e adultos jovens. A síndrome foi associada à DAG na década de 70. **BASS, VINCENT, PERSON (1997b)** concluíram que a *B. henselae* deve ser a causa mais freqüente desta

síndrome. Quando diagnosticada como o agente, um prognóstico favorável pode ser antecipado ao paciente, com resolução e recuperação completa da visão em um a três meses.

**O'HALLORAN et al. (1998)** relatam um caso de neuroretinite estrelar de Leber causado pela *B. elizabethae*, conforme sugerido por sorologia.

Diversas outras formas de envolvimento do SNC foram associadas à DAG, entre elas mielite transversa, radiculites, neurites periféricas, ataxia cerebelar e paralisia de Bell (**SLHESSARENKO, 1998**).

#### **2.1.3.3.2.3. Outras**

Para **RAOULT (1999)** as formas crônicas seriam 1,5% dos casos e se manifestariam por adenopatias múltiplas, persistentes por meses e de evolução recorrente, sendo acompanhada por uma febre prolongada, mal-estar geral e mialgia.

Febre alta e persistente e outros elementos como dor abdominal, sintomas constitucionais, linfonodomegalia periférica ou abdominal podem estar associados a alterações tomográficas ou ultra-sonográficas de comprometimento hepático e/ou esplênico. Nestes casos, mesmo que não haja evidência clínica ou laboratorial de agressão hepática, os granulomas são positivos para exames específicos de identificação da bartonela (**BASS, VINCENT, PERSON, 1997b; SLHESSARENKO, 1998**).

Púrpura trombocitopênica, embora rara, pode ser grave. Exantema máculo-papular, eritema anular, eritema multiforme e eritema nodoso são para **WARWICK (1967)** as expressões cutâneas que acompanham a DAG. Para este autor, o eritema nodoso é o mais freqüente deles no que concorda **CARITHERS (1985)** que não considera uma surpresa esta associação, já que o eritema nodoso aparece no curso de outras doenças granulomatosas, como tuberculose e sarcoidose.

Na revisão de **SLHESSARENKO (1998)**, manifestações das vias aéreas podem comprometer da faringe ao parênquima pulmonar e pleura com formação de empiema.

Pode haver concomitância com linfonomegalia mediastinal, além da periférica. Boa evolução também é esperada, mesmo sendo necessário, por vezes, suporte ventilatório. Comprometimento osteoarticular são raros. As lesões são osteolíticas e podem ser contínuas ao linfonodo acometido ou apresentarem-se a distância, sugerindo disseminação hematogênica. Anemia hemolítica não imune também já foi descrita. Para ela está indicada a pesquisa de *B. henselae* em todos os casos de processos inflamatórios intra-oculares de origem desconhecida, sejam uveítes, vitrites, retinites e neurites. Os pacientes podem apresentar apenas sinais e sintomas oculares como a turvação visual, a diminuição ou a perda da visão.

**MARGILETH, WEAR, ENGLISH (1987)**, comparando pacientes com manifestação atípica com os da forma clássica, observou que os primeiros tinham febre prolongada, fraqueza e mal-estar, mialgia, artralgia, perda de peso e esplenomegalia.

Casos de DAG em pacientes imunodeficientes foram descritos mostrando evolução mais agressiva e disseminada (**ANDERSON & NEWMAN, 1997; BASS, VINCENT, PERSON, 1997b; LOUTIT, 1997**).

#### **2.1.3.4. Diagnóstico**

Na prática, para a maioria dos médicos, o diagnóstico é clínico (**LOUTIT, 1997**).

Os critérios mais aceitos para o diagnóstico da DAG típica são os trazidos por **SLHESSARENKO (1998)** em sua revisão: (1) história de contato com gatos, (2) exclusão de outras causas de adenopatias por testes sorológicos, culturas e testes cutâneos, (3) reação de Rose e Hanger positiva, (4) padrão histológico característico, especialmente pela demonstração de bacilos pleomórficos pela impregnação pela prata.

Epidemiologicamente, **ZANGWILL et al. (1993)** diagnosticavam DAG em pacientes com adenomegalia sem causa aparente e proprietários de, pelo menos, um filhote de gato, no período de três meses, antes do início dos sintomas.

O teste cutâneo, embora tenha sido muito utilizado no diagnóstico desta doença, tem sido preterido em virtude de novas técnicas disponíveis. **BASS, VINCENT, PERSON (1997b)** consideraram-no pouco seguro, sem padronização e sem aprovação pelas autoridades de saúde. Com a descoberta do principal agente, o diagnóstico pode ser feito

por meio de cultura, sorologia, imuno-histoquímica e técnicas moleculares (ANDERSON & NEUMAN, 1997).

Diagnóstico microbiológico, sorológico e por técnicas moleculares para identificação da *B. henselae* serão discutidos adiante.

O exame anatomopatológico, embora característico, não é patognomônico de DAG.

Os achados histológicos na lesão primária e no linfonodo acometido são semelhantes, constituindo-se de formação de granulomas com área necrótica central, circundadas por linfócitos e histiócitos e com infiltrado neutrofílico. O pus pode estar loculado, o que tem importância durante a aspiração. Difere das demais doenças granulomatosas porque nestas não é comum o encontro de microabscessos e granulomas concomitantemente (SLHESARENKO, 1998). Os achados histopatológicos em linfonodos podem ser confundidos com aqueles encontrados na doença de Hodgkin, inclusive com células semelhantes às de Reed-Stenberg (GUCCION et al., 1996).

LOUTIT (1997) mencionou que os organismos são encontrados no infiltrado neutrofílico inicial e nos granulomas recém-formados sendo só raramente demonstrável em granulomas maduros.

À coloração de Warthin-Starry, bacilos delicados e pleomórficos poderão ser visualizados, no foco de necrose. Aparecem isolados, em cadeias, em *clumps* e, por vezes, como filamentos. Medem 0,5 µm de diâmetro e de 0,5 µm a 2,5 µm de comprimento.

WEAR, MARGILETH, HADFIELD (1983) descreveram a visualização, primariamente, nas paredes dos vasos sanguíneos, nos macrófagos, nos centros germinativos e nos microabscessos. A quantidade de bacilos é maior nas fases iniciais da infecção e rara nos granulomas maduros.

A microscopia eletrônica, embora possibilite diagnóstico presuntivo pelo encontro dos bacilos, não pode diferir as espécies. HADFIELD et al. (1985) descreveram-nos como intracelulares e encontrados em *clumps*. São irregularmente formados, discretamente

encurvados e podem dispor-se em cadeias ou com formas em “Y”. Medem aproximadamente 0,2 µm de diâmetro e 1,0 µm a 2,5 µm de comprimento.

Para **WEAR et al. (1985)**, à microscopia eletrônica observam-se bacilos intra e extracelulares com alteração da ultra-estrutura das células do hospedeiro. Para **GUCCION et al. (1996)**, são raras as bactérias observadas em fagossomos, no interior de macrófagos, e não foram observadas formas sem parede celular. São também facilmente encontradas nas paredes dos seus vasos sanguíneos proliferados, ainda que não assumam disposição lobular.

A parede de aspecto trilaminar que o caracteriza é formada por glicocalix no exterior, uma fina camada semelhante a peptidoglicano ao redor do protoplasma bacilar. Material elétron-lucente (um vacúolo) e substância elétron-densa, homogênea e amorfa são encontrados no citoplasma bacilar.

#### **2.1.3.5. Tratamento**

O tratamento na DAG é questionável, porque, embora haja susceptibilidade da *B. henselae in vitro* a vários antibióticos, sua ação na evolução clínica parece ser prescindível, especialmente nos casos típicos de DAG. Para **CARITHERS (1985)**, tendo avaliado 1.200 pacientes, “antibióticos parecem não encurtar a duração da doença nem prevenir a progressão para supuração dos linfonodos acometidos”. Porém, existe apenas um estudo duplo-cego e randomizado para avaliar a atividade antibiótica *in vivo* realizado por **BASS et al. (1998)**. Eles demonstraram benefício clínico obtido com o uso de azitromicina. Parece claro que os beta-lactâmicos não são efetivos. Para os estudos que deverão ser realizados prospectivamente, atenção inicial deverá ser dada a rifampicina, eritromicina e claritromicina e azitromicina. Outras drogas a serem avaliadas são gentamicina, doxiciclina e ciprofloxacina (**BASS, VINCENT, PERSON 1997b**).

Em geral, apenas sintomáticos são prescritos nos casos de apresentação mais típica (**LOUTIT, 1997**).

#### 2.1.4. Angiomatose bacilar

Em 1982, quando ainda pouco se conhecia da recém-identificada Aids, um paciente que negava homossexualismo ou drogadição apresentou monilíase oro-esofágica e úlcera gástrica por herpes simples, sendo iniciado tratamento com nistatina.

A contagem de células T-helper era 40/mm<sup>3</sup>. Três semanas depois retornava com febre, diarreia, emagrecimento e sudorese. No exame físico, foram notados nódulos subcutâneos de 2 cm a 6 cm de diâmetro na região occipital e membros, não-presentes anteriormente. Nos dias seguintes, os nódulos aumentaram e novos apareceram. O paciente era anérgico a testes cutâneos. Biópsia das lesões foram feitas e amostras, semeadas em diferentes meios, sem identificação de nenhum agente. O exame histológico mostrou proliferação de células histiocitárias e endoteliais com pouca formação capilar e proeminente infiltrado neutrofílico. Diferentes colorações foram realizadas podendo-se observar apenas à coloração de Warthin-Starry infiltração difusa de pequenas formas bacilares, confirmadas com microscopia eletrônica. Foi tratado empiricamente com eritromicina oral com recuperação do peso e desaparecimento dos nódulos em três semanas. Quatro meses depois, foi a óbito por pneumonia por *Pneumocystis carinii* e por citomegalovírus. A necropsia não mostrou envolvimento por sarcoma de Kaposi e completa regressão macro e microscópica dos nódulos foi observada.

Publicado em 1983 por **STOLER et al.**, este foi o primeiro caso descrito desta entidade clínica reconhecida, em 1987, por **COCKERELL et al.** que a chamaram de angiomatose epitelióide, relatando cinco casos de pacientes com lesões papulosas e/ou nodulares.

**OMURA & OMURA (1989)** relataram caso, observado 20 anos antes, com características semelhantes às da AB em um paciente submetido à quimioterapia por um linfoma maligno. Posições contrárias ao estabelecimento desta como uma doença diferente foram publicadas na mesma revista (**BROOKS & FISCHER, 1987; JAFFE, 1987**).

LeBoit e seus colaboradores (entre os quais Stoler, English e Wear), em 1988 publicaram sete casos de pacientes com Aids com lesões clinicamente semelhantes a sarcoma de Kaposi e histologicamente semelhantes a angiomias epitelióides, nas quais

puderam demonstrar tais bacilos pela coloração de Warthin-Starry e microscopia eletrônica. Foram os primeiros a fazer associação do contato com gatos para esta doença e a relacioná-la com a bartonelose então conhecida, a DC em sua fase tecidual, a verruga peruana. Para realização de imuno-histoquímica, em cinco dos casos apresentados, utilizaram anti-soro contra um bacilo recém-isolado do linfonodo de uma paciente com DAG. Os cinco apresentaram reação positiva tanto em agrupados bacterianos como para organismos individualizados. Entre os controles que não coraram, havia cortes com *B. bacilliformis* (LEBOIT et al.; 1988).

No mesmo ano, ANGRITT et al. referiram ter encontrado na pele e em linfonodos de pacientes soropositivos para o HIV o mesmo aspecto histológico e bacilos como os descritos. COCKERELL & FRIEDMAN-KIEN (1988) confirmaram que os casos por eles relatados como angiomatose epitelióide realmente tratavam-se da mesma condição caracterizada pelos demais, definindo-a não como uma neoplasia, mas uma proliferação de vasos sanguíneos em consequência de uma infecção bacteriana específica, chamando-a angiomatose epitelióide bacilar.

Em 1989, LEBOIT et al. sugeriram o nome “angiomatose bacilar” como um nome descritivo de transição até a identificação do agente, ressaltando sua resposta dramática a antibióticos e aspectos histológicos e ultra-estruturais.

O primeiro caso de AB em paciente imunocompetente foi descrito por COCKERELL & LEBOIT (1990) com encontro de bacilos à coloração pela prata e confirmação ultra-estrutural em lesões presentes há 18 meses no antebraço arranhado por seu periquito. Foram isolados cocobacilos pleomórficos, fastidiosos, móveis e com único flagelo unipolar. À imuno-histoquímica não houve positividade com anticorpos para o bacilo da DAG, cedidos por Wear e English.

#### **2.1.4.1. Etiologia**

Como já referido; em 1990, RELMAN et al. identificaram, de pacientes imunodeficientes com AB, seqüência gênica muito semelhante à encontrada na *R. quintana*. REGNERY et al., em 1992a, isolaram um organismo semelhante às *Rochalimeae* spp. de um paciente febril e soropositivo para o HIV que foi chamado de *Rochalimeae henselae*. Este



foi considerado idêntico ao isolado do paciente com AB. Além da *R. henselae*, **KOEHLER et al. (1992)** isolaram de pacientes com lesões cutâneas e ósseas de AB a *R. quintana*, conhecido agente da FT. As culturas, neste caso, foram realizadas em co-cultivo com células eucarióticas no caso do osso, e por lise e centrifugação, para o sangue.

Com a reclassificação proposta por **BRENNER et al., em 1993**, estes dois agentes relacionados à AB têm sido chamados de *B. henselae* e *B. quintana*. Nenhuma outra das bactérias deste gênero foi envolvida com esta doença, embora o fenótipo do microorganismo encontrado por **COCKERELL & LEBOIT (1990)** não corresponda a nenhuma dessas espécies.

#### **2.1.4.2. Epidemiologia**

Em uma revisão sobre a recém-descrita doença, **SPACH (1992)** referiu que quase todos os casos descritos eram em pacientes soropositivos para o HIV e destes, a maioria com Aids avançada e contagem de CD<sub>4</sub> menor que 200 células/mm<sup>3</sup>. Dos três soronegativos até então relatados, um era transplantado cardíaco, outro recebia quimioterapia para linfoma e outro era imunocompetente. Comentou que o fato de aproximadamente 90% dos casos de AB serem em homens deveria estar associado à desproporção do acometimento masculino com aquela doença, como era observado naquela época. Referia apenas 20% de arranhadura ou mordedura por gatos.

É de **TAPPERO et al. (1993a)** o trabalho sobre a epidemiologia desta doença. Dos 48 pacientes com este diagnóstico, seis eram soronegativos para o HIV; cinco, imunocompetentes, e um, imunodeficiente. Os outros 42 eram pacientes com Aids. Destes, 45% já tinham este diagnóstico antes da instalação da AB, 21% deles fizeram o diagnóstico das duas doenças concomitantemente no último mês e 34% tiveram o diagnóstico da Aids após o diagnóstico de AB. Destes, 87,5% eram homens, 90%, brancos, 87,5%, homossexuais. Das diversas análises realizadas, apenas a exposição recente a gatos foi fator com envolvimento estatisticamente significativo, sobretudo após arranhadura ou mordedura destes animais, porém, um terço dos pacientes não referiam tal contato. Neste trabalho não

foi observada a relação entre mordidas de insetos e a doença, embora considerando as variáveis envolvidas nesta análise, os autores sugeriram que novos estudos fossem necessários para melhor elucidação deste fator.

Do mesmo autor e do mesmo ano é a descrição dos cinco casos em pacientes com avaliação imunológica normal e soronegativos para o HIV, dos quais três que referiam contato com gatos e suas pulgas tinham como agente responsável a *B. henselae*, enquanto nos outros dois não foi realizada a identificação. Dos cinco, três tinham concomitância das seguintes condições: um com esferocitose e diabetes mellitus, outro com hemocromatose e outro com artralgias e fadiga de origem não-identificada (TAPPERO et al., 1993b).

O relato de TÖRÖK et al. (1994) do desenvolvimento de lesão de AB no local da arranhadura de gato em um paciente com leucemia linfocítica crônica e diabetes reforça que esta doença tem no gato doméstico um de seus reservatórios. Estes autores previam que um aumento nos casos de AB aconteceria em virtude da epidemia pelo HIV e do aumento do uso de tratamentos imunossupressores.

MOHLE-BOETANI et al. (1996) fizeram estudo caso-controle dos casos de AB em pacientes com Aids e observaram que os pacientes com a doença eram mais geralmente comprometidos que os outros (média da contagem de CD<sub>4</sub> foi de 21 células/mm<sup>3</sup> para os primeiros e 186 para os controles). Concluíram que esta doença acontece tardiamente no curso da infecção pelo HIV, devendo ser considerada uma doença oportunística que define Aids propriamente dita. Outra observação importante é a ocorrência em 45% dos casos sem lesões cutâneas ou subcutâneas.

REGNERY, CHILDS, KOEHLER (1995) consideraram que a infecção por *Bartonella* sp. em pacientes infectados pelo HIV freqüentemente não são reconhecidas por várias razões, sendo portanto subdiagnosticadas.

NOSAL (1997) referiu que a AB é extremamente rara em crianças, embora existam relatos de casos, um em uma criança em quimioterapia para leucemia aguda e outra imunocompetente. BASS, VINCENT, PERSON (1997b) e LOUTIT (1997) comentaram que a doença ocorre quase exclusivamente em pacientes com imunossupressão severa e, além dos

pacientes com Aids, referem-se aos pacientes em terapia imunossupressora como pacientes com cânceres ou receptores de órgãos transplantados.

**KOEHLER, GLASER, TAPPERO, em 1994**, isolaram *B. henselae* do sangue de sete gatos cujos donos tiveram AB pelo mesmo agente. Esta bactéria também foi isolada de pulgas destes gatos. Outros 61 gatos da região da Baía de São Francisco foram avaliados e 41% deles eram bacterêmicos para a mesma bartonela.

Com isso, os autores concluíram que a infecção por este agente é uma nova zoonose, com o gato doméstico como reservatório.

Fatores de risco envolvidos na transmissão da infecção por *B. quintana*, tais como alcoolismo crônico e condições higiênicas insatisfatórias, sugerem que esta possa ser transmitida por artrópodes (MAURIN & RAOULT, 1996).

LOUTIT (1997) referiu que casos de AB têm sido descritos em todas as áreas dos EUA, com número maior dos casos observados em áreas mais prevalentes para o HIV. Embora a doença seja considerada incomum, a maioria dos casos descritos, tanto lá como também na Europa, são em pacientes soropositivos para este vírus, independentemente do grupo de risco. O mesmo foi constatado por YOUSIF et al. (1996). Eles demonstraram soropositividade de 16% entre os soropositivos para o HIV de uma ilha do Golfo Pérsico e 3,5% entre os soronegativos usados como controle. O porquê da maior frequência de soropositividade entre os portadores de HIV ainda não foi explicado.

### **2.1.4.3. Clínica**

As manifestações clínicas da AB variam de localização, porém são representadas por lesões de proliferação vascular, decorrentes da resposta angiogênica determinada pelas bartonelas. Além das lesões cutâneas, linfonodais e ósseas já mencionadas, a doença pode envolver praticamente todo o organismo. As lesões mais frequentemente reconhecidas são as cutâneas, porém outras manifestações não associadas à pele podem ocorrer. O quadro pode ser precedido ou acompanhado por febre, em geral de moderada intensidade, anorexia, emagrecimento, dor abdominal, náusea, vômito e diarreia, especialmente quando do comprometimento visceral. A evolução pode ser fatal,

especialmente nos pacientes imunodeficientes (SPACH et al., 1992; BAKER et al. 1995; MAURIN & RAOULT, 1996; MOHLE-BOETANI et al., 1996; BASS, VINCENT, PERSON, 1997b; NOSAL, 1997).

Possivelmente, a forma mais conhecida da doença seja o comprometimento cutâneo.

As manifestações mais comuns da AB são lesões papulosas ou pápulo-tumorais, angiomatosas, de poucos milímetros a vários centímetros, eritematosas, vinosas ou da cor da pele, de superfície lisa, sangrante ou com crostas. Pequenas pápulas podem ser identificadas apenas ao exame mais cuidadoso. As lesões são localizadas, zosteriformes ou disseminadas. Podem caracterizar-se por lesão solitária ou aumentar gradualmente em número, chegando a várias centenas, compreensíveis ou tensas, mais ou menos superficiais. Semelhantemente ao granuloma piogênico podem apresentar colarete epidérmico. Friáveis, podem sangrar fácil e abundantemente. Com freqüência apresentam-se na face e no tórax.

Também podem ser nodulares, com comprometimento subcutâneo predominante, móveis ou fixas a estruturas mais profundas. O ultra-som com *doppler* poderá mostrar as características vasculares das lesões nodulares. Comprometimento cortical do osso contíguo já foi descrito, quando nas extremidades. Por vezes, na superfície, aspecto de celulite é observado. Eventualmente, estes nódulos podem ulcerar e sangrar e serem extremamente dolorosos (MAURIN & RAOULT, 1996; COCKERELL & LEBOIT, 1990; SPACH, KOEHLER, 1998).

A apresentação como placas endurecidas e hiperpigmentadas é menos freqüente (LOUTIT, 1997; BASS, VINCENT, PERSON, 1997b; COCKERELL & LEBOIT, 1990).

Existe freqüentemente uma adenomegalia regional no território de drenagem linfática das lesões cutâneas (MAURIN & RAOULT, 1996; RAOULT, 1999).

Involução espontânea de algumas lesões podem ocorrer.

Há descrições de comprometimento de mucosa oral, anal, conjuntival, gastrointestinal, genital feminina, de vias aéreas e de medula óssea (LEVELL et al., 1995; LONG et al., 1996; COCKERELL & LEBOIT, 1990; MAURIN & RAOULT, 1996; MILAM et al., 1990).

Comprometimento pulmonar já foi referido com lesões polipóides da traquéia e brônquios à endoscopia, em paciente com Aids e febre, dor torácica, tosse produtiva e lesões angiomasas na pele (LOUTIT, 1997).

O comprometimento ósseo não parece ser comum. A radiografia pode mostrar lesões osteolíticas ou regiões de destruição cortical maldefinidas, com reação periosteal, quando associados a massas de partes moles (LOUTIT, 1997; SPACH & KOEHLER, 1998).

Porém, o comprometimento visceral é mais freqüente no fígado, no baço, no trato gastrointestinal, nos gânglios, na medula e no cérebro (RAOULT, 1999).

Também em paciente imunodeficiente pela infecção pelo HIV, uma massa no lobo temporal esquerdo, sugestiva de toxoplasmose, foi biopsiada com encontro de um infiltrado rico em neutrófilos e sem evidências de vasoproliferação. Com a piora do paciente, nova tomografia foi realizada com aumento da lesão intracerebral. Outra biópsia mostrou infiltrado inflamatório linfocítico e proeminente microvasculatura com células endoteliais atípicas. Quatro meses depois, ainda sem diagnóstico, lesão nódulo ulcerada com histopatologia de AB apareceu na fossa antecubital direita e, após coloração com prata da segunda biópsia cerebral, foram evidenciados bacilos naquele tecido e resposta completa foi observada com o tratamento com eritromicina (SPACH et al., 1992).

BAKER et al. (1995) fizeram referência a dois pacientes com quadros psiquiátricos que precederam o aparecimento de lesões de AB e que involuíram com tratamento específico.

Existem várias referências do envolvimento hepático e esplênico na AB, variando desde simples hepatoesplenomegalia ao exame físico até a peliose destes órgãos, encontrada em biópsias (COCKERELL & LEBOT, 1990; MAURIN & RAOULT, 1996). O comprometimento cutâneo pode não ser presente.

Hepatoesplenomegalia foi mais comum nos pacientes com diagnóstico de AB do que nos pacientes de controle do estudo de MOHLE-BOETANI et al. (1996). Em muitos desses casos, porém, houve involução do quadro hepatoesplênico com o tratamento.

A AB pode ser acompanhada por doença visceral disseminada tanto em imunodeficientes como em imunocompetentes.

Existe uma forma de comprometimento parenquimatoso hepático em que há concomitância de lesões de vasoproliferação e dilatação capilar com formação de cistos hemorrágicos, chamada de peliose bacilar. Ela se caracteriza por proliferação de espaços císticos de diferentes tamanhos, cheios de sangue e envolvidos por estroma fibromixóide em que são encontrados bacilos similares aos das lesões cutâneas também em órgãos internos sólidos com elementos reticuloendoteliais, primariamente o fígado e o baço, linfonodos abdominais e a medula óssea (COCKERELL & LEBOIT, 1990; MILAM et al., 1990; RAOULT, 1999).

MAURIN & RAOULT (1996) comentaram que pacientes soropositivos para o HIV foram relacionados com peliose bacilar, causada somente pela *B. henselae*. Para BASS, VINCENT, PERSON (1997b), a peliose bacilar ocorre primariamente em pacientes com Aids com doença terminal. Porém, exemplificando, SLATER, WELCH, MIN (1992) descreveram um paciente transplantado renal com peliose, no fígado e no baço, causadas pela *B. henselae*, isolada do baço. Pacientes com esplenite bacilar desenvolvem severa trombocitopenia ou pancitopenia.

A peliose é observada à tomografia computadorizada como múltiplas lesões hipodensas que promovem o aumento do fígado ou do baço. Biópsia do fígado tem maior risco de hemorragias e, portanto, lesões outras como de linfonodos ou cutâneas devem ser preferidas, justificando, se positivas, o tratamento. Está contra-indicada a biópsia hepática percutânea pelos riscos de sangramento (RAOULT, 1999).

No estudo caso-controle de MOHLE-BOETANI et al. (1996) foi observado que anemia e níveis elevados de fosfatase alcalina estão mais associados à infecção por *B. henselae* e *B. quintana*.

As lesões hipocóides encontradas ao ultra-som ou hipodensas, à tomografia computadorizada, no fígado e/ou baço desses pacientes devem entrar no diagnóstico diferencial como sarcoma de Kaposi, linfoma, infecção bacteriana piogênica e pneumocistose extrapulmonar (KOEHLER, 1995).

Como já foi descrito, a concomitância de lesões extracutâneas em pacientes com diagnóstico de AB, uma anamnese e exames físicos cuidadosos devem ser feitos, seguidos de investigação armada, pois tais lesões sistêmicas podem ser assintomáticas.

Uma possível forma atípica da doença foi descrita por **ITIN et al. (1994)** que relatou o caso de um homem de 27 anos com recorrente granuloma piogênico com satelitose no dorso, com presença de bacilos semelhantes aos encontrados na AB e com sorologia positiva para *B. henselae*, reexpondo a possibilidade do granuloma piogênico, pelo menos aqueles com satelitose, ser causado por agente bacteriano, uma bartonela.

Foi aventado que a diferença entre a resposta angiogênica e granulomatosa, observadas na AB e na DAG, respectivamente, desencadeada pelo organismo parece ser determinada pelo grau de imunocompetência do hospedeiro (**KEMPER et al., 1990; TOMPKINS, 1994**).

A concomitância de lesões com características clínico-patológicas da DAG e da AB, também relatada após o uso de corticoesteróides, com a demonstração de um mesmo agente, colabora com a interpretação acima (**SCHLOSSBERG et al., 1989**).

**HALL et al. (1988)** também descreveram um paciente soropositivo para o HIV, com história de arranhaduras por gatos, com 75 células CD<sub>4</sub>/mm<sup>3</sup> e lesão pré-esternal granulomatosa não-específica que aumentou de tamanho e foi excisada, mostrando tecido de granulação associado com granulomas malformados e áreas de necrose. À coloração de Whartin-Starry, *clumps* bacterianos semelhantes aos descritos na DAG foram encontrados.

Um terceiro relato no qual se observa a concomitância de características dessas duas doenças foi mencionado acima e publicado por **SLATER, WELCH, MIN (1992)**, que descreveram um paciente transplantado renal com peliose do fígado e no baço associadas à angiogênese e à inflamação piogranulomatosa. A *B. henselae* foi isolada do baço.

#### **2.1.4.4. Diagnóstico**

Por tratar-se de doença infecciosa e de evolução potencialmente fatal (COCKERELL et al., 1987), o diagnóstico deve ser precocemente estabelecido.

O maior número de casos de AB foi descrito em pacientes anti-HIV positivos com linfócitos *helper* abaixo de 200/mm<sup>3</sup> que freqüentemente desenvolvem uma outra lesão hemangiomasosa, o sarcoma de Kaposi, que é o principal diagnóstico diferencial da AB cutânea (BROOKS & FISCHER, 1987; RAOULT, 1999). As duas proliferações vasculares podem, no entanto, coexistir (BERGER et al., 1989; COCKERELL & LEBOT, 1990).

Nas lesões únicas, o diagnóstico de granuloma piogênico pode ser impossível de ser afastado clinicamente. A verruga peruana é, senão pelo antecedente epidemiológico, indistinguível desta doença (COCKERELL & LEBOT, 1990).

A síndrome oculoglandular de Parinaud (conjuntivite unilateral com linfonodomegalia regional) pode ser manifestação da DAG, sendo, neste caso, mesmo histologicamente, indistinguível da AB (COCKERELL & LEBOT, 1990; WEAR, 1985).

Outros diagnósticos diferenciais incluem a doença de Kimura, angioblastoma, angiossarcoma, angioqueratoma, dermatofibroma e angioma rubi (KAPLAN et al., 1987; CHAN et al., 1988; KNOBLER et al., 1988; JONES & ORKIN, 1989; COCKERELL & LEBOT, 1990; NIELSEN & NIELSEN 1994).

Este diagnóstico deve ser aventado em todo paciente soropositivo para o HIV com quadro febril, lesões osteolíticas, linfonodomegalias, sintomas abdominais, anemia ou elevada fosfatase alcalina, acompanhadas ou não de lesões cutâneas (MOHLE-BOETANI et al. 1996).

Embora o diagnóstico possa ser ajudado por exames microbiológicos, sorológicos e por técnicas moleculares, que serão discutidos adiante, na prática clínica é o exame histológico que mais facilmente possibilitará o diagnóstico.



A AB pode ser, para patologistas experientes, definida com base na coloração de hematoxilina-eosina (HE), na maioria dos casos (LEBOIT et al., 1989, COCKERELL & LEBOIT, 1990).

As lesões são de proliferação capilar disposta em lóbulos, sendo que os centrais são os mais diferenciados, ectásicos e os da periferia menos maduros, com luzes muitas vezes inaparentes. As células endoteliais são protuberantes para o interior da luz vascular e/ou edematosas (COCKERELL et al., 1987; ANGRITT, 1988).

A presença de múltiplas mitoses pode ocorrer e aparecer atípicas nucleares nessas células, sugerindo malignidade e eventualmente confundidas com as encontradas no angiossarcoma. Elas são mais freqüentes próximas às áreas de necrose celular (COCKERELL & LEBOIT, 1990; NOSAL, 1997).

A técnica de imunoperoxidase já foi usada com reagentes que demonstram a natureza endotelial das células encontradas nessas formações, quais sejam, antígeno relacionado ao fator VIII e aglutinina *Ulex europaeus*. Ambos confirmam que, mesmo células poligonais e sem associação com vasos bem-formados, são células endoteliais e dendrócitos (LEBOIT et al., 1989; ESTRADA & PIÉRARD, 1992).

Nas lesões superficiais, um colarete epitelial pode ser observado. As lesões mais profundas são mais densas, com componente celular mais exuberante. O estroma ao redor dos lóbulos é edematoso nas lesões recentes e fibrótico nas antigas (COCKERELL & LEBOIT, 1990).

A presença de neutrófilos e leucocitoclasia no interstício do lóbulo em lesões não ulceradas é fundamental para sugerir o diagnóstico. Dispõem-se ao redor de agregados dos agentes, guardando proporção com estes (LEBOIT et al., 1989; COCKERELL & LEBOIT, 1990). Estes *clumps* bacterianos, como são chamados, são encontrados freqüentemente em áreas de maior densidade celular formando, à HE, material granuloso que lembra fibrina (BERGER et al., 1989; COCKERELL & LEBOIT, 1990; CHAN et al., 1991).

Os organismos não são fáceis de ser identificados e em várias lesões são poucos ou ausentes, apesar da observação de vários cortes (SZANIAWSKI et al., 1990).

Contudo, colorações especiais poderão facilitar a visualização desses *clumps*, especialmente as com prata, como Warthin-Starry, Dieterle e Steiner (COCKERELL & LEBOIT, 1990; KEMPER et al., 1990).

Dificuldades técnicas e de interpretação da coloração de Warthin-Starry, que é a coloração clássica para a demonstração dessas bartonelas, podem determinar se a microscopia eletrônica é necessária para tal confirmação (BERGER et al., 1989; COCKERELL & FRIEDMAN-KIEN, 1988; COCKERELL & LEBOIT, 1990).

À coloração de Warthin-Starry, o material granuloso à HE é mais facilmente encontrado e individualizado, mostrando numerosos *clumps* dos agentes (LEBOIT et al., 1989).

Identificação imuno-histoquímica da *B. henselae* já foi demonstrada, não apresentando reações cruzadas com *B. quintana*, *A. felis*, ou outros agentes corados pela coloração de Warthin-Starry (REED et al., 1992).

Os critérios histológicos utilizados por TAPPERO et al. (1993a) foram:

proliferação lobular de pequenos vasos sangüíneos, com células endoteliais, com ou sem atipias, protusas para o lúmen vascular;

necrose presente no centro dos lóbulos vasculares;

um infiltrado inflamatório misto com neutrófilos e leucocitoclasia; e

material intersticial granuloso e anfofílico que revelam bacilos na coloração pela prata, pela microscopia eletrônica ou por ambas.

Como critérios de peliose bacilar utilizaram:

capilares dilatados ou espaços cheios de sangue muito dilatados, ou

estroma mixóide contendo células inflamatórias mistas e *clumps* de material anfofílico, com bacilos revelados à coloração pela prata e/ou microscopia eletrônica.

Os bacilos não foram encontrados por CHAN et al. (1988) em lesões vasoproliferativas como as da doença de Kimura, do granuloma piogênico e de angiomas epitelióides esporádicos.

As lesões parenquimatosas apresentam-se semelhantes quanto à proliferação vasculocapilar e à presença do infiltrado inflamatório com neutrófilos e fragmentos leucocitoclásticos. A concomitância destes achados histopatológicos e de espaços cavernosos repletos de sangue, decorrentes de dilatação capilar, caracterizam a peliose que acontece principalmente no fígado e no baço (KEMPER et al., 1990; RELMAN et al., 1991). Ela deve ser diferenciada da peliose que pode ser observada por outras doenças debilitantes crônicas, como tuberculose e cânceres ou uso sistêmico de anabolizantes esteróides, caracterizadas apenas pela formação dos cistos ou lagos repletos de sangue.

Para COTELL & NOSKIN (1994) e KOSTIANOVSKY & GRECO (1994), à microscopia eletrônica observam-se bacilos extracelulares e suas formas defectivas no tecido de granulação. Isto diferenciaria esses agentes da *B. bacilliformis* que também é fagocitada em vacúolos intracelulares. O bacilo é irregularmente formado, discretamente encurvado e pode dispor-se em cadeias. Mede aproximadamente 0,25 micrômetro de diâmetro e 1,0 a 1,5 micrômetro de comprimento. A estrutura interna observável é de material granular elétron-denso. A parede de aspecto trilaminar, que caracteriza formas vegetativas de bactérias gram-negativas, mede aproximadamente 30-40 nm (STOLER et al., 1983; TÖRÖK et al., 1994).

BORCZUK et al. (1998) descreveram presença abundante de colágeno FLS (*fibrous long-spacing*) em associação com casos de AB, o que não foi observado em casos de sarcoma de Kaposi, granuloma piogênico e hemangioma, questionando o envolvimento desse colágeno com a proliferação vascular induzida por espécies de *Bartonella*.

#### **2.1.4.5. Tratamento**

Como a AB pode causar lesões cutâneas desfigurantes, além de potencial de comprometimento sistêmico e risco de vida, todo paciente com a doença deve ser tratado com antibióticos (SPACH, 1992).

STOLER et al. (1983) descreveram o quadro clínico da AB com a demonstração do agente e obtiveram melhora com eritromicina *per os*, estabelecendo uma das melhores opções terapêuticas.

A susceptibilidade *in vitro*, que parece ser igual para as diferentes espécies, mostra maior atividade das cefalosporinas de terceira geração, gentamicina, rifampicina, das tetraciclina, eritromicina, claritromicina e azitromicina. Apenas os aminoglicosídeos são considerados bactericidas (MAURIN & RAOULT, 1996; BASS, VINCENT, PERSON, 1997b). A eritromicina e a doxiciclina são as drogas mais usadas nas doses de 2,0g/d e 200mg/d, respectivamente, embora hajam relatos de ineficácia desta última (MAURIN & RAOULT, 1996). O tempo de tratamento varia de duas semanas a quatro meses, mostrando poucos casos de recidiva ou de resolução incompleta, associados principalmente a esquemas terapêuticos curtos. Excisão e eletrocauterização foram utilizadas nas formas resistentes. Há a descrição do uso de criocirurgia local em lesões que continuavam aparecendo após três meses do uso diário de 2-3 gramas de eritromicina, com boa resposta (COCKERELL & LEBOIT, 1990; KOEHLER, 1995).

Além desses, há relatos do uso de tetraciclina 2,0g/d com sucesso. Gentamicina e rifampicina são consideradas por KOEHLER & TAPPERO (1993) como possivelmente efetivas. Para eles, a efetividade da ciprofloxacina, ceftriaxone e sulfametoxazol + trimetropim é incerta e o uso de penicilina e seus derivados e cefalosporinas de primeira geração não é recomendado.

Resposta sistêmica e tóxica lembrando a reação de Jarisch-Herxheimer foi observada após a primeira dose de um antibiótico apropriado (KOEHLER et al., 1992).

Tratamento profilático com sulfonamidas ou ciprofloxacina não mostrou eficácia estatística em proteger pacientes com menos de 200 linfócitos-helper/mm<sup>3</sup> da AB, segundo a observação de MOHLE-BOETANI et al. (1996).

## **2.1.5. Outras**

### **2.1.5.1. Bacteremia e septicemia**

Bacteremia febril ou afebril tem sido descrita tanto para *B. henselae* como para *B. quintana*. Em 1990, SLATER et al. isolaram um patógeno causador de quadros de febre e

bacteremia persistente em pacientes imunodeficientes e imunocompetentes. O mesmo grupo, anos depois, descreveu-o como *B. henselae*, responsável por quadros de septicemia, AB e peliose bacilar (WELCH et al., 1992). Na mesma revista e número, REGNERY et al., que trabalhavam em cooperação como grupo anterior, descreveram a mesma bartonela causando bacteremia febril com hepatoesplenomegalia em paciente soropositivo para o HIV. Houve recorrência do quadro após 21 dias de doxiciclina 200 mg/d e, depois, após 30 dias do mesmo antibiótico. A recorrência não foi mais observada, até seis meses após curso de 60 dias do mesmo esquema.

KOEHLER (1995) fez menção à bacteremia isolada tanto em imunocompetentes como imunodeficientes, geralmente subaguda, persistindo por meses antes do diagnóstico, quando freqüentemente se associa a febre, calafrios e emagrecimento. Relatou a recorrência após vários meses, apesar de tratamento antibiótico adequados.

CLARRIDGE et al. (1995) encontraram que 1% das culturas sangüíneas de pacientes soropositivos para o HIV é positiva para *Bartonella* sp.

Como referido, quadros de bacteremias febris em indigentes e alcoólatras crônicos causados pela *B. quintana* têm sugerido a menção “febre das trincheiras urbana dos dias modernos” (BROUQUI et al., 1996; ANDERSON & NEUMAN, 1997).

Bartonelose aguda, como foi chamada por JACOBS & SCHUTZE (1998), fora a infecção pelo vírus Epstein-Barr e osteomilite, foi a principal causa de febre prolongada ou de origem indeterminada em pacientes do Hospital da Criança de Arkansas.

SPACH et al. (1995), relatando dez casos de bacteremia por *B. quintana*, referiram metade deles com escabiose e um com infestação por piolho.

#### **2.1.5.2. Endocardite**

Quadros de endocardite têm sido relatados por diferentes espécies de bartonelas.

Foram SPACH et al., em 1993, que descreveram pela primeira vez um caso de endocardite causado por *B. quintana*, ampliando assim o espectro da infecção por

*Bartonella* sp. Na mesma revista, no número seguinte, DALY et al. descreviam uma nova espécie das então chamadas *Rochalimeae*, a *R. elizabethae*, causando endocardite.

Há, ainda, várias descrições de endocardite causadas pela *B. henselae* e também pela *B. vinsonni* subsp. *berkhoffi* (SPACH, 1998; ROUX et al., 2000).

A maioria dos casos aconteceu em pacientes masculinos, imunocompetentes, com febre e mal-estar e foi tratada por um período de seis a nove meses com antibióticos, usualmente eritromicina e azitromicina (LOUTIT, 1997). Endocardites induzidas por *Bartonella* sp. freqüentemente resultaram em dano valvar extenso, exigindo remoção cirúrgica (MAURIN & RAOULT, 1996). Estes mesmos autores sugerem que a sorologia para *B. quintana*, objeto de sua revisão, seja incluída na investigação de pacientes com endocardites.

### 2.1.5.3. Alterações neurológicas e psiquiátricas

Quando COCKERELL et al., em 1987, descreveram os cinco pacientes com lesões angiomasas que acreditavam ser uma nova entidade clínica, referiram, em um dos casos, uma “mudança no estado mental”, que associaram à toxoplasmose do sistema nervoso central. A resposta ao tratamento foi mais lenta que o esperado e acompanhou a involução das lesões angiomasas.

SCHWARTZMAN et al. (1994), a partir da constatação de casos de AB cerebral e retiniana e de encefalite e demais apresentações neurológicas na DAG, tentaram estabelecer uma relação entre o quadro demencial associado ao HIV e infecção por esta bactéria. Na investigação, utilizaram um teste imunoenzimático e técnica de amplificação molecular em pacientes soropositivos para HIV com doença neurológica, comparando-os com pacientes soropositivos sem tal comprometimento e sem sarcoma de Kaposi. Encontraram soroprevalência de 32% no primeiro grupo e de 4% no segundo. Em 1995, SCHWARTZMAN et al. constataram que os pacientes HIV positivos com sorologia IgM positiva para *B. henselae* tiveram 1.7 mais chance de desenvolver sintomas neuropsiquiátricos que os soronegativos nos cinco anos de observação.

Sintomas psiquiátricos foram descritos por **BAKER et al. (1995)** em dois pacientes soropositivos para o HIV, precedendo quadro cutâneo de AB. Um deles, com antecedente de doença bipolar há dez anos, apresentou depressão com tentativa de suicídio, aproximadamente oito meses antes do aparecimento das lesões cutâneas. O quadro foi parcialmente controlado com tratamento psicotrópico e clínico de alterações identificadas durante este período. Poucos dias antes do aparecimento das lesões que permitiram o diagnóstico da infecção, houve piora do estado depressivo e retardamento psicomotor. O segundo paciente, sem antecedentes psiquiátricos, apresentou história de alucinações auditivas, além de sintomas depressivos moderados precedendo tal episódio. Em ambos, a involução dos sintomas ocorreu rapidamente após a introdução do tratamento com eritromicina, tendo sido possível interromper-se o uso das medicações psicotrópicas. Os autores orientam a inclusão das bartonelas causadoras da AB entre os agentes bacterianos que causam desordens psiquiátricas e cognitivas entre os pacientes HIV positivos.

**LUCEY et al. (1992)** descreveram um paciente com bacteremia por *B. henselae* e com meningite linfocítica, sem que tenha sido possível isolar o mesmo agente do líquido, com cultivo por uma semana. Tal paciente referia múltiplas picadas de carrapatos e a presença de gato no seu domicílio.

Já foram referidos, nas manifestações atípicas da DAG, casos de comprometimento neurológico e/ou oftalmológico relatados, sem concomitância de linfonodomegalia e sem histopatologia compatível com DAG.

Em 1999, **KERKHOFF et al.** fizeram o relato de uma paciente soronegativa para o HIV e que apresentava distúrbio de comportamento e neurorretinite bilateral. A presença de DNA de *B. grahamii* de líquidos intra-oculares permitiu tratamento com tetraciclina e rifampicina, por quatro semanas. Houve involução do quadro.

#### **2.1.5.4. Linfadenopatia crônica**

**RAOULT et al. (1994)** descreveram uma paciente com linfonodomegalia cervical por dois anos sem febre e que, na investigação, apresentou também linfonodopatia mediastinal. O exame histológico de gânglio cervical mostrou reação granulomatosa. Culturas de rotina do sangue e dos linfonodos foram negativas, porém, com co-cultivo com

células endoteliais humanas foram isoladas, de duas amostras sanguíneas, bactérias semelhantes à *B. quintana*.

**MAURIN & RAOULT et al. (1996)** relatam outro caso de uma paciente em uso de baixas doses de esteróides e que apresentou febre, tosse seca e fraqueza. Em sua investigação foi constatada linfonomegalia mediastinal. Mesmo com a introdução de esquema antituberculose, houve piora do quadro. Com história de contato com gatos, foi suspeitado de infecção por *Bartonella* sp. A biópsia de linfonodo mediastinal mostrou padrão compatível com DAG e, da biópsia de medula óssea, foi isolada *B. quintana*. Com a introdução de gentamicina houve rápida melhora.

Em sua revisão sobre as infecções humanas por *Bartonella* sp., **RAOULT (1999)** faz menção de linfonomegalia crônica como manifestação atípica da DAG.

#### **2.1.5.5. Síndrome da fadiga crônica**

**WONG et al. (1995)** incluíram no espectro clínico da infecção pela *B. henselae* a responsabilidade por quadro semelhante à síndrome da fadiga crônica. Formas crônicas da FT também foram descritas como astenia importante associada a episódios subfebris repetidos (**RAOULT, 1999**).

#### **2.1.5.6. Portador assintomático**

O mesmo caso descrito por **LUCEY et al. (1992)**, cujo paciente procurou atenção médica com febre, meningismo, fotofobia e meningite linfocítica no exame líquórico, foi tratado com ceftriaxone por dez dias com melhora clínica. Aproximadamente três semanas depois, voltou a ter febre, que melhorou espontaneamente. As hemoculturas do período em que estava febril tornaram-se positivas para *B. henselae* e, por estar assintomático, o paciente optou por não se tratar. Por dois meses, assintomático, teve culturas sanguíneas positivas para o mesmo agente sendo, posteriormente, submetido à antibioterapia.



O mesmo é encontrado na clínica da FT, nos períodos entre os episódios febris e também entre a febre de Oroya e a manifestação tecidual da infecção pela *B. bacilliformis*, a verruga peruana.

## 2.2. AS BARTONELAS

Estudos comparando bartonelas isoladas de roedores do gênero *Rattus*, sabidamente animais originários do Velho Mundo, têm sugerido que espécies de *Bartonella* tenham sido introduzidas nas Américas por meio desses seus reservatórios (ELLIS et al., 1999).

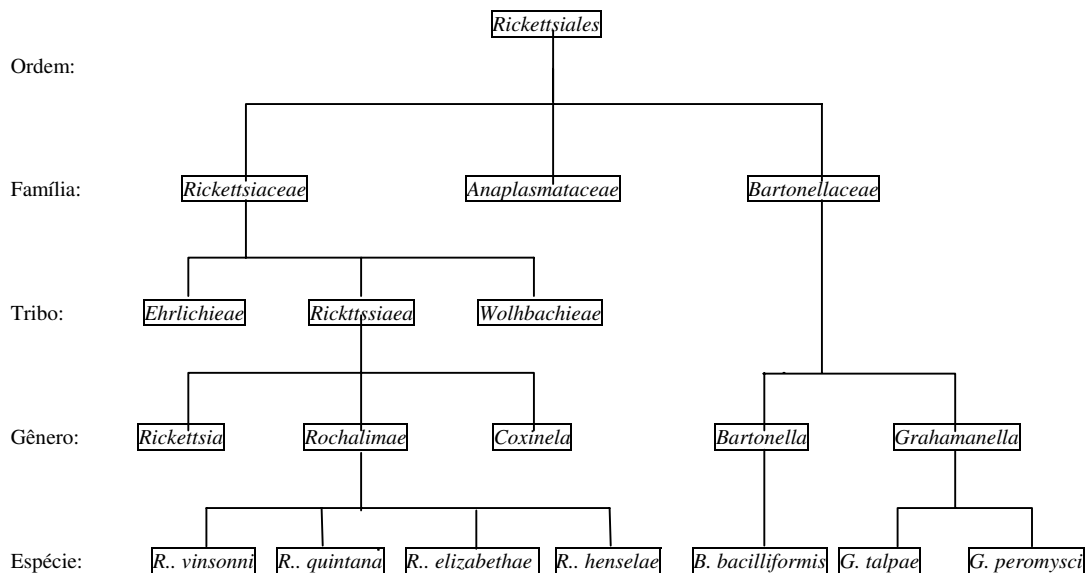
Contudo, como já foi mencionado, há descobertas da era pré-colombiana sugerindo que a DC exista na América do Sul previamente à sua colonização (ALEXANDER, 1995).

### 2.2.1. Taxonomia

Até que BRENNER et al. (1993) propuseram a reclassificação já mencionada, todas as bartonelas faziam parte do subgrupo alpha-2, da classe *Proteobacteria*, ordem *Rickettsiales*. Duas famílias eram envolvidas, a *Bartonellaceae* e a *Rickettsiaceae*. A primeira continha o gênero *Bartonella*, cuja única espécie era a *B. bacilliformis*. A segunda família, a tribo *Rickettsiaeae* e esta o gênero *Rochalimaea*. Neste gênero, encontravam-se as espécies *R. vinsonii*, *R. quintana*, *R. henselae* e *R. elizabethae*.

Na ordem *Rickettsiales*, a outra família nela contida era a *Anaplasmataceae*.

Na família *Rickettsiaceae*, as tribos *Ehrlichieae* e *Wolbachieae*. Na tribo *Rickettsiaeae*, os gêneros *Rickettsia* e *Coxiella*.



**Figura 1:** Antiga classificação das bactérias dos gêneros *Bartonella*, *Rochalimae* e *Grahamella* (adaptado de SLHESSARENKO, 1998).

Família	<i>Bartonellaceae</i>	
Gênero	<i>Bartonella</i>	
Espécies	<i>B. bacilliformis</i>	
	<i>B. quintana</i>	
	<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>vinsonii</i>	Anteriormente
	<i>B. henselae</i>	<i>Rochalimaea</i>
	<i>B. elizabethae</i>	
	<i>B. talpae</i>	Anteriormente
	<i>B. peromysci</i>	<i>Grahamella</i>
	<i>B. grahamii</i>	
	<i>B. taylorii</i>	
	<i>B. doshiae</i>	
	<i>B. clarridgeiae</i>	
	<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffi</i>	
	<i>B. tribocorum</i>	
	<i>B. alsatica</i>	
	<i>B. koehlerae</i>	
	<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i>	
	<i>B. birtlesii</i>	
	<i>B. weissii</i>	

**Figura 2:** Classificação atual da família *Bartonellaceae* (DEHIO & SANDER, 1999; WELCH et al., 1999; BERMOND et al., 2001; BREITSCHWERDT et al., 2001).

O'CONNOR et al. (1991) analisaram a seqüência da subunidade 16S rRNA (que é a região comum entre as bactérias gram-negativas) da *B. bacilliformis*. Demonstraram homologia de 91,7% da região desta bactéria e da mesma região da então chamada *R. quintana*. Análise foi feita também do bacilo da DAG (isolado por ENGLISH et al., em 1988) e encontrada maior homologia deste com a *Brucella abortus* (89,7%).

Considerando que esta técnica era a melhor para a elucidação de relações filogenéticas entre os microorganismos, os autores concluíram que a *B. bacilliformis* relacionava-se com outras bactérias do subgrupo alpha-2 da classe *Proteobacteria* e a relação com a *R. quintana* era consistente, porque as duas espécies distanciavam-se das demais bactérias desta ordem que eram parasitas intracelulares obrigatórios, só se multiplicando em células de hospedeiros ou tecidos vivos. A *A. felis* pertencia ao mesmo subgrupo, porém, era mais relacionado a *Agrobacterium tumefaciens*. Outra observação foi a que nem a *B. bacilliformis* nem a *A. felis* causavam a AB.

Em 1993, BRENNER et al., considerando a semelhança existente entre o DNA das bactérias dos gêneros *Rochalimaea* e *Bartonella*, a homologia entre as seqüências da subunidade 16S rRNA delas e o conteúdo de guanina-citosina de cada uma, além das suas características fenotípicas, propuseram que o gênero *Rochalimaea* fosse transferido da família *Rickettsiaceae* para a família *Bartonellaceae*, com a união dos gêneros *Bartonella* e *Rochalimaea*, mantendo-se o primeiro nome por ser este o mais antigo.

Assim, as quatro espécies do gênero extinto passariam a ser chamadas de *Bartonella quintana*, *B. vinsonii*, *B. henselae* e *B. elizabethae*.

O gênero *Grahamella* foi descrito em 1911 em homenagem a G.S. Graham-Smith que primeiramente observou esses organismos em eritrócitos de uma toupeira.

Descrições de várias outras espécies foram feitas posteriormente em vários animais, mais comumente roedores. Embora mais de 40 espécies tenham sido propostas, apenas duas foram consideradas quando BIRTLES et al. (1995) propuseram a unificação dos dois gêneros da família *Bartonellaceae*, *Bartonella* sp. e *Grahamella* sp., mantendo o nome *Bartonella* pelo motivo anterior. Fizeram-no por estudos da relação do DNA, conteúdo de guanina e citosina e pelas características fenotípicas. Da mesma forma, as chamadas *Grahamella* sp. passariam a *Bartonella talpae* e *B. peromysci*. Pelos resultados destas

análises, concluiu-se que a grande similaridade fenotípica refletia a estreita relação filogenética e genotípica entre os membros desses dois gêneros. Três novas espécies, isoladas pelos autores do sangue de animais, foram apresentadas: *B. grahamii*, *B. taylorii* e *B. doshie*.

Este artigo reforçava a proposta já apresentada no anterior de retirar a família *Bartonellaceae* da ordem *Rickettsiales*. Eles justificavam que esta ordem vinha sendo depositária de bactérias gram-negativas pequenas, usualmente intracelulares, parasitas ou mutualistas. Até 1971, incluíam inclusive as clamídias. Riquetsiologistas reconheciam a dificuldade de classificá-la com precisão, já que a maioria delas não apresentava crescimento *in vitro*. Efetiva reestruturação ainda está se processando para as espécies, os gêneros e as famílias então pertencentes a esta ordem.

Trabalhos publicados posteriormente têm aceitado tais propostas, e outros não fazem menção à segunda proposição. Entre as então chamadas *Grahamella* spp. não se conhecia nenhuma espécie sabidamente patogênica ao homem.

Dentre as espécies do gênero *Bartonella*, a *B. bacilliformis*, a *B. talpae*, a *B. quintana* a *B. peramysci* e a *B. vinsonii* foram descritas há vários anos (1907, 1911, 1917, 1942 e 1946, respectivamente).

A *B. elizabethae* foi descrita em 1993 por DALY et al. Cresceu do sangue de um paciente com endocardite duas semanas após incubação com 5% de gás carbônico. Fenotipicamente semelhante às *Rochalimeae* sp., esta cepa apresentava aproximadamente 60% do DNA relacionado às outras espécies deste gênero e a seqüência gênica 16S rRNA com homologia de 98,9% com as mesmas. A composição dos ácidos graxos celulares era distinta da composição das demais e, dentre elas, mais próxima à *R. vinsonii*.

Concluíram que os laboratórios clínicos deveriam prolongar o tempo de incubação das culturas sangüíneas de pacientes com hipótese diagnóstica de endocardite ou febre de origem indeterminada, especialmente os imunodeficientes, já que o espectro da doença causada por este organismo (e também das demais espécies) ainda não era conhecido. COMER et al. (1996) em estudo epidemiológico sobre soroprevalência entre usuários de drogas endovenosas de Baltimore, encontraram 33% de soropositivos para *B.*

*elizabethae*. O'HALLORAN et al., em 1998, apresentaram um paciente com neuroretinite de Leber com evidência sorológica da infecção por esta bactéria. Em 1999, ELLIS et al. isolaram de roedores do gênero *Rattus* bactérias indistinguíveis da *B. elizabethae*, sugerindo que estes animais possam ser reservatório de espécies de bartonelas patogênicas ao homem.

Um novo agente foi isolado de um cachorro com endocardite, apenas quando utilizou-se a técnica de lise e centrifugação. Tratava-se de uma bactéria gram-negativa fenotipicamente semelhante à *Bartonella* sp.. Da válvula cardíaca congelada foi amplificado o DNA, e a bactéria daí também isolada foi caracterizada fenotípica e genotipicamente, incluindo teste bioquímico, análise de ácidos graxos celulares, hibridização de DNA e seqüenciamento da subunidade 16S rRNA que mostraram tratar-se de uma nova subespécie de *Bartonella*, sendo proposto o nome de *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* (BREITSCHWERDT et al., 1995). ROUX et al. (2000) mencionaram que esta espécie também é patogênica ao homem, relatando o caso de um paciente com endocardite. O diagnóstico foi feito por detecção gênica e imunologia (IFI).

Como já foi mencionado, em 1999, KERKHOFF et al. relataram o caso de uma paciente com alterações de comportamento e neuroretinite bilateral causadas por *B. grahamii*.

LAWSON & COLLINS (1996) descreveram uma nova espécie de bartonela, a *Bartonella clarridgeiae*, isolada de um gato cujo dono apresentava uma septicemia por *B. henselae*. Ela apresentava características de crescimento, produto da amplificação do REP-PCR e análise do perfil de composição de ácidos graxos distintos de outras espécies já descritas. No ano seguinte, KORDICK et al. fizeram relato de caso de DAG causada por esta espécie e GURFIELD et al. referiram co-infecção de gatos pela *B. clarridgeiae* e *B. henselae*. Estes últimos autores aventaram a possibilidade de ser desenvolvida uma vacina polivalente contra as cepas mais patogênicas ou invasivas que pudesse proteger gatos e homens desta infecção. Para PIÉMONT & HELLER (1999), é razoável imaginar-se que parte das DAGs, especialmente das soronegativas para *B. henselae*, sejam causadas pela *B. clarridgeiae*.

Duas novas espécies foram descritas, a *B. tribocorum* e a *B. alsática* por Heller e seus colaboradores, isoladas de coelhos e ratos silvestres, em 1998 e 1999, respectivamente (HELLER et al., 1998; HELLER et al., 1999).

A *B. koehlerae* foi isolada de gatos em 1999, por DROZ et al. durante um estudo de prevalência de bacteremia por *B. henselae* entre gatos domésticos da Baía de São Francisco, em que foram isoladas bartonelas de 41% dos gatos examinados.

Uma subespécie da *B. vinsonii*, a *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, foi descrita em 1999, isolada de amostra sanguínea de um paciente fazendeiro que apresentou fadiga, moderada cefaléia e mialgia. Tornou-se confuso, além de referir sintomas vagos. Tinha história de doença reumatológica maldefinida há 24 anos, quando apresentou níveis elevados de anticorpos antinucleares, velocidade de hemossedimentação e fator reumatóide positivo. Apresentou, naquela ocasião, manifestações neurológicas variáveis, inclusive meningite asséptica. Recorrências do quadro eram controladas com altas doses do corticoesteróides endovenosos. Entre as exacerbações apresentava-se relativamente assintomático, não necessitando de períodos longos da medicação. No exame físico da internação, apresentava-se febril e taquicárdico. Não apresentava víscero ou linfonodomegalia. O exame neurológico apresentava alterações de pares cranianos, hiperreflexia e rebaixamento da concentração. A velocidade de hemossedimentação estava elevada e o fator anti-núcleo positivo para altos títulos. Após 36 horas de febre alta, foi administrada dose única de 1g de ceftriaxone com melhora da febre. Predinisona na dose de 40 mg/d foi prescrita por suposta vasculite cerebral. Houve involução quase total do quadro neurológico e, mesmo após a suspensão do corticoesteróide, manteve-se bem durante seguimento de mais de cinco anos. Outros isolados, obtidos de camundongos em estudo de prevalência para bactérias de outros gêneros, foram identificados como sendo relacionados proximamente ao do paciente. Esta subespécie foi considerada como presumivelmente patogênica ao homem (WELCH et al., 1999).

Essas bactérias têm sido cultivadas de número crescente de amostras sanguíneas de mamíferos como gatos, camundongos, veados e bois. São exceções a *B. bacilliformis* e *B. quintana* que, recuperadas de humanos assintomáticos, não têm outros reservatórios conhecidos (DEHIO & SANDER, 1999). Este é o caso da *B. birtlesii* isolada de

pequenos mamíferos do gênero *Apodemus* sp., em 2000 (BERMOND et al.) e da *B. weissii* cultivadas de bovinos, como menciona BREITSCHWERDT et al. (2001). Eles isolaram bactérias com 100% de homologia da *B. weissii* de *GenBank*.

Várias dessas espécies têm mostrado características comuns como a habilidade de causar infecção crônica em seus hospedeiros naturais, especialmente bacteremia, e íntima associação com as células dos hospedeiros, especialmente eritrócitos (BROUQUI et al. 1999).

Novos genótipos de *Bartonella* foram isolados de roedores do gênero *Rattus*, porém ainda estão sem uma classificação precisa (ELLIS et al. 1999).

**Tabela 1:** Relação entre espécies de *Bartonella*, ano de descrição, reservatórios e principais doenças humanas.

<i>Bartonella</i> sp.	Descrição	Reservatórios	Principais doenças humanas
<i>B. bacilliformis</i>	1907	Homem	DC
<i>B. tal pae</i>	1911	<i>Scalopus</i> sp.	
<i>B. quintana</i>	1917	Homem	FT, DAG, AB, LC, bac, end, sep
<i>B. peromysci</i>	1942	Veado, camund	
<i>B. vinsonni</i> subsp. <i>vinsonni</i>	1946	<i>Scalopus</i> sp.	
<i>B. henselae</i>	1992	Gato	DAG, AB, LC, bact, end, sep
<i>B. elizabethae</i>	1993	Rato	end, neuroretinite
<i>B. grahamii</i>	1995	Camund, <i>Microtus</i> sp.	Neuroretinite
<i>B. taylorii</i>	1995	Camund, <i>Microtus</i> sp.	
<i>B. doshiae</i>	1995	<i>Microtus</i> sp.	
<i>B. vinsonni</i> subsp. <i>berkhoffi</i>	1996	Cão	end
<i>B. clarridgeiae</i>	1996	Gato	DAG
<i>B. tribocorum</i>	1998	Rato	
<i>B. alsatica</i>	1999	Coelho	
<i>B. koehlerae</i>	1999	Gato	
<i>B. vinsonni</i> subsp. <i>arupensis</i>	1999	Camundongo	bac
<i>B. birtlesi</i>	2000	<i>Apodemus</i> sp.	
<i>B. weissii</i>	2001	Boi	

DC, doença de Carrión; FT, febre das trincheiras; DAG, doença da arranhadura do gato; AB, angiomatose bacilar; LC, linfadenopatia crônica; bac, bacteremia; end, endocardite; sep, septicemia

### 2.2.2. Descrição do gênero e espécies

Fenotipicamente, as *Bartonella* spp. são bacilos ou cocobacilos gram-negativos, pequenos e delicados (de aproximadamente 1 µm de comprimento), freqüentemente curvos. Crescem em ágar enriquecido com sangue (5%-10%) e em ambiente rico em gás carbônico. São microaerófilas, oxidase e urease negativas e de crescimento fastidioso. Não utilizam carboidratos em seu metabolismo. Algumas características das bactérias deste gênero são variáveis, como a temperatura ótima para o crescimento. A *B. bacilliformis* cresce melhor sem saturação de gás carbônico e entre 25°C a 30°C, enquanto as demais preferem temperatura entre 35°C a 37°C. Somente as antigas *Grahamella* spp. são Voges-Proskauer positivas. A atividade contra prolina e tripsina também difere entre as várias espécies. A *B. henselae* é catalase variável, não reduz nitrato, não produz indol e não produz hemólise, o que a diferencia das demais, embora não seja fácil em laboratório clínico diferenciação entre ela e a *B. quintana*. Tanto a *B. henselae* como a *B. quintana* não possuem flagelos e possuem fímbrias, estrutura associada a citoaderência. MEHOCK et al. (1998) verificaram que a *B. henselae* fixa-se aos eritrócitos de felinos e os invade lentamente, característica relacionada a sua capacidade de adesão. A *B. bacilliformis* e a *B. clarridgeiae* são multiflageladas unipolares (DALY et al., 1993; BIRTLES et al., 1995; ANDERSON & NEUMAN, 1997; BASS, VINCENT, PERSON, 1997a; KORDICK et al., 1997; SLHESSARENKO, 1998; RAOULT, 1999).

A capacidade de as *Bartonella* produzirem por ação direta lesões angioproliferativas de aspecto tumoral é única entre as bactérias patogênicas ao homem (RAOULT, 1999). Elas estão filogeneticamente muito relacionadas à *Agrobacterium tumefaciens* que também é tumorigênica em plantas (JUMAS-BILAK et al., 1998).

### 2.2.3. Ultra-estrutura

Desde 1922, sabe-se que a *B. quintana* multiplica-se extracelularmente no intestino dos artrópodes vetores, o piolho do corpo (*Pediculus humanus* var. *corporis*). ITO & VINSON (1965) estudaram uma cepa isolada em ágar-sangue de hemocultura de paciente com FT, após sete passagens no meio e microorganismos isolados do sangue do paciente encontrado no interior de piolhos e semeado em diferentes meios.



Elas foram suspensas e lavadas previamente ao exame de microscopia eletrônica.

Também fêmeas adultas de piolhos foram infectadas experimentalmente por inoculação intra-retal da suspensão de bactérias isoladas da hemocultura do paciente e repicadas sete vezes em ágar-sangue. Os piolhos sugavam coelho sem infecção uma vez ao dia. A evolução da infecção foi acompanhada pelo exame de amostras de suas fezes, coradas pelo método de Giemsa. Outros tiveram o conteúdo abdominal fixado para avaliação.

Cortes semifinos foram corados com azul de toluidina e examinados à microscopia de luz. Numerosas bactérias foram vistas no lúmen intestinal ou aderidas à superfície livre das células epiteliais. Bactérias contaminantes eram diferenciadas das bartonelas pelo tamanho, contorno e características à coloração. Não observaram diferenças morfológicas nas bactérias situadas em diferentes áreas da mesma colônia, porém avaliaram-nas à microscopia de luz.

A ultra-estrutura das bactérias foi idêntica, tanto para as recuperadas diretamente da hemocultura do paciente como aquelas recuperadas do sangue encontrado nos piolhos.

Referiram que vários procedimentos da preparação produziram diferenças no aspecto comum das bactérias. Descreveram que tanto a parede celular como a membrana citoplasmática são trilaminares e o espaço entre elas, variável. O contorno das bactérias tinha poucas irregularidades. O conteúdo citoplasmático era constituído por finos filamentos ou grânulos densos e que variavam de uma para outra bactéria. Sugeriram tratar-se do material ribonucleico e mencionaram que nenhum outro componente citoplasmático havia sido visto. Divisão binária era frequentemente observada especialmente nas mais bacilares e nenhuma outra estrutura interna era observada durante este processo.

Quanto às bactérias encontradas no intestino do piolho, algumas estavam livres no lúmen e outras intimamente associadas às membranas plasmáticas das células epiteliais. Embora a *B. quintana* fosse observada no interior de células epiteliais presentes na luz intestinal, não foram observadas células infectadas no epitélio intestinal.

Os autores comentam que o componente externo varia na espessura e na aparência.

As *Bartonella* spp. são maiores que as *Brucella* spp. que também são cocobacilares e gram-negativas (GUCCION et al., 1996).

Outras observações ultra-estruturais já foram mencionadas nos itens **2.1.3.4.;** **2.1.4.4.** no diagnóstico da DAG e AB, respectivamente.

#### **2.2.4. A *Bartonella henselae***

Do exposto até aqui, constata-se a importância desta espécie neste gênero. Ela é responsável pela maioria dos casos de DAG e também de AB. Dentre as manifestações conhecidas, só não é agente da DC e da FT.

LOUTIT (1997) descreve as colônias de primo-isolamento desta bactéria como esbranquiçadas, secas, auto-aderentes, delicadas, com aspecto de couve-flor e incrustadas no ágar. Após múltiplas passagens, as colônias se tornam menos aderentes, menos secas, maiores e mucóides. As *B. henselae* são mais heterogêneas que as demais espécies, predominando as colônias mais irregulares.

REGNERY, MARTIN, OLSON, em 1992, descreveram ocorrência natural da infecção de gatos pela *B. henselae* pelo isolamento do agente de um gato com anticorpos específicos contra *Rochalimeae* sp.. Mais recentemente, vários estudos foram realizados para avaliar a incidência desta infecção em gatos.

No início de 1994, em um editorial, TOMPKINS refere a inexistência, até então, de estudos em grande escala para avaliar se gatos estavam infectados com *Rochalimeae* sp., servindo de reservatório potencial para as doenças associadas.

CHILDS et al., em 1994, demonstraram soropositividade a antígenos de *B. henselae* em 44% dos gatos de Baltimore. No mesmo ano, KOEHLER, GLACER, TAPPERO cultivaram sangue de 61 gatos da região Baía de São Francisco sendo isolada *B. henselae* de 41% deles. De 48 gatos de pacientes com DAG, 81% eram soropositivos para a mesma bartonela, conforme comunicação pessoal publicada por HIGGINS et al. (1996).

No estudo conduzido por **CHOMEL et al. (1995)** igualmente na Califórnia, foram isoladas cepas de *B. henselae* de 39,5% dos 205 gatos avaliados. Destes, 81% eram soropositivos para o mesmo agente.

**NG & YATES (1997)** isolaram *B. henselae* de 13,2% dos 342 gatos de Melbourne, Austrália, dos quais armazenaram sangue por uma semana, cultivando-os depois. Os autores concordam que os dados subestimem a realidade da infecção entre os gatos daquela cidade, pelas condições técnicas do isolamento.

**UENO et al. (1995)** não encontraram diferenças significantes na soroprevalência entre gatos velhos e jovens ou entre machos e fêmeas. **CHOMEL et al. (1995)**, ao contrário, encontraram que gatos com menos de 1 ano têm 1,64 mais bacteremia que gatos mais velhos.

**BERGMANS et al. (1997b)** trazem referências da variação de soroprevalência em diferentes países ou em suas diferentes regiões, por exemplo, 4% a 81% nos EUA, 6% a 22% no Japão, 33% na Áustria, 12% no Egito, 7% em Portugal, 5% no Alaska e 0% no oeste do Canadá. Estes estudos exemplificam a diversidade entre as pesquisas que determinam a distribuição aparentemente universal deste agente. No estudo por eles realizado, 22% dos gatos de abrigos para animais da Holanda eram bacterêmicos. Dos gatos não domiciliados, 26% tinham hemocultura positiva e 25% dos felinos domiciliados. O resultado sorológico foi, respectivamente, 50%, 52% e 35%. Concluíram que o valor preditivo do exame sorológico empregado era de 39%.

**KORDICK et al. (1997)** mencionam que a soroatividade contra a *B. quintana* tem sido observada em vários pacientes com DAG, embora a mesma não tivesse sido recuperada de nenhum paciente com esta doença ou de seus gatos, até a descrição de um caso brasileiro de DAG causado por esta bactéria (**AZEVEDO et al., 2000**).

**HIGGINS et al. (1996)** demonstraram que *B. henselae* replica e persiste na pulga.

**LUCEY et al. (1992)** associaram-na com carrapatos.

**DRANCOURT et al. (1996)** descreveram um sorotipo de *B. henselae* que chamaram Marselha, em um paciente com DAG e outro com endocardite. **BERGMANS et al. (1997a)** encontraram, em um inquérito epidemiológico entre gatos holandeses, bartonelas tipos A, B e G. As bactérias tipo B predominavam entre os gatos, embora as tipo A predominassem entre os pacientes com DAG daquele país, sugerindo maior infectividade das *B. henselae* tipo A. A *Bartonella* tipo G foi encontrada em 16% dos gatos bacterêmicos, associada ou não à infecção pela *B. henselae* tipo A ou *B. henselae* tipo B. Possivelmente, a infecção pela *Bartonella* tipo G não produz uma resposta imune protetora contra a infecção pelas *B. henselae* tipo A e B. Todos esses gatos tinham altos títulos de anticorpos anti-*B. henselae*. Nenhum paciente apresentava infecção por este tipo, o que sugeria que este tipo não fosse patogênico ao homem. A hemocultura teve maior positividade do que a técnica de PCR (RFLP) foi capaz de detectar o DNA das bactérias no sangue dos gatos.

Além desses estudos, outros têm demonstrado a existência de genotipos diferentes de *B. henselae*, chamadas hoje de tipo I e tipo II (**HELLER, 1997; GURFIELD, 1997**). Este fenômeno poderia refletir-se em diferenças antigênicas, o que poderia estar na dependência, inclusive, da posição geográfica dos casos de DAG.

**BERGMANS et al. (1997a)** mencionaram que a IgG anti-*B. henselae* é encontrada em 2 a 6% de controles humanos sadios, porém estes valores podem chegar a 48%, como os encontrados na Suíça conforme **RATH, VON RECKLINGHAUSEN, ANSORG (1997)**. O primeiro grupo comparou os dados da população normal com familiares de pacientes com DAG. Nestes, a soroprevalência era de 29%. **RATH, VON RECKLINGHAUSEN, ANSORG (1997)** estudaram população alemã e não encontraram diferença estatística entre a população proprietária de gatos e o grupo controle, (20% e 19%, respectivamente).

A presença intra-eritrocitária da *B. henselae* em gatos persistentemente bacterêmicos foi demonstrada por **KORDICK & BREITSCHWERDT, em 1995**. Eles se referem às dificuldades do cultivo desta bactéria, o que é minimizado utilizando o método de lise, a partir de tubos Isolator (Wampole Laboratories) e posterior centrifugação com semeadura do sobrenadante em ágar enriquecido. A partir disso, inferiram que deveria haver uma relação íntima entre as bactérias e os eritrócitos. Comprovaram, por microscopia eletrônica de transmissão, em gotas de sangue fixadas, a localização exclusivamente citoplasmática dessas bactérias. Cogitaram no estudo que a hemácia induziria ou forçaria a endocitose.

## 2.3. DIAGNÓSTICO

### 2.3.1. Exame direto

O esfregaço sangüíneo corado pelo método de Giemsa é descrito no diagnóstico da infecção pela *B. bacilliformis* e é utilizado no seguimento do paciente, para avaliação do prognóstico, já que o encontro de bactérias mais cocóides indicam boa evolução (BASS, VINCENT, PERSON, 1997a; GARCIA-CACERES & GARCIA, 1991).

Igualmente o exame direto do sangue de animais permite a identificação de espécies dos gêneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon* infectando-os, mesmo de forma assintomática. *Haemobartonella* spp. são encontrados aderidos à superfície de hemáceas e *Eperythrozoon* spp. são predominantemente observadas em grumos entre as células do esfregaço sangüíneo (BAKER, CASSEL, LINDSEY, 1971).

### 2.3.2. Bacteriologia

O isolamento de diferentes espécies de *Bartonella* geralmente requer um tempo prolongado de cultivo usando meios enriquecidos e de preparo recente (ANDERSON & NEUMAN, 1997; WELCH et al., 1992).

DOUGHERTY et al. (1996), estudando o isolamento de microorganismos de crescimento lento de pacientes com Aids, referem que a rotina de culturas sangüíneas de laboratórios de microbiologia clínica não são suficientes para permitir o crescimento de espécies de *Bartonella*. Sugerem que, enquanto não forem determinadas as condições de crescimento e o meio ideais para tal isolamento, placas de ágar sejam incubadas por dois meses, já que houve crescimento visível de colônia de *B. henselae* depois de seis semanas de cultivo.

As bartonelas foram isoladas de amostras sangüíneas, de fragmentos de baço, de linfonodos e de pele, entre outros tecidos. Foram utilizados materiais frescos ou congelados.

O método utilizado para a coleta de sangue para cultura, assim como a manipulação da amostra, pode influenciar no isolamento das bactérias. No caso das hemoculturas, o método que mais tem sido usado é o da lise e da centrifugação. O material

é semeado em meios monofásicos ou bifásicos, enriquecidos com eritrócitos e com período de incubação prolongado (15 a 21 dias em média), em ambiente com 5% de dióxido de carbono. Subculturas têm menor período de incubação. **LARSON et al. (1994)** descreveram que a *B. quintana* foi isolada em frascos para hemocultura em aerobiose e que o subcultivo aumentou a sensibilidade do exame. **LOUTIT (1997)** refere que subculturas foram negativas em crescimento anaeróbio.

**REGNERY, et al. (1992a)**, quando da caracterização de uma nova espécie, a *B. henselae*, fizeram menção ao isolamento dos organismos de amostras sanguíneas coletadas em tubos com EDTA (sal tripotássico do ácido etilenodiaminotetracético) mesmo após congelamento a -85°C.

**BRENNER et al., em 1997**, compararam a coleta do sangue de felinos infectados por *B. henselae* em tubos de lise e tubos com EDTA como anticoagulante. Eles fizeram plaqueamento direto das amostras, plaqueamento após 24 horas a 25°C e plaqueamento após congelação a -65°C por 26 dias. Procederam a contagem das colônias após 14 e 35 dias de crescimento e concluíram que a lise dos eritrócitos aumentou o número de unidades formadoras de colônias/ml, utilizando o tubo apropriado ou o congelamento por 26 dias e mesmo por apenas 24 horas.

Sistemas de culturas em frascos, com avaliação periódica da produção de gás carbônico, usado para evidenciar crescimento microbiano, têm sido descritos. **LUCEY et al. (1992)** mencionam o uso do sistema BACTEC, Becton-Dickinson, incubados por período maior que uma semana. **HENSEL & SLATER (1995)** referem o isolamento de *B. quintana* e *B. henselae* de hemoculturas usando BACTEC 26 Plus, frascos aeróbicos contendo resina (Becton-Dickinson), combinado com coloração com *acridine orange*, com oito dias de incubação. Co-cultivos com monocamadas celulares foram usados para facilitar o isolamento de *Bartonella* spp.. O uso de altas concentrações de hemina, em meios sem sangue, parece ser fundamental, sobretudo para o crescimento da *B. henselae* (**SCHWARTZMAN, NESBIT, BARON, 1993**). Têm sido utilizados para a diferenciação entre as espécies de *Bartonella* sp. painéis rápidos MicroScan (Baxter Diagnostics) (**WELCH et al., 1993; DROZ et al., 1999**).

Para as culturas de tecidos, os fragmentos coletados assepticamente foram triturados e homogeneizados. Meios ágar-sangue de coelhos, carneiros ou humano, receberam este material, sendo incubados por período de seis semanas ou mais. LA SCOLA & RAOULT (1999) referem que não observaram superioridade entre meios com ágar enriquecido com sangue de qualquer origem, desde que mantidos em atmosfera com 5% de gás carbônico ou microaerofilia.

Os fragmentos de pele foram previamente lavados e depois homogeneizados.

Aqueles semeados em meios de cultura de tecidos de monocamada, também embebidos em caldo enriquecido, mostraram melhores resultados no isolamento destas bartonelas (ENGLISH et al., 1988; COCKERELL et al., 1990; KOEHLER et al., 1992; LUCEY et al., 1992; REGNERY et al., 1992a; WELCH et al., 1992; DALY et al., 1993; DOLAN et al., 1993; SPACH et al., 1993; TAPPERO et al., 1993b).

BERGMANS et al. (1997b) e ZANUTTO (2000), entre outros, demonstram que a hemocultura é mais sensível para o diagnóstico que a detecção gênica por PCR.

Porém, para LA SCOLA & RAOULT (1999), a cultura teve menor sensibilidade quando comparada à detecção gênica por PCR em válvulas com endocardite, biópsias cutâneas de pacientes com AB e de linfonodos de pacientes com DAG. A sorologia foi mais sensível que a cultura nos casos de endocardite e DAG. O procedimento que mais aumentou a sensibilidade das culturas foi o subcultivo. A maioria dos pacientes com diagnóstico de bacteremia por *B. quintana* tinham sorologia negativa e hemoculturas positivas, a grande maioria com o subcultivo.

Estes mesmos autores comentam que subculturas repetidas têm reduzido o tempo de crescimento, entre três a cinco dias, mas a morfologia das colônias é significativamente alterada. Utilizaram a inoculação de 10 ml de sangue em frascos para hemocultura BACTEC PLUS, aeróbicos (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Spark, Md.) e incubados na máquina BACTEC NR-860. Uma semana depois, 1 ml do inoculado era semeado em placas com ágar com sangue de carneiro. O sangue total foi sistematicamente congelado a -85°C por 24 horas antes da inoculação, após o relato de BRENNER et al. (1997), o que permitiu o isolamento sem subcultivo de alguns casos. As

hemoculturas de pacientes que tinham começado antibioterapia foram negativas, independentemente do esquema utilizado, exceto a de um paciente tratado por menos de 24 horas.

Não há relato do isolamento de *B. henselae* e *B. quintana* (ou de diferentes espécies de *Bartonella*) de um mesmo humano.

### 2.3.3. Sorologia

Teste de imunofluorescência indireta e teste imunoenzimático para *B. henselae* e *B. quintana* têm sido os métodos mais utilizados para o diagnóstico da infecção pelas *Bartonella* spp., ainda que sua utilização para detecção de infecção aguda seja motivo de debate na literatura. Ela depende das cepas bacterianas utilizadas e a metodologia usada no preparo dos antígenos. Estes testes são disponíveis comercialmente e utilizam células Vero infectadas por *B. henselae* e *B. quintana* (RATH, VON RECKLINGHAUSEN, ANSORG, 1997; DEHIO & SANDER, 1999; SCHUTZE, 2000). BANETH et al. (1996) comentaram em seu trabalho sobre sororreatividade por imunofluorescência indireta para *B. henselae* e *B. quintana* entre gatos que deve haver uma grande diversidade antigênica entre as espécies, as subespécies e as cepas de bartonelas.

As maiores titulações são atingidas nas primeiras semanas após instalação dos sintomas. Títulos maiores que 1:64 são considerados positivos. Teste imunoenzimático também é utilizado na detecção de anticorpos anti-*B. henselae* (BERGMANS et al., 1997b).

Reações cruzadas entre estas espécies não foram observadas, nem com a *A. felis* nem com vários outros agentes testados (PERKINS et al., 1992; REGNERY et al., 1992b). Porém, BANETH et al. (1996) mencionaram um caso em que um paciente e seu gato tinham títulos de anticorpos anti-*B. quintana* substancialmente mais altos que aqueles anti-*B. henselae*, apesar da caracterização genética do microorganismo cultivado do sangue do gato ser de *B. henselae*.

ZANGWILL et al. (1993), utilizando-se da IFI, avaliaram a epidemiologia e os fatores de risco para DAG em associação à infecção pela *B. henselae*.



**DALTON et al. (1995)** descreveram uma sororreatividade menor em cepas de *B. quintana* com maior número de repiques, sugerindo que tenham perdido antígenos imunodominantes.

A infecção experimental com gatos é seguida de perto pelo aumento de títulos de anticorpos IgG anti-*B. henselae*, a partir de uma ou duas semanas, com títulos que variaram de 64 a 4.096 (**GREENE et al., 1996; ABBOTT et al., 1997**). Quando animais foram submetidos a desafio, os títulos elevaram-se rapidamente e foram mais altos quando comparados aos valores da exposição inicial. Durante bacteremia, os títulos de anticorpos IgG foram os mais altos embora ela se mantivesse apesar desses altos níveis de anticorpos (**ABBOTT et al., 1997**). Para **GUPTILL et al. (1997)** houve uma queda progressiva no título de anticorpos precedendo a recidiva da bacteremia e a diminuição das contagens de colônias com o aumento dos títulos de anticorpos.

**CHOMEL et al. (1995)** não encontraram reação linear entre os títulos de anticorpos e o nível de bacteremia em gatos, porém gatos bacterêmicos tinham títulos maiores. Neste trabalho, o valor preditivo positivo da IFI foi de 46,4%, com utilidade limitada em distinguir entre os gatos bacterêmicos e não-bacterêmicos, mas o valor preditivo negativo foi de 89,7%, mostrando alta correlação entre a ausência de anticorpos anti-*B. henselae* e a ausência de bacteremia.

A ausência de anticorpos IgG detectáveis em animais expostos à *B. henselae*, sugere haver um grupo de gatos com tolerância parcial induzida, o que poderia ser explicado pela solubilidade ou tamanho do antígeno, dose do inóculo e a via de administração.

**BERGMANS et al. (1997b)** avaliaram gatos holandeses e obtiveram um valor preditivo positivo de 39% e valor preditivo negativo de 96%. Dos animais avaliados, 20% eram bacterêmicos e soropositivos e 30%, soropositivos, porém não-bacterêmicos. Dois por cento deles eram bacterêmicos e soronegativos.

**BERGMANS et al. (1997a)** realizaram sorologia para a infecção por *B. henselae* por testes de imunofluorescência indireta e imunoenzimáticos. Usaram como antígenos bactérias co-cultivadas com células Vero e bactérias não co-cultivadas. Fizeram correlação com teste de hibridização por PCR baseado no gene 16S rRNA. Demonstraram que uma

estratégia para diagnóstico de DAG seria a detecção de anticorpos IgM anti-*B. henselae* realizados por testes imunoenzimáticos que, se positivos, indicariam atividade da infecção. Caso negativo, dever-se-ia realizar PCR para *Bartonella* com o pus ou o fragmento de linfonodo acometido. Um PCR positivo confirmaria a doença, embora um negativo não excluísse tal diagnóstico. O aumento de títulos de anticorpos IgG seriam outro critério diagnóstico, ainda que não constantemente observado. A sensibilidade da sorologia aumenta com o uso de antígenos de bactérias co-cultivadas. A inoculação em gatos com *B. quintana* não promove bacteremia e não altera posterior resposta humoral à infecção pela *B. henselae*.

Havendo desafio com a mesma cepa desta bactéria, não houve bacteremia detectável. Porém, se o desafio era feito com uma cepa distinta ou com *B. clarridgeiae*, que sabidamente também infecta o gato, desenvolveu-se bacteremia e adequada resposta humoral (GREENE et al., 1996; REGNERY et al., 1996). Os autores concluíram que não existe reação cruzada entre cepas de *B. henselae* e entre espécies de *Bartonella*.

CHOMEL et al. (1995) observaram a diminuição da prevalência dos anticorpos anti-*B. henselae* e de bacteremia com a idade do felino, que possivelmente adquirem a infecção no primeiro ano de vida.

LA SCOLA & RAOULT (1999) mencionam soronegatividade entre os diferentes sorotipos de *B. henselae* por eles isolados. Reações cruzadas entre espécies dos gêneros *Bartonella* e *Chlamydia* têm sido relatadas e com isso a possibilidade de equívocos diagnósticos, sobretudo em manifestações clínicas que possam ser causadas por espécies dos dois gêneros, como endocardite. MAURIN et al. (1997) confirmaram estes achados por técnica de microimunofluorescência e Western Blot.

As diferenças genotípicas e fenotípicas observadas entre espécies de *B. henselae* e sua possível variedade antigênica podem justificar os resultados sorológicos inconsistentes no diagnóstico de doenças como a DAG.

Para LA SCOLA & RAOULT (1999), a sorologia não serve para diagnóstico de AB, já que seus pacientes foram na grande maioria soronegativos e tiveram o diagnóstico confirmado em 100% deles pela detecção gênica por PCR. Os autores associam tal fato à imunodeficiência dos pacientes.

#### 2.3.4. Detecção gênica por técnicas de biologia molecular

Os métodos de detecção e avaliação gênica por biologia molecular têm a finalidade não só de auxiliar no diagnóstico diferencial do espectro das doenças relacionadas às bactérias pertencentes ao gênero *Bartonella*, mas também de auxiliar nos estudos epidemiológicos das espécies e das cepas deste gênero ou na sua genotipagem. A identificação delas baseia-se na caracterização molecular do isolado ou de material suspeito de infecção. Estes materiais podem ser coletados por biópsia ou aspirado de linfonodos de pacientes com suspeita de DAG, bactérias que crescem de hemoculturas de pacientes com endocardite ou febre recorrente, amostras de tecidos como linfonodo, fígado, baço, cérebro, pulmão, coração, rim e pele de humanos, felinos ou outros animais, ou cultura de bactérias armazenadas em laboratório.

O DNA a ser avaliado pode ser extraído de fragmentos fixados em formol, embebidos em parafina ou de biópsias congeladas.

Estes estudos podem utilizar técnicas de PCR associada ou não às técnicas de análise do perfil de restrição enzimática (RFLP), à avaliação do perfil de segmentos repetitivos amplificados (REP e ERIC) ou à hibridização com sondas específicas.

Podem ainda ser analisados comparativamente a outros métodos de tipagem, como eletroforese em campo pulsátil (PFGE).

Os produtos da PCR também podem ser seqüenciados para confirmar que o fragmento amplificado é o esperado, atestando assim a especificidade do mesmo.

Alguns genes das bactérias deste gênero foram clonados e seqüenciados para servir de base no delineamento de *primers* gênero - e espécie - específicos para a identificação das bactérias (ZANUTTO, 2000).

A região intergênica 16S-23S rRNA, por sua maior extensão no gênero *Bartonella*, quando comparado a outros gêneros, foi utilizada por JENSEN et al. (2000) para a amplificação de espécies de relevância médica. Esta região mostrou-se um alvo apropriado porque contém regiões com seqüências divergentes o suficiente para a diferenciação das

espécies e das regiões com homologia que permite o uso de apenas um par de *primers*. Após a amplificação, cada espécie pode ser identificada pela diferença do peso molecular dos fragmentos obtidos.

Os autores correlacionaram o nível da concentração de unidades formadoras de colônias/ml de *B. henselae* que o método detectava no sangue de felinos experimentalmente infectados. Cem por cento das amostras sanguíneas dos felinos com bacteremia entre 50-100 unidades formadoras de colônias/ml tiveram detectadas a seqüência alvo da *B. henselae* e 75% daquelas entre 10-20 unidades formadoras de colônias/ml.

SCHWARTZMAN (1996) ressalta em seu editorial a existência de casos soronegativos porém com confirmação da infecção por espécies de *Bartonella* por técnicas de detecção gênica.

Estudo brasileiro desenvolvido por ZANUTTO (2000) demonstrou que diferentes protocolos de PCR (HSP, FTSZ e BH) aplicados a amostras sanguíneas apresentaram baixa sensibilidade em identificar animais bacterêmicos. O BH-PCR foi o protocolo de sensibilidade maior entre eles. Porém, as amostras de bactérias isoladas dos animais estudados puderam ser identificadas por esses protocolos de PCR.

### **2.3.5. Microscopia**

Além dos achados histopatológicos mencionados na descrição dos diagnósticos da verruga peruana, DAG e AB, respectivamente nos itens **2.1.1.4.**, **2.1.3.4.**, **2.1.4.4.**, cabe ressaltar que as técnicas de imunofluorescência e imuno-histoquímica possibilitam a diferenciação entre as espécies de *Bartonella* (DRANCOURT et al., 1995; ANDERSON & NEUMAN, 1997).

A microscopia eletrônica de transmissão poderá ser eventualmente utilizada na confirmação diagnóstica e seus achados foram descritos no item **2.2.3.**

## 2.4. TRATAMENTO E PREVENÇÃO

Embora tratamentos das diferentes bartoneloses tenham sido comentados durante o texto, algumas observações gerais justificam este item.

O tratamento é mais efetivo para os imunodeficientes do que para os imunocompetentes (SPACH & KOEHLER, 1998).

Poucos são os estudos sobre o tratamento das bartoneloses. Os antibióticos sugeridos são aqueles consagrados pela experiência clínica. Tanto para a fase febril da DC, a febre de Oroya, como para a FT, os antibióticos recomendados como primeira escolha são tetraciclina e cloranfenicol (BASS, VINCENT, PERSON, 1997a).

Para a verruga peruana e casos típicos da DAG, o uso de antibióticos é questionável ainda que o estudo randomizado e duplo-cego conduzido por BASS et al. (1998) tenha demonstrado benefícios clínicos obtidos com o uso de azitromicina em pacientes com DAG típica.

Eritromicina e doxiciclina são as drogas mais utilizadas no tratamento da AB. A associação com rifampicina ou gentamicina pode ser favorável, sobretudo nos pacientes imunodeficientes e/ou com infecções graves como osteomielites, endocardites e peliose hepática severa. Estes pacientes deverão receber inicialmente medicação via IV. O tempo de tratamento deverá ser de três a quatro meses para pacientes imunodeficientes, sendo observado que esquemas curtos favorecem recidivas (KOEHLER, 1995).

Como para os demais quadros de bacteremia febril causados por bartonelas, WELCH et al. (1992) descreveram um paciente imunocompetente com esta clínica causada pela *B. henselae* que respondeu ao uso de cloranfenicol.

MAURIN & RAOULT (1996) comentaram que o tempo de tratamento deve ser mais importante que a escolha do antibiótico. Todos os pacientes HIV-positivos com infecção por *Bartonella* sp. deveriam ser tratados com antibióticos, segundo KOEHLER (1995).

Para SPACH & KOEHLER (1998), pacientes imunodeficientes com AB exclusivamente cutânea deveriam ser tratados por pelo menos dois meses e pacientes com osteomielites ou peliose bacilar deveriam receber antibióticos por, pelo menos, quatro meses. Em havendo recorrência, os pacientes HIV positivos deverão ser tratados continuamente com eritromicina ou doxiciclina.

Para HENSEL & SLATER (1995), na infecção por *Bartonella* spp. não-*bacilliformis* a terapia de escolha foi eritromicina ou doxiciclina por combinar baixo custo, facilidade de administração e efetividade clínica .

A razão de resposta tão diferente com o uso de antibióticos diante de casos de DAG e AB, que melhoram rapidamente após a administração destes fármacos, permanece dúbia (LOUTIT, 1997).

Discrepâncias observadas nos estudos *in vivo* e *in vitro* poderão ser explicadas em parte pelo encontro também intracelular destas bactérias (MAURIN & RAOULT, 1996; SCHUTZE, 2000).

MAURIN & RAOULT (1996) propuseram esquema antibiótico para as infecções por *Bartonella* spp., conforme apresentado na tabela abaixo:

**Tabela 2:** Esquema antibiótico proposto para as doenças causadas pelas espécies de *Bartonella* (adaptado de MAURIN & RAOULT, 1996).

Doença			Duração (sem)
	Adultos	Crianças	
FT	gentamicina 2 mg/kg bid i.m.,	gentamicina, 2 mg/kg bid i.m.	2
	ou doxiciclina, 200 mg od p.o.,	eritromicina, 25 mg/kg tid p.o.	4
AB, LC	gentamicina, 2 mg/kg bid i.m.,	gentamicin, 2 mg/kg bid i.m.	2
	e eritromicina, 500 mg qid p.o.,	eritromicina, 25 mg/kg tid p.o.	4 <sup>c</sup>
BAC, END	ou doxiciclina, 200 mg od p.o.		
	gentamicin, 2mg/kg bid	gentamicina, 2 mg/kg bid	2
	e ceftriaxona, 2 g od i.v.	ceftriaxona, 200 mg/kg od i.v.	4
	ou doxiciclina, 200 mg od p.o.		4 <sup>c</sup>

FT, febre das trincheiras; AB, angiomatose bacilar sem bacteremia; LC, linfadenopatia crônica ; BAC, bacteremia; END, endocardite.

od, uma vez/dia; bid, duas vezes/dia; tid, três vezes/dia; qid, quatro vezes/dia; p.o., per os; i.v., intravenoso; i.m., intramuscular.

<sup>c</sup>8 semanas nos pacientes soropositivos para o HIV.

SCHUTZE (2000) sugeriu apenas que a escolha devesse considerar sulfametoxazol-trimetropim, rifampicina, eritromicina, claritromicina, azitromicina, doxiciclina, ciprofloxacina e gentamicina e que, apesar da resposta *in vitro* aos  $\beta$ -lactâmicos, estes devem ser evitados.

Em gatos, o tratamento daqueles bacterêmicos com enrofloxacina e amoxicina não diminuiu o nível de bacteremia, o que foi obtido com o uso de tetraciclina ou eritromicina. Contudo, a duração da mesma não foi diferente entre os animais tratados ou não (REGNERY et al., 1996). O tratamento de oito gatos bacterêmicos com doxiciclina, realizado por GREENE et al. (1996), negatizou a bacteremia em metade dos animais, porém, na outra metade, o nível de bacteremia ficou mais alto.

O tratamento de infestações cutâneas foi importante durante as epidemias, por exemplo, da FT (MAURIN & SLATER 1996). CHOMEL et al., em 1996, quando comprovaram o envolvimento da pulga como vetor na transmissão da *B. henselae* entre gatos, sugeriram que o controle da infestação dos felinos por este artrópode seja importante fator na prevenção da infecção ao homem, ainda que seu papel pudesse ser indireto.

O tratamento profilático para AB com sulfonamidas ou ciprofloxacina não mostrou eficácia estatística em proteger pacientes com células CD4 menor que 200 por mm<sup>3</sup> de sangue (MOHLE-BOETANI et al., 1996).

OLSEN (1999) considerou que de 1982 a 1994, a pandemia da Aids fez com que, de uma entidade desconhecida, ela se tornasse a principal causa de morte entre pessoas de 25 a 44 anos, nos Estados Unidos. Isto reforçaria a necessidade de aumentar os esforços na tentativa de conseguir-se uma vacina para ser incorporada à rotina vacinal dos gatos, diminuindo, assim, o risco de transmissão da infecção entre crianças e mesmo adultos.

A prevenção da infecção humana pela *B. henselae* supostamente poderia ser obtida pela vacinação de gatos domésticos. Contudo, vacinação de gatos com bactérias inativas conferiram proteção apenas contra a infecção por cepas homólogas às inoculadas (DEHIO & SANDER 1999). A não-existência de proteção cruzada entre cepas de *B. henselae* e entre espécies de *Bartonella*, sugeriu que o uso de um esquema vacinal para ser efetivo em conter a disseminação da infecção entre gatos de determinado lugar, estaria na dependência do uso de vacinas com cepas e espécies que ocorrem nos animais daquela região (YAMAMOTO et al., 1998).

## 2.5. ESPÉCIES DE INTERESSE ASSOCIADAS ÀS BARTONELAS

O'CONNOR et al. (1991) referem que “o subgrupo alpha-2 do ramo alpha da classe *Proteobacteria* contém uma variedade de espécies que são de interesse particular porque podem existir em íntima associação com células eucariontes”. Exemplificam esta interação com a relação endossimbiótica com plantas leguminosa de *Rhizobium* sp. e a relação patogênica planta-bactéria da *Agrobacterium tumefaciens*. Também demonstra esta interação com a associação peri ou intracelular da *Brucella abortus* e *B. quintana* no curso da sua infecção. Outra semelhança é a via de inoculação; a *Brucella abortus* penetra no hospedeiro por uma abrasão. A *A. felis* supostamente entraria em contato com o organismo via cutânea, a partir de arranhaduras ou mordeduras. O mesmo é suposto para a *B. henselae*.

Como para a *B. bacilliformis* e para a *B. quintana*, outra possibilidade de acesso para a *B. henselae*, também cutâneo, seria através de um vetor. Outra similaridade entre algumas espécies deste subgrupo é a capacidade de sobreviver no solo ou em plantas.

A *Brucella abortus* pode manter-se viável por vários meses no solo e, quando infecta um mamífero, caracteriza-se por invadir macrófagos e histiócitos.

Interessante, como comentam MAURIN & RAOULT (1996), é a capacidade que a *Agrobacterium tumefaciens* tem de induzir tumores angioproliferativos em plantas.

Igualmente interessante é o curso de bacteremia protraída e assintomática demonstrada na infecção por *B. henselae* em gatos, reminiscência da infecção por brucela em bovinos, caprinos, suínos e caninos (ABBOTT et al., 1997). Filogeneticamente, as bartonelas são mais próximas da *Brucella abortus* que da *A. felis*.

ALEXANDER (1995) faz referência à infecção por espécie relacionada à *Bartonella* spp., a *Haemobartonella muris*, que em ratos é freqüentemente assintomática até que o animal fique imunodeficiente.

Infecção por microorganismos semelhantes à *Haemobartonella* sp. foi relatada em seis pacientes com Aids, por DUARTE et al., 1992. Tratam-se de microorganismos procariontes da família *Anaplasmataceae* e que infectam células vermelhas do sangue.



A maioria das espécies recebe o nome dos animais que infecta, como *Haemobartonella felis* em gatos ou *Haemobartonella muris* em ratos. Nestes pacientes com Aids foram encontradas estruturas, semelhantes a estas bactérias, em biópsia teciduais, no sangue, em amostra de lavado bronco-alveolar e aspirado de medula óssea, todos à microscopia eletrônica e colorações para microscopia óptica, entre elas Giemsa. Eram visualizados organismos cocóides, de 100-300 nm, em grupos ou isolados. Todos apresentavam anemia, supostamente causada pelo microorganismo.

A infecção, tanto por *Haemobartonella* sp. como por *Eperythrozoon* sp., pode persistir por longos períodos, se não por toda a vida do animal, de forma assintomática.

Ectoparasitas sugadores de sangue são importantes como vetores na transmissão natural desses agentes. O isolamento do microorganismo em meios sem células não é possível. Os mecanismos de defesa do organismo responsáveis por suprimir a infecção e mantê-la latente são pouco conhecidos. Características morfológicas observadas na infecção experimental são, sobretudo, do sistema retículo-endotelial, com esplenomegalia como primeiro sinal de instalação rápida. O pico do aumento do baço de três-quatro vezes o seu normal acontece aproximadamente com sete dias após a infecção, diminuindo rapidamente. Na infecção experimental de camundongos SPF, próximo ao quinto dia após a inoculação aparece maciço infiltrado de blastos e *steam cells* onde estão espalhados macrófagos contendo debris celulares.

Rapidamente, este torna-se difuso, chegando a borrar a morfologia esplênica normal, que dois dias depois começa a ser restabelecida. Dez a 14 dias após, pouca ou nenhuma evidência microscópica de infecção se mantém. Aumento do número de células de Kupffer no fígado é precocemente notada na infecção, mas, depois da segunda semana de infecção, sua concentração já normalizou. Degeneração hepatocelular e necrose multifocal já foram mencionadas na infecção aguda com *Eperythrozoon coccoides* e *Haemobartonella muris*. A ativação de infecção latente pode se dar por esplenectomia cirúrgica ou medicamentosa cursando com anemia grave, muitas vezes fatal. Radiação também pode ativar infecção latente. Testes sistemáticos dos animais de um biotério são necessários para efetivo controle desta infecção. Detecção em esfregaços de amostras de sangue periférico pode ser usada, porém, esplenectomia cirúrgica é o ativador mais

consistente e potente desta infecção podendo ser observada parasitemia maciça 2-4 dias após em camundongos e regride rapidamente a níveis indetectáveis. Os esfregaços podem ser corados com Giemsa. Imunofluorescência indireta também pode ser usada na detecção da infecção. Estas espécies, por esses motivos, podem causar grande dificuldade durante a realização de experimentos com animais com infecção assintomática. Para alguns autores, a forma de infecção assintomática é considerada expressão imunológica atual a uma forma aguda que foi suprimida pela atividade esplênica. O estado de portador pode durar por toda a vida. Resistência genética já foi demonstrada na infecção de linhagens de camundongos isogênicos (BAKER, CASSEL, LINDSEY, 1971; HILDEBRANDT & FOSTER, 1982).

## 2.6. ESTUDOS EXPERIMENTAIS RELACIONADOS

No início do século passado, um paciente internado num hospício da cidade de Lima, capital do Peru, não foi capaz de reproduzir a febre de Oroya, como aconteceu com Daniel Carrión, mas macacos inoculados com o mesmo material apresentaram lesões angiomasas, segundo mencionaram GARCIA-CACERES & GARCIA (1991). Na mesma revisão, houve relato da reprodução das duas fases da DC em macacos inoculados com bactérias cultivadas de paciente. Usando estas mesmas bactérias, outros autores não puderam reproduzir nenhuma das fases. Portanto, pouco se sabe sobre a patogênese da infecção. Contribuem para isso as dificuldades de cultivo da *B. bacilliformis*.

Usando ratos Sprague-Dawley com discos esponjosos implantados no subcutâneo, GARCIA et al., em 1990, demonstraram a atividade angiogênica de um extrato de bartonelas que obtiveram a partir de colônias de *B. bacilliformis*, do ATCC. O mesmo foi injetado três dias após a implantação dos discos esponjosos e avaliação histológica, quatro dias depois, mostrou um aumento no grau de penetração do tecido de granulação na esponja comparando com controles não-inoculados.

Em 1992, o mesmo grupo estimulou a proliferação celular em culturas de células endoteliais de veia umbilical humana. Este estímulo foi proporcional à concentração protéica do extrato bacteriano colocado nestas culturas. Eles demonstraram também a

especificidade deste fator (ou fatores) para células endoteliais. Caracterizaram-no como sensível ao aquecimento, porém não-dialisável. Pelo contrário, houve um aumento significativo da atividade após a diálise, sugerindo que este extrato possa conter fator (ou fatores) de menor peso molecular que inibiria o crescimento ou interferiria com aquele promotor do crescimento (GARCIA et al., 1992). Assim, ficou experimentalmente demonstrado *in vivo* e *in vitro* que a *B. bacilliformis* estimula a proliferação de células endoteliais.

Em 1992, MERNAUGH & IHLER descreveram um fator deformante de eritrócitos, sintetizados por essas bartonelas.

MITCHELL & MINNICK (1995) determinaram *locus* de dois genes da *B. bacilliformis* associados à habilidade de invadir eritrócitos humanos, já descrita por BENSON et al. (1986).

Nenhum dos animais frequentemente usados em laboratório é suscetível à infecção pela *B. quintana* (BASS, VINCENT, PERSON; 1997a). Assim, como estudos em animais para induzir a FT foram infrutíferos, a maioria dos estudos foram levados a efeito em voluntários humanos (MAURIN & RAOULT, 1996).

YU & RAOULT (1994) desenvolveram anticorpos monoclonais para *A. felis* a partir de inoculação em camundongos BALB/c.

MOLARET, REILLY, BASTIN (1951) tentaram reproduzir a DAG em 15 espécies diferentes de animais, porém, só obtiveram sucesso em *Macacus rhesus* pela inoculação via intradérmica (ID) de extrato de linfonodos de pacientes infectados.

ENGLISH et al. (1988) utilizando linfonodos de dez pacientes com critérios para DAG típica, cultivaram bactérias gram-negativas que foram chamadas de “bacilo da doença da arranhadura do gato”. De colônias de bactérias obtida de um desses pacientes, foi produzido anti-soro em coelho branco da Nova Zelândia. Com este anti-soro, a técnica de imunoperoxidase reagiu contra as bactérias isoladas dos dez pacientes. Reagiu também contra tecido humano, inclusive linfonodos, conjuntiva e pele de outros pacientes com diagnóstico de DAG. Com a intenção de reproduzir a DAG, diversos animais foram inoculados, com descrição anedótica, como se segue:

Doze camundongos BALB/c foram inoculados, via intraperitoneal (IP) ou IV, com  $10^8$  bactérias. Um de cada grupo foi sacrificado nos dias um, dois, três, sete, 14 e 21 após a inoculação.

Cinco ratos obtidos do cruzamento de Wistar e Sprague-Dawley foram inoculados, via “intracutânea”, com  $10^9$  bactérias e sacrificados 22 dias após a inoculação.

Um *guinea pig* Hartley foi inoculado, via subcutânea (SC), em diferentes pontos, com um total de  $10^9$  bactérias. Um segundo recebeu a injeção de mesma quantidade de bactérias via IP. Dois e nove dias após, uma biópsia de um dos sítios de inoculação foi realizada e ambos sacrificados com 30 dias após a inoculação.

Uma ninhada de *hamsters* siberianos dourados com menos de 24 horas de vida, foi inoculada com  $2 \times 10^7$  bactérias intracranialmente. Um animal foi sacrificado 12, 24, 36 e 48 horas depois e com 15 e 31 dias após a inoculação.

Um tatu (*Dasyus novencintus*) foi inoculado com  $10^9$  bactérias, distribuídas “em dois pontos de aplicação intracutânea e dois subcutânea”. Outro recebeu a mesma quantidade de bactérias, via IV. Com sete e 14 dias, uma biópsia foi feita de um dos pontos de inoculação via SC.

Fígados e baços dos camundongos e dos *guinea pigs* foram processados para exame histológico. O mesmo se fez com os linfonodos dos ratos, cérebros dos *hamsters* e pele da biópsia realizada com sete dias de inoculação do tatu. Cultura tecidual igualmente foi processada, como para o isolamento dos agentes.

Nenhum dos animais, exceto o tatu, desenvolveu lesões de DAG embora “bacilos e formas pleomórficas delicadas tenham sido cultivadas destes animais com até 15 e 60 dias (bacilos e formas pleomórficas, respectivamente) após a inoculação”.

A bactéria foi endocitada por macrófagos dos espaços subdural e sub-aracnóide dos *hamsters* e espaços linfáticos da pele dos *guinea pigs*.

Bactéria idêntica à inoculada foi cultivada do cérebro dos *hamsters* um, dois, três e 15 dias após a inoculação e, um dia após a inoculação, do fígado e baço dos camundongos.

Formas pleomórficas delicadas foram cultivadas dos cérebros dos *hamsters* 31 e 60 dias após a inoculação do fígado e do baço de camundongos nos dias um, dois, três, 15 e 22. No dia 22 estas formas foram cultivadas dos linfonodos de ratos e no dia 30 nos dos *guinea pigs*.

O tatu inoculado via “intra e subcutânea”, como referem os autores, desenvolveram nódulos cutâneos.

A epiderme estava poupada, mas feixes de fibras colágenas na “subcutis” estavam destruídos. Neutrófilos, macrófagos e eosinófilos ocasionais invadiam estes feixes necróticos.

Alguns nódulos subcutâneos foram cultivados e houve crescimento de bactérias morfológica e bioquimicamente idênticas às inoculadas.

Os autores concluíram com este estudo terem cumprido os postulados de Koch.

Posteriormente, uma cepa dessas bactérias isoladas dos pacientes foi enviada ao CDC e, junto com outras três ali isoladas, foram identificadas como uma nova espécie, a *A. felis* (BRENNER et al., 1991).

Considerando que as manifestações da infecção pela *B. henselae* são mais expressivas em pacientes com a imunidade celular deficiente, RODRIGUEZ-BARRADAS et al. (1995) estudaram o envolvimento da resposta humoral contra a infecção por esta bactéria. Concluíram que a presença de anticorpos específicos não aumentava a atividade bactericida do soro ou a ativação do complemento. A fagocitose e a subsequente produção de radicais de oxigênio na presença de bactérias previamente opsonizadas com soro imune eram, porém, significativamente facilitadas.

Observaram também que o soro humano não-imune, tinha efeito bactericida sobre a *B. henselae* e que isto era mediado por complemento.

FUMAROLA, GIULIANI, PECE (1996) mencionam uma baixa atividade biológica da *B. henselae*, quando comparada com a *Escherichia coli*, demonstradas pela reduzida capacidade de estimulação de macrófagos humanos e produção de citocinas como fator de necrose tumoral e interleucina 1-alfa por células endoteliais.

Outros estudos de modelos animais realizados com riquetsias foram pesquisados dada a escassez de trabalhos com bartonelas publicados, quer com resultados positivos, quer negativos.

A febre maculosa das Montanhas Rochosas, causada pela *Rickettsia rickettsii*, tem, no homem, seu quadro clínico bem estabelecido. Ele é tido como consequência do tropismo endotelial destes agentes. MOE et al. (1976) inocularam  $10^7$  *R. rickettsii*, via IP, em *guinea-pigs* e avaliaram manifestações clínicas, microbiológicas, sorológicas, histológicas e taxa de mortalidade em parte dos animais inoculados. Entre suas conclusões, referiram que a vasculite encontrada possa ser resultado de um efeito tóxico das riquetsias e não necessariamente dependente da presença das mesmas nas células do hospedeiro. No ano seguinte, outros autores, inoculando  $10^4$  unidades formadoras de colônias, pela mesma via e em animais da mesma espécie, observaram que quatro a seis dias após a inoculação os animais passavam a apresentar febre e, poucos dias depois, em geral três, manifestações cutâneas da agressão vascular eram observadas no escroto destes animais. Avaliação histológica, imunológica e ultra-estrutural pôde ser realizada. Na discussão do estudo, os autores fazem relação entre seus achados e possíveis correlações fisiopatológicas com a doença humana (WALKER et al., 1977).

Em 1993, FENG, WEN, WALKER utilizaram camundongos BALB/c, machos, de 6 a 8 semanas de vida, para inocular  $10^5$  ou  $2 \times 10^6$  unidades formadoras de colônias de *Rickettsia australis*, o agente causador do tifo. Um grupo não inoculado serviu de controle. Nos dias três, cinco e sete após a inoculação, camundongos de cada grupo eram exsanguinados, caso morte não houvesse acontecido. Igualmente foram realizados exames histológico, imunológico e ultra-estrutural, além de avaliação de interleucinas, interferon gama e fator de necrose tumoral. Três dias após a inoculação, os animais apresentavam doença moderada que se intensificou nos dias seguintes, levando à morte todos os camundongos inoculados com a maior concentração de riquetsias e não sacrificados até o sexto dia. Os autores referiram ser este o primeiro estudo deste grupo de doenças com documentação do comprometimento endotelial disseminado em modelo com camundongos, oferecendo várias oportunidades para a investigação dos mecanismos patogênicos desta infecção e imunidade desta bactéria intracelular.

Do mesmo grupo é o trabalho sobre a infecção de camundongos C3H/HeN pela *Rickettsia coronii*, outra riquetsia do complexo de bactérias intracelulares obrigatórias transmitidas ao homem por carrapatos, pulgas, mosquitos e piolhos, que no homem causa doença. Este modelo foi considerado o que melhor mimetizava riquetsioses humanas e foi desenvolvido com a inoculação via IV de, aproximadamente,  $10^3$  ou  $10^5$  unidades formadoras de colônias em camundongos machos, de seis a oito semanas de vida.

Os animais inoculados com a menor concentração de bactérias mostraram sinais da infecção no quinto dia após a inoculação e tiveram doença moderada com desaparecimento dos sinais com dez dias. Nenhum deles morreu. Aqueles inoculados com a concentração maior adoeceram no quarto dia e morreram todos entre o quinto e o sexto dias. A avaliação histológica seriada realizada nos dias um, três e cinco para os inoculados com a maior concentração de bactérias e cinco, 10 e 15 para os inoculados com a menor concentração, possibilitou a observação de que a infecção por esta riquetsia se estabeleceu no primeiro dia, as lesões se desenvolveram no terceiro e marcada redução de bactérias se observou no décimo dia, associado a infiltrado linfo-histiocitário vasocêntrico. Nos inoculados com a concentração maior, no terceiro dia, havia evidências do comprometimento endotelial disseminado. No quinto dia, as lesões eram qualitativamente indistinguíveis entre os inoculados com diferentes concentrações. Outras observações histológicas foram feitas, bem como avaliação imunológica e ultra-estrutural (WALKER et al., 1994).

ANDERSON & OSTERMAN (1980) avaliaram a base genética da resistência natural à infecção experimental em camundongos pela *Rickettsia akari*, agente da riquetsiose pustulosa. Demonstraram existir três tipos de resposta à inoculação IP desta bactéria em camundongos isogênicos: susceptíveis (C3H/HeJ), intermediários (A/HeJ, A/J, A/WySn, BALB/cDub, BALB/cJ e SJL/J) e resistentes (AKR/J, AL/N, BALB/cAnN, BALB/cNCr1BR, C3H/HeN, C57BL/6J, C57L/J, CBA/J, DBA/2J e SWR/J). Das quatro linhagens não-isogênicas testadas, todas foram resistentes. A avaliação de híbridos sugeriu que a resistência está sob controle multigênico.

Inoculando uma cepa avirulenta da mesma riquetsia, os camundongos susceptíveis (C3H/HeJ) foram capazes de produzir resposta imunológica que os tornou resistentes a uma reexposição com a cepa letal anteriormente testada.

SLATER et al. (1992) fazem menção a estudos preliminares que mostraram que “certos animais naturalmente não produzem anticorpos específicos contra *B. henselae* e *B. quintana* e também toleram inoculação via IP de grande quantidade de organismos viáveis destas espécies, sem morbidade aparente”. No estudo então publicado, obtiveram resposta imunológica distinta para cada uma dessas espécies utilizando fêmeas adultas de camundongos CD-1. Nele, oito grupos de três a seis desses camundongos foram inoculados, via IP, semanalmente, por três semanas e, sete dias após a última inoculação, sacrificados sob anestesia, sendo exsanguinados. Seis grupos receberam cepas de *B. henselae* (uma delas cepa padrão, ATCC 87-66) e dois grupos cepas de *B. quintana* (uma sendo a ATCC VR358). O inóculo variou aproximadamente de  $10^6$  a  $10^8$  unidades formadoras de colônias para todas as cepas exceto para a *B. quintana* isolada clinicamente, com aproximadamente  $10^5$  unidades formadoras de colônias. Houve estimulação antigênica adequada e específica independente da proporção dos organismos inoculados, que eram viáveis. Comparação entre soro pré e pós inoculação foi realizada por teste imunoenzimático, por imunoblot e imunofluorescência, após absorção feita com a outra espécie que não a inoculada. Pelos resultados obtidos, concluíram que grande produção de anticorpos contra antígenos de *B. henselae* e *B. quintana* podem ser induzidos pela inoculação de bactérias em camundongos, sendo estes altamente espécie específicos, havendo reação cruzada entre cepas intra-espécie.

Desde 1996, trabalhos experimentais com gatos, conhecido reservatório da *B. henselae*, vêm sendo publicados.

Investigando a possibilidade de artrópodes ectoparasitas, que obrigatoriamente se alimentem de sangue, agirem como vetores da infecção pela *B. henselae* em gatos, HIGGINS et al., 1996, demonstraram que pulgas de gatos (*Ctenocephalides felis*) são capazes de ingerir, permitir a replicação em seu intestino e excretar bactérias em suas fezes quando se alimentavam de sangue com concentração desta bactéria semelhante à encontrada no sangue de gatos infectados. Conseguiram tais resultados utilizando “pulgas padrão” que se



alimentaram por uma hora de sangue com  $10^5$  unidades formadoras de colônias de *B. henselae*. Suas fezes foram avaliadas uma, seis, 24 e 48 horas e seis e nove dias após. Exemplares dessas pulgas foram também avaliados com um, dois, seis e nove dias.

Culturas em ágar-sangue de coelho foram realizadas dos intestinos e das fezes, havendo crescimento, freqüentemente observado no quinto dia. A imunofluorescência evidenciou as bartonelas nos intestinos das pulgas. Qualitativamente, houve maior fluorescência no nono dia, sugerindo ter havido replicação na luz intestinal.

Dificuldades foram encontradas na amplificação do DNA bacteriano pela técnica de PCR, possivelmente porque as técnicas empregadas neste estudo tenham sido descritas para a recuperação do agente em sangue ou tecidos, relativamente estéreis se comparados com o intestino da pulga. Os autores constataam a relação simbiótica entre o artrópode e a bactéria, mas comentaram da necessidade de estabelecer-se experimentalmente a transmissão de *B. henselae* ao gato mediada pela pulga.

Tal intento foi alcançado por **CHOMEL et al. (1996)** que demonstraram a transmissão da *B. henselae* pela pulga do gato. Para tanto, observaram por 12 meses 47 gatos de um só domicílio particular, para determinar a prevalência de bacteremia por *B. henselae* nestes animais e da presença desta bactéria nas pulgas que infestavam todos eles, por exame microbiológico, imunológico e avaliação por biologia molecular, por meio de coleta sangüínea cinco vezes no ano. Destes, 85% tinham mais de um ano, com média de 4,4 anos, e 89% deles estavam bacterêmicos pelo menos em uma das coletas sangüíneas. Todos eram sorologicamente positivos.

Removendo pulgas de gatos naturalmente bacterêmicos e transferindo-as para cinco filhotes de três a cinco meses de idade, de padrão sanitário SPF, mantidos numa unidade isoladora sem artrópodes, sendo estes examinados clinicamente e com coleta de sangue uma vez por semana para cultura, sorologia e hemograma completo. Em três deles, a quantidade de pulgas foi padronizada em 15 por gato, sendo congelado a  $-70^{\circ}$  C outro *pool* de pulgas para pesquisa do DNA da bactéria por técnica de PCR. Bacteremia foi detectada duas semanas após a infestação experimental em quatro deles e em um com seis semanas. Anticorpos foram detectáveis por imunofluorescência quatro a cinco semanas após a exposição às pulgas. Dois destes tiveram culturas negativas após 11 a 12 semanas de

bacteremia, porém um deles apresentou três reincidências de culturas positivas no período de um ano. Nos restantes, a bacteremia foi persistente e também elevados títulos de anticorpos. Nenhum dos gatos apresentou anormalidades clínicas ou do hemograma.

Cinco outros filhotes foram infectados experimentalmente, via ID, com aproximadamente  $10^6$  unidades formadoras de colônias e tornaram-se bacterêmicos ( $10^4$  unidades formadoras de colônias/ml de sangue) após duas semanas da inoculação. Eles mantiveram-se bacterêmicos por pelo menos 15 semanas. Nenhum apresentou sinais de infecção ou alteração laboratorial. Dois novos filhotes, todos SPF, sem infecção, foram mantidos juntos com os primeiros por 21 semanas, em ambiente sem artrópodes. Não houve transmissão direta da *B. henselae* entre os gatos, apesar das brincadeiras, dos arranhões e das mordidas do convívio.

O DNA da *B. henselae* foi identificado por amplificação usando *primers* 16SrRNA p24E e p12B, que são específicos para espécies de bartonelas. Ele foi detectado em 39% das pulgas com variação sazonal, chegando a 80% daquelas retiradas dos gatos bacterêmicos dos quais foram removidos os vetores na primeira parte do experimento.

Os autores concluíram que, embora a transmissão pela pulga parecesse ser eficiente entre gatos, não existia confirmação epidemiológica que sustentasse a transmissão ao homem por esta via. A pulga potencialmente teria papel indireto, porém substancial na doença humana, por amplificar o tamanho do reservatório. Satisfazendo com o estudo os critérios entomológicos para considerar a pulga um vetor da *B. henselae*, o controle da infestação dos felinos por este artrópode pode ser um importante fator na prevenção da infecção ao homem.

UENO et al., também em 1996, mostraram que a co-infecção de *B. henselae* e o vírus da imunodeficiência felina (FIV) parece estar associada a linfadenopatia e gengivite em gatos. Para tanto, informação sobre sintomas clínicos de 170 gatos foi obtida de clínicas veterinárias e deles obtidas amostras de soro. Foram então realizadas sorologias para *B. henselae*, FIV e para o vírus da leucemia felina (FeLV). A avaliação estatística sugeriu que nenhum dos vírus influencia na prevalência da infecção pela *B. henselae* em gatos. Nenhuma outra associação clínica estatisticamente significativa foi feita.

REGNERY et al. (1996) para elucidar a cinética da bacteremia por *B. henselae* induzida experimentalmente em gatos e a resposta na produção de IgG contra esta bactéria, selecionaram seis gatas SPF, soronegativas para *Bartonella* spp., inoculando aproximadamente  $10^7$  unidades formadoras de colônias de *B. henselae* (Houston-1), via ID e subcutânea em duas delas. Outras duas foram inoculadas com *B. quintana* (OK-90268).

Nas demais, foi injetado meio BHI (*brain and heart infusion*). Amostras sanguíneas foram coletadas com intervalo de dois a três dias no primeiro mês e, a partir daí, com intervalo mínimo de 15 dias. As gatas inoculadas com *B. henselae* desenvolveram bacteremia com uma semana e esta persistiu por dois meses, com remissão espontânea.

Anticorpos da classe IgG foram detectados poucos dias após a instalação da bacteremia por *B. henselae* e se mantiveram em níveis detectáveis por mais de seis meses. As gatas inoculadas com *B. quintana* não fizeram bacteremia, porém, foi observada soroconversão que se manteve durante toda a observação. Nas gatas infectadas com *B. henselae* houve reação cruzada com anticorpos contra *B. quintana*.

Os animais controles, mantidos no mesmo ambiente, não apresentaram sinais clínicos de infecção, bacteremia ou soroconversão. Após nove meses da resolução espontânea inicial da bacteremia naquelas inoculadas previamente com a *B. henselae*, todas as seis gatas foram tratadas, por duas semanas, com tetraciclina, empiricamente, para eliminar possível infecção indetectável residual. Um mês após este tratamento, os seis animais foram reinoculados da mesma forma e com a mesma concentração de *B. henselae*. As gatas que já haviam sido inoculadas com esta bactéria não apresentaram bacteremia e as outras quatro tiveram quadro em duração e títulos semelhantes às primeiramente inoculadas com a referida bartonela.

Para avaliar a eficácia antibiótica em reduzir ou eliminar a bacteremia em gatos, 25 animais, machos, de 8 meses de idade aproximadamente, SPF, foram inoculados com a metade da concentração anterior, via SC e foram seguidos quanto ao desenvolvimento de bacteremia. Grupos de cinco animais foram tratados entre os dias 14 e 27 com os eritromicina, tetraciclina, enrofloxacina e amoxicilina, nas doses usuais de uso veterinário. Um grupo permaneceu de controle não-tratado. A bacteremia e a soroconversão prévia ao

tratamento desenvolveram-se como para as gatas do primeiro experimento. Para os gatos tratados com enrofloxacin e amoxicilina a resposta bacterêmica e imunológica manteve-se indistinguível dos controles não-tratados. Os tratados com eritromicina e tetraciclina tiveram efeitos significantes estatisticamente entre os dias 34 e 55, porém, diferença no tempo de desaparecimento da bacteremia não foi estatisticamente significante.

Estudo sobre a ação antibiótica foi também realizado por **GREENE et al. (1996)**. Eles inocularam oito gatos com aproximadamente  $10^6$  unidades formadoras de colônias de *B. henselae* (Houston-1), sendo metade do volume inoculado via ID e a outra metade, SC. Estas bactérias haviam sido recuperadas do paciente inicial e mantidas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , sendo descongeladas naturalmente até a temperatura ambiente antes de ser semeadas. Obtiveram bacteremia em todos os gatos já com uma semana e eles mantiveram-se bacterêmicos até receberem tratamento com doxiciclina por uma semana. Sete dos oito gatos tiveram suprimidas sua bacteremia no final da semana de tratamento. Quatro destes assim se mantiveram durante o mês seguinte ao do tratamento. Os três animais restantes e aquele que não deixou de ser bacterêmico aumentaram seu nível de bacteremia. Estes quatro foram então tratados com amoxicilina. Destes, três ficaram sem bacteremia por cinco semanas após o tratamento.

O quarto deles teve diminuído o nível de bacteremia depois deste tratamento, porém havia recebido a metade da dose que os outros três, inadvertidamente. Foi-lhe administrada enrofloxacin e, como manteve bacteremia, com a associação clavulanato-amoxicilina, tornando-se abacterêmico por quatro semanas. Todos foram reexpostos a uma segunda inoculação da mesma bactéria, porém não se tornaram bacterêmicos, sugerindo que a imunoprofilaxia em gatos pode ser benéfica em ajudar a reduzir seu risco em saúde pública.

**ABBOTT et al. (1997)** avaliaram a infecção experimental e natural por *B. henselae* em gatos domésticos. Para tanto, acompanharam uma gata de laboratório, de 14 meses, naturalmente infectada pela bactéria, seguida por 24 meses com sorologias por imunofluorescência indireta e culturas, semanais ou quinzenais, por técnica de lise e centrifugação. Para observar a transmissão horizontal, um gato adulto, SPF, não-infectado foi colocado com a primeira por seis meses. Inicialmente, a gata era bacterêmica e possuía

altos títulos de anticorpos. O nível de bacteremia gradualmente declinou até cinco meses depois, quando se tornou negativa. Após dois meses, novamente pode-se detectar bacteremia. Ciclicamente, havia negatização e positividade da bacteremia com intervalos de aproximadamente dois meses. Os títulos sorológicos mantiveram-se constantes pelos 24 meses. O gato não se tornou bacterêmico e não soroconverteu, apesar de, inclusive, terem cruzado.

Para a inoculação experimental foram usados 16 gatos SPF e cinco felinos adultos de laboratório infectados com o FIV. Todos eram livres de infecção pela *B. henselae*. Suas idades variavam de dois a 18 meses e foram mantidos todos em condições livre de artrópodes. Exame clínico, hemocultura, sorologia e hemograma completo seguiram o protocolo anterior e linfócitos CD4 e CD8 foram incluídos. Os animais foram inoculados com a cepa isolada da gata naturalmente infectada, identificada por análise molecular. A quantidade inoculada, número de gatos e os resultados são mais facilmente observados na tabela:

**Tabela 3:** Inoculação experimental em gatos domésticos com *Bartonella henselae* (adaptada de ABBOTT et al., 1997)

Vias de inoculação	Quantidade (UFC <sup>+</sup> )	Número de animais	Bacteremia	Soroconversão
IV <sup>''</sup>	5 x 10 <sup>1</sup>	5 *	1/5	1/5
IV	5 x 10 <sup>1</sup>	5	1/5	1/5
IV	5 x 10 <sup>1</sup>	3	0/3	0/3
IV	2 x 10 <sup>5</sup>	3	0/3	3/3
ID <sup>#</sup>	8 x 10 <sup>2</sup>	3	3/3	3/3
ID	1 x 10 <sup>8</sup>	5	5/5	5/5

<sup>+</sup> unidades formadoras de colônias; \*animais infectados com vírus da deficiência felina, sem manifestações clínicas; <sup>''</sup> intravenoso; <sup>#</sup> intradérmico

Apenas dois dos 16 gatos inoculados via IV tornaram-se bacterêmicos, com positividade entre nove e 13 dias, mantendo-se assim por aproximadamente três meses. Nos seis meses seguintes, mantiveram-se com hemocultura negativas. Os anticorpos apareceram seis semanas após a inoculação nestes gatos, atingindo os maiores títulos com três meses, declinando gradualmente em três a quatro meses a títulos estáveis de 1:256 – 1:512. Somente outros três filhotes, inoculados com concentração maior de bactérias, também soroconverteram, embora não tenham feito bacteremia.

Todos os inoculados via ID tornaram-se bacterêmicos, os que receberam a quantidade maior com nove dias e os demais entre 12 e 28 dias. Seis deles mantiveram-se assim de sete a 20 semanas e dois por tempo maior que as 20 semanas que duraram o estudo. Todos soroconverteram após a inoculação via ID, a maioria deles coincidindo com a instalação da bacteremia. Os títulos estabilizaram-se, como nos inoculados via IV, ainda que seis tenham negativado a cultura.

Os cinco filhotes inoculados com  $10^6$  unidades formadoras de colônias foram mantidos co-habitando com dois filhotes SPF de mesma idade para avaliação de transmissão horizontal. Para avaliar possível transmissão vertical, quatro gatas com aproximadamente duas semanas de gestação foram inoculadas com aproximadamente  $10^7$  unidades formadoras de colônias da bartonela.

Nenhum dos dois filhotes usados como controle negativo tornou-se bacterêmico ou soropositivo. As gatas gestantes tornaram-se bacterêmicas duas semanas após a inoculação, mantendo-se assim por pelo menos três meses. Duas soroconverteram duas semanas após a inoculação e as outras com quatro semanas. Por ocasião dos partos, os títulos variavam entre 1:512 e 1:1024. Dos 22 filhotes nascidos das quatro gatas, quatro não sobreviveram. Dos restantes, nenhum tornou-se bacterêmico e apenas quatro, filhos da mesma gata, soroconverteram. Com 40 dias de vida, já estavam soronegativos e assim se mantiveram no mês subsequente.

Dois dos gatos inoculados com *B. henselae*, via ID, e que já se mantinham sem bacteremia há 14 e 18 semanas, foram reinoculados, agora com aproximadamente  $10^8$  unidades formadoras de colônias. Ambos tinham títulos de 1:256-1:512 quando da reexposição.

Estes animais não se tornaram bacterêmicos nesta segunda vez, durante sete semanas. O nível de anticorpos elevou-se até 1:1024, duas semanas após, em um dos gatos, mantendo-se estável no segundo.

Durante todo o estudo, todos os gatos mantiveram-se saudáveis.

Os autores concluíram que a bacteremia pode ser cíclica e com flutuação em seus níveis. Também, que a via ID é mais efetiva em induzir bacteremia. Comentam que este resultado pode dever-se à pequena dose do inóculo utilizada e consideram que a vacinação poderia ser útil em prevenir a infecção em gatos e limitar exposição humana, mas o desenvolvimento da vacina seria difícil já que a imunidade para a infecção parece desenvolver-se vagarosamente e uma pequena porcentagem de gatos infectados são portadores assintomáticos por muito tempo, apesar da presença de anticorpos.

Em 1997, GUPTILL et al. publicaram trabalho cujo propósito era descrever sinais clínicos, resposta imune e avaliação histopatológica de gatos SPF experimentalmente inoculados com *B. henselae*. Utilizaram 18 gatos machos, de 12 semanas de idade, com teste negativo para anticorpos IgM e IgG para *B. henselae* e *B. quintana* e cujas mães também eram soronegativas. Eles não apresentavam anticorpos contra o FIV e o FeLV. Foram mantidos em caixas individualizadas em ambiente com isolamento protetor.

Três semanas antes da inoculação, amostras sangüíneas foram coletadas para cultura, sorologia, hemograma completo e análise bioquímica. Foi coletada urina, por cistocentese, para análise. Eles foram divididos em quatro grupos de quatro e outros dois, mantidos como sentinelas, deixados para conviver com gatos que apresentassem bacteremia. Os grupos de um a três foram inoculados, respectivamente, com  $10^{10}$ ,  $10^8$  e  $10^6$  unidades formadoras de colônias de *B. henselae*, via IV. O quarto grupo foi inoculado com soro fisiológico. Avaliação clínica deu-se duas vezes por dia, com o examinador desconhecendo a identificação dos grupos até a 16<sup>a</sup> semana. Um gato de cada grupo seria sacrificado e necropsiado com quatro, oito, 16 e 32 semanas após a inoculação. Sangue foi obtido quatro dias depois da inoculação e depois semanalmente no primeiro mês, quinzenalmente no segundo e mensalmente até serem sacrificados. A urina foi coletada para cultura com seis, oito, 10, 12 semanas e quando do sacrifício dos animais. Foram coletados fragmentos para cultura de rotina aeróbica de medula óssea, baço, fígado, rim e glândula salivar. A bartonela inoculada foi primariamente isolada de um gato de um paciente com DAG minimamente subcultivada.

Dos resultados clínicos obtidos, febre transitória foi observada em alguns gatos, predominantemente no grupo 2, e letargia, com duas horas da inoculação, que durou três horas. Todos os gatos do grupo 1, inoculados com a menor concentração, desenvolveram febre, nos dias 9 e 10, que persistiu por cinco-sete dias e dois no grupo 2, nos dias 13 e 16, que persistiu dois dias. Um gato do grupo inoculado com a concentração maior (grupo 3), apresentou febre, no dia 22, que durou quatro dias. Neste gato encontrou-se um abscesso hepático, sem outros sinais ou sintomas clínicos, no dia 28, quando foi necropsiado. Um gato do grupo 1 e um reservado como sentinela foram necropsiados no dia 14, já que no primeiro grupo todos os gatos haviam apresentado febre. O gato sentinela restante foi mantido com o grupo 1 das semanas oito a 32 pós-infecção. Enfartamento ganglionar generalizado foi observado, sobretudo na região submandibular e poplíteia dos 11 gatos inoculados e vivos após duas a seis semanas.

Hiperplasia linfóide foi constatada no exame citológico realizado do aspirado com agulha fina destes linfonodos.

Neutrofilia moderada foi observada dois dias depois da resolução do quadro febril no gato que apresentou o abscesso hepático. Outras alterações laboratoriais não foram encontradas, com exceção das microbiológicas.

Todos os gatos inoculados com *B. henselae* ficaram bacterêmicos com duas semanas, o que persistiu até a 16<sup>a</sup> semana, quando todos os gatos restantes negativaram suas culturas sanguíneas. Dos bacterêmicos, não houve diferença consistente na contagem de colônias. O gato do grupo 1 sacrificado com duas semanas apresentou cultura positiva para a bartonela de fragmentos do fígado, do baço, do rim e da medula óssea. O mesmo aconteceu com as culturas do fígado do gato do grupo 3, sacrificado com quatro semanas. As urinas foram sempre negativas.

Não houve variação do resultado esperado para gatos SPF na resposta blastogênica.

Igualmente, a relação CD<sub>4</sub>: CD<sub>8</sub> foi similar entre os quatro grupos. Células secretoras de anticorpos *Bartonella*-específicos foram detectados no baço, na medula-óssea e nos linfonodos de todos os gatos infectados e não nos demais. Sorologia realizada por teste imunoenzimático mostrou a presença de anticorpos da classe IgM e IgG em todos os gatos infectados e mantiveram-se elevados, inclusive no gato sentinela.



Poucas bactérias foram vistas em colorações com a prata no baço do gato do grupo 1 sacrificado com duas semanas. Algumas bartonelas foram identificadas por imunohistoquímica no fígado e baço deste animal e também no fígado do gato do grupo 2 examinado com quatro semanas e no baço daquele do grupo 2 examinado com 32 semanas após a infecção. Nestes casos, a bactéria foi encontrada no tecido extracelular tanto em pequenos agrupamentos como isoladas.

Alterações histopatológicas foram encontradas apenas nos animais infectados, sendo atribuídas à *B. henselae*. Hiperplasia linfóide do baço, de moderada a acentuada, com desenvolvimento dos centros germinativos. No gato do grupo 1 sacrificado com duas semanas evidente expansão da zona marginal foi observada. Agregados de neutrófilos circunscritos formando microabscessos foram observados na polpa vermelha do baço deste animal. No gato do grupo 2 sacrificado na quarta semana um aumento de neutrófilos no mesmo local foi constatado. Hiperplasia linfóide acentuada caracterizada por um paracórtex aumentado com folículos secundários, com centro germinativo, foi observada nos linfonodos clinicamente acometidos. No gato do grupo 2 sacrificado com oito semanas foi observado em seu linfonodo dois pequenos granulomas necrotizantes coalescentes com quantidade moderada de neutrófilos no córtex e na medula dos linfonodos do gato do grupo 1 sacrificado na mesma ocasião. Ainda no primeiro gato sacrificado do grupo 1 foi encontrado nos sinusóides do fígado neutrófilos em número aumentado e pequeno foco de necrose em seu parênquima. No gato do grupo 3 sacrificado com quatro semanas um abscesso de 5 mm fazia protusão na cápsula de seu fígado além de pequenos focos de necrose pelo parênquima. No gato do grupo 1 sacrificado com oito semanas havia dois pequenos focos de inflamação granulomatosa no fígado e no gato do grupo 2 sacrificado nesta mesma época, um agregado neutrofílico isolado foi observado. Nefrite piogranulomatosa e miocardite intersticial foi vista no gato do grupo 2 sacrificado com quatro semanas.

Com estes achados, os autores concluíram que gatos podem ser infectados com a inoculação via IV de *B. henselae* na quantidade de  $10^6$  a  $10^{10}$  unidades formadoras de colônias. Eles questionam se as manifestações clínicas encontradas como linfonodopatia e febre com anorexia e letargias passam despercebidas pelos donos de gatos pela fugacidade

e pela pouca intensidade dos achados. Linfonodomegalia generalizada foi observada em todos os gatos infectados e os autores fazem associação com quadros idiopáticos semelhantes já descritos.

O atraso de duas semanas observado na soroconversão do grupo 3 em relação aos grupos 1 e 2, pode ter-se dado pela concentração menor do agente inoculada. As bacteremias diminuíaam quando aumentavam os níveis de IgG. Considerando a resposta de células T esperada na blastogênese linfocítica nos gatos infectados, a soroconversão, a presença de células secretoras de anticorpos nos tecidos e a imunofenotipagem linfocítica também normal nos gatos infectados, os autores concluíram que a *B. henselae* não é imunossupressiva para gatos. Sugerem também que a *B. henselae* pode ser seqüestrada em locais imunologicamente protegidos nos gatos, talvez o sistema nervoso central.

O gato sentinela que conviveu com os bacterêmicos do grupo não desenvolveu bacteremia e também não apresentou alterações histológicas.

A localização tecidual exata da *B. henselae* não está determinada em gatos infectados experimentalmente. Os poucos microorganismos encontrados pela imunohistoquímica eram extracelulares e não estavam associados a lesões inflamatórias, o que pode representar uma efetiva resposta local do hospedeiro. Isto pode estar ligado ao encontro esporádico de bactérias extracelulares em abscessos de linfonodos de pacientes com DAG em imunocompetentes e da particular dificuldade de encontro das bactérias após um mês de história da doença.

Finalizam sugerindo que este modelo pode ser útil para testar a eficácia de uma possível vacina que previna a bacteremia persistente e possibilitou o fornecimento de informações úteis sobre a infecção por esta bactéria no hospedeiro natural conhecido, permitindo melhor entendimento dos mecanismos de interação hospedeiro-bactéria.

**GUPTILL et al. (1998)** estudaram cinco felinos SPF, fêmeas, inoculando-as, via ID, com  $4 \times 10^7$  unidades formadoras de colônias de *B. henselae* isolada de um gato de um paciente com DAG e minimamente subcultivada e após uma passagem *in vivo* num gato SPF. A suspensão de inoculação foi obtida utilizando-se diluição por equivalência à escala

de McFarland. No primeiro mês após a inoculação, amostras sanguíneas foram coletadas semanalmente para cultura bacteriana e sorologia e, depois, mensalmente. Foram colocadas para cruzamento com um gato não-inoculado. Semanalmente, as gatas foram avaliadas quanto à possível gestação com palpação abdominal e com ultra-som com duas, três, e seis semanas

Uma gata não-inoculada foi mantida com um gato para controle.

Em todos os locais de inoculação desenvolveram-se eritema, edema e induração com 48 horas e quatro das cinco gatas desenvolveram abscessos nestes locais duas-três semanas após. Neste período, desenvolveu-se adenopatia regional palpável e que durou duas-quatro semanas. Dos aspirados dos abscessos cresceram *B. henselae*. Dois deles desenvolveram nistagmo horizontal, que persistiu por todo o experimento, e outro dos animais, tremores de todo o corpo que começaram 48 horas após a inoculação e duraram até o sétimo dia. A gata controle ficou grávida cinco semanas após o início do experimento, com um cruzamento. Das gatas inoculadas com a *B. henselae*, duas engravidaram com 16 semanas, após múltiplos cruzamentos. De uma delas nasceram três filhotes, um com hidrocefalia, e da outra, seis filhotes nasceram, um deles morto. Uma terceira das cinco gatas engravidou com seis semanas, após dois cruzamentos, e foi sacrificada com seus filhotes na semana final de gestação. Outras duas tiveram diagnóstico ultra-sonográfico, na segunda semana após o primeiro cruzamento, e, na terceira semana, a gestação não se confirmou. Posteriormente, não houve indícios de gestação, apesar de terem sido mantidos os cruzamentos até a semana 22 pós-inoculação.

As gatas infectadas não transmitiram a infecção aos gatos com os quais cruzaram.

As duas gatas que não mantiveram a gestação foram cruzadas durante bacteremias e também durante períodos de culturas sanguíneas negativas. A transmissão vertical não ocorreu, mesmo durante a amamentação.

Em novembro de 1998, foi publicado o estudo de **REGNATH et al. (1998)**. Eles consideravam as vantagens que os roedores oferecem em estudos imunológicos e que a inexistência de um modelo animal apropriado limitava o entendimento da patogênese e resposta imune da infecção pela *B. henselae*. Inocularam, por isso, camundongos C57BL/6

e camundongos BALB/c com dez a 12 semanas de vida. Utilizaram *B. henselae*, ATCC 49882, e, com a intenção de aumentar e manter virulência das bactérias, fizeram passagens *in vivo*, inoculando-as em camundongos, via IP, numa concentração de aproximadamente  $10^7$  a  $10^8$  unidades formadoras de colônias. Três dias depois, fizeram remoção dos baços e, homogeneizados, foram injetados em frascos de cultura.

No quinto dia de crescimento, as bactérias foram coletadas e reinoculadas. Após pelo menos quatro passagens, aproximadamente  $10^8$  unidades formadoras de colônias viáveis foram inoculadas via IP. Grupos de cinco animais foram sacrificados 6 horas após a inoculação. Diariamente, outros grupos de cinco animais foram sacrificados, do primeiro ao sexto dia após a inoculação. Depois, com dez, 21, 36, 64 e 94 dias, novos grupos foram sacrificados. De cada animal foi coletado fragmento de fígado, baço, pulmão, rim e cérebro e semeados. Amostras sanguíneas do dia do sacrifício também foram cultivadas após lise por congelamento ou uso de água destilada. Nenhum dos camundongos mostrou qualquer sinal de infecção. O clearance de organismos cultiváveis dos tecidos hepáticos e esplênicos se deu no sexto dia de infecção. Do sangue e do cérebro poucos organismos puderam ser cultivados apenas na sexta hora pós inoculação, em três dos cinco animais. A detecção gênica por técnica de PCR foi positiva em todos os camundongos examinados até três meses após a infecção experimental, o que indica a presença da bactéria no tecido hepático. O exame histopatológico demonstrou presença de pequenos agregados de linfócitos e monócitos no terceiro dia após a infecção e aumentou nos dias seguintes. Na segunda semana, reação granulomatosa era esboçada, chegando à organização máxima na quarta semana e redução progressiva até que, no terceiro mês após a inoculação, o tecido hepático não apresentava nenhuma alteração inflamatória. Os autores consideraram que o elemento chave para a obtenção dos resultados foram as passagens *in vivo*, prévias ao início do experimento.

Em dezembro do mesmo ano, foi publicado trabalho de VELHO et al. no qual também utilizaram camundongos BALB/c para a inoculação experimental via ID de quantidade semelhante da mesma cepa de *B. henselae*. Parte dos camundongos eram imunocompetentes e outra parte com a imunidade celular deficiente geneticamente. IFI foi realizada de amostras sanguíneas coletadas nos dias zero, três, sete, dez, 14, 28, 60 após a

inoculação e avaliação histológica do fígado, do baço, do linfonodos, da pele e de outros órgãos foi feita com 21 e 60 dias. Hemoculturas foram coletadas nos dias dos sacrifícios e semeadas. Todos os animais imunodeficientes apresentaram-se letárgicos no quarto dia após a inoculação, o que não foi observado entre os imunocompetentes. A IFI foi negativa para todas as amostras coletadas e a hemocultura também. A avaliação histológica tardia não evidenciou nenhuma alteração imputável à infecção, evidente, transitoriamente, entre os imunodeficientes.

**FOIL et al. (1998)** objetivaram determinar em seu estudo se a transmissão de *B. henselae* poderia ocorrer diretamente pela picada da pulga, pela ingestão de pulgas e fezes de pulgas ou pela injeção via ID de fezes de pulga. Para este propósito, pulgas foram colocadas em seis gatos SPF, de quatro-sete meses de vida, para sugá-los. Três destes gatos foram inoculados, via ID, com aproximadamente  $10^7$  unidades formadoras de colônias de *B. henselae* LSU16 (isolada de um gato naturalmente infectado) e os três restantes inoculados com salina. No décimo dia após a inoculação, os gatos foram infestados com pulgas e sugados por 4d. As fezes das pulgas foram coletadas no quarto dia. As pulgas dos três gatos bacterêmicos foram agrupadas, e as fezes do quarto dia destes artrópodes também. O mesmo se fez com as pulgas e suas fezes colocadas nos gatos não-infectados. No 14º dia pós-inoculação, os três gatos infectados estavam bacterêmicos e todos haviam mostrado sinais de infecção. Dos gatos não-infectados, um foi inoculado com 1 ml de sangue de cada gato bacterêmico via ID. Vinte novos gatos foram divididos em quatro grupos. Cinquenta pulgas expostas aos gatos bacterêmicos foram colocadas nos gatos de um dos grupos por seis dias. No segundo grupo de gatos, 45 mg de fezes das pulgas dos gatos bacterêmicos foram suspensas em salina e injetadas, via ID. No terceiro grupo, os gatos ingeriram a mesma quantidade de fezes de pulgas e mais 50 pulgas expostas à *B. henselae*. O quarto grupo recebeu os três tratamentos. Os cinco gatos do grupo que recebeu fezes via ID foram os únicos a ficar bacterêmicos uma a duas semanas após a inoculação e soroconverterem. Os autores sugerem que a penetração de fezes contaminadas por uma barreira cutânea comprometida por arranhadura ou outra abrasão poderia ocorrer e deveria ser considerada como uma possibilidade de transmissão por um artrópode.

**KORDICK et al. (1999)** sugeriram que várias doenças consideradas idiopáticas em gatos possam ser causadas por espécies de *Bartonella*, pois inocularam 18 gatos SPF com sangue de outros gatos infectados com *B. henselae* tipo II e/ou *B. clarridgeiae* e observaram várias alterações histológicas em 13 animais sacrificados após 454 dias da inoculação. Os gatos inoculados ficaram bacterêmicos intermitentemente, sem manifestações clínicas da infecção, exceto por um deles que apresentou nistagmo, movimentos focais e rigidez intermitente no dia 252. Estes sinais involuíram espontaneamente. A sororreatividade observada não teve necessariamente correlação temporal com bacteremia provada por cultura. Eosinofilia foi a única alteração hematológica constante entre os animais. No estudo microscópico dos animais sacrificados não foram encontrados achados específicos, porém hiperplasia folicular reativa foi evidente nos linfonodos de todos os gatos. Hiperplasia folicular esplênica também foi freqüentemente encontrada e, no fígado, pequeno acúmulo mononuclear entre os hepatócitos ou associado a necrose hepatocelular. Todos os animais sacrificados apresentaram detecção gênica por PCR de diferentes tecidos, principalmente hepático. Não houve também aparente diferença entre os gatos que receberam sangue infectado com *B. henselae* daqueles infectados com *B. henselae* e *B. clarridgeiae*.

**O'REILLY et al. (1999)** inocularam nove gatos, de sete a 15 meses de idade, com *B. henselae*, cepa LSU16. Posteriormente, três gatos receberam 1 ml de sangue de um dos nove inicialmente inoculados. Cinco outros foram inoculados com 45 mg de fezes de pulgas que conviveram com gatos inoculados com a mesma cepa por quatro dias. Os nove primeiros foram inoculados com aproximadamente  $10^7$  unidades formadoras de colônias e os outros três com  $10^6$  unidades formadoras de colônias em 1 ml de sangue total. Todos os 17 gatos desenvolveram níveis elevados de bacteremia, com pico entre duas-quatro semanas.

Clinicamente, os animais apresentaram febre, letargia, edema e/ou eritema do local de inoculação, anorexia. Alguns apresentaram também mialgia, alteração de comportamento e linfonodopatia. A *B. henselae* não foi cultivada do líquido coletado dos animais que tiveram alterações do comportamento, da urina ou de qualquer amostra tecidual, coletadas na semana 8 ou 22 pós-inoculação, quando os animais foram sacrificados. A resposta imune foi seguida com testes imunoenzimáticos e todos os animais

apresentaram anticorpos IgG em altos níveis na quarta semana e que se mantiveram até o final do experimento. Anticorpos IgM elevaram-se na terceira semana pós-exposição.

Embora os achados clínicos observados tenham sido semelhantes aos descritos anteriormente por outros pesquisadores, foram considerados mais constantes e severos com a utilização desta cepa, o que os levou a concluir que ela seja mais patogênica em gatos que outras cepas previamente utilizadas.

Um obstáculo às investigações da história natural pela infecção pelas *Bartonella* spp. e sua transmissão tem sido a inexistência de um modelo animal apropriado para o estabelecimento da infecção experimental e que a manutenção de gatos em laboratório limita seu uso. Por isso, **KOSOY et al. (1999)** fizeram a inoculação experimental de *cotton rats* com cepas de *Bartonella* spp. isoladas de roedores. Referem que a habilidade dessas espécies de *Bartonella* agirem como patogênicas ao homem é desconhecida e que a resposta à IFI entre os roedores foi indetectável ou com baixos títulos para as cepas deles isoladas, independentemente de serem bacterêmicos ou não. Identificaram as cepas como A, B e C, por análise de seqüenciamento e sorotipagem. A espécie A foi repicada cinco vezes e as espécies B e C três vezes. Separaram dez grupos de três animais. Um deles foi usado de controle. Outros três grupos receberam, via IP e SC,  $10^3$  unidades formadoras de colônias da espécie A, B e C, respectivamente. De forma similar, outros três grupos receberam  $10^7$  unidades formadoras de colônias. Outros três grupos receberam a concentração maior, porém de bactérias das três espécies previamente irradiadas, sendo reinoculadas sete semanas depois por igual espécie, também irradiada. Todos os animais inoculados com bactérias viáveis ficaram bacterêmicos, o que persistiu por aproximadamente cinco-sete semanas. Os que receberam baixas doses fizeram bacteremia de maior duração e tão intensa quanto os que receberam concentrações altas, ou mesmo maiores. Nenhum, porém, teve manifestações clínicas da infecção. Quanto à resposta imune, os inoculados com dose alta de bactérias viáveis fizeram altos níveis de anticorpos específicos, na segunda semana após a infecção. Aqueles inoculados com concentrações menores demoraram mais para responder e fizeram títulos menores. Todos os inoculados com bactéria irradiadas também desenvolveram anticorpos específicos, porém não apresentaram bacteremia, exceto um dos animais inoculados com a espécie B. Neste animal, a bacteremia foi alta, à semelhança daqueles que receberam baixas doses de

bactérias viáveis. Na semana 11, após o início do experimento, os seis grupos que receberam altas concentrações das bactérias foram reutilizados quando já não apresentavam bacteremia. Nesta ocasião, os animais foram reexpostos inclusive à espécies diferentes. Houve resistência a exposição homóloga, porém a reexposição à espécie diferente levou a um nível de bacteremia comparável ao da inoculação inicial, sugerindo não haver proteção cruzada entre diferentes espécies de *Bartonella* spp., entre os roedores.

## 2.7. OS CAMUNDONGOS IMUNODEFICIENTES

**RYGAARD & POVLSEN (1982)** escreveram sobre o mutante atímico, que tem se tornado cada vez mais importante em imunologia e outros campos da pesquisa biomédica. Inicialmente reconhecidos pela ausência de pêlos, receberam o nome de “*nude*”, símbolo genético *nu* por ter sido demonstrado haver um gen único, autossômico e recessivo envolvido com esta característica. Apresentam redução do crescimento corpóreo e extrema diminuição da expectativa de vida. Mais tarde, observou-se que o homocigoto para tal gen não tinha timo, sendo descrita leucopenia, importante nestes animais. Os fenotipicamente normais, que apresentavam leucopenia, eram todos heterocigotos para tal gen. Este foi o primeiro modelo animal de grave imunodeficiência causada sobretudo pelo déficit de linfócitos T. Alterações das imunoglobulinas desses camundongos foram observadas, porém consideradas como secundárias ao defeito tímico. Depois dos camundongos, outros animais, como ratos, foram descritos com mutantes nus e atímicos. O gen *nu* foi transferido para várias linhagens isogênicas de camundongos.

Sobre a patologia desses animais, os autores comentam que os linfonodos têm depleção linfocitária paracortical, sem desenvolvimento secundário de folículos e ausência de linfócitos nas áreas timodependentes periarteriolas do baço.

Estes animais têm sido muito utilizados em pesquisa sobre câncer, transportando-lhes tumores diretamente ou linhagens de células tumorais humanas como também em estudos sobre carcinogênese e terapia. Além disso, eles são utilizados em doenças auto-imunes experimentais e, pela imunodeficiência predominante de células T, possibilita avaliar a resposta imune celular e sua importância na proteção contra infecções e infestações.





***OBJETIVOS***

Considerando as diferentes bartoneloses, a importância da *B. henselae* nesta família, a epidemiologia da infecção por esta bactéria, a evolução potencialmente fatal desta infecção, especialmente em pacientes imunodeficientes e, considerando ainda, a virulência deste agente ser uma das múltiplas variáveis envolvidas nos resultados inconstantes das investigações experimentais, foram propostos os estudos:

1. das bartoneloses humanas e suas relações com as infecções experimentais;
2. do seguimento dos animais infectados experimentalmente por *B. henselae*, nos primeiros dias após sua inoculação;
3. das alterações determinadas no fígado e no baço dos animais, imunocompetentes e imunodeficientes utilizados;
4. das características morfológicas de colônias de uma cepa *B. henselae*, macroscópicas e microscópicas, à microscopia de luz e à microscopia eletrônica de transmissão, antes e após as passagens *in vivo*, em camundongos.



***MATERIAS E  
MÉTODOS***

#### **4.1. OBJETIVO 1**

Realizada uma revisão bibliográfica, a partir do banco de dados Medline, da Bireme, predominantemente até março de 2001, a partir dos unitermos: *Bartonella*, electron microscopy, fimbriae, animal model, mice.

#### **4.2. OBJETIVOS 2, 3 e 4**

A relação entre estes objetivos justificam a descrição conjunta dos mesmos.

##### **4.2.1. Animais e bactéria**

Foram utilizados 12 camundongos fêmeas, da linhagem BALB/cAn, de padrão sanitário S.P.F. (livre de patógenos específicos).

Seis deles tinham 50 dias de vida e a imunidade celular comprometida por gen *Nu*. Os outros seis animais tinham 30 dias de vida e eram imunocompetentes. O peso médio deles era de 22g e 17g, respectivamente.

Os camundongos foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo (Cemib) Unicamp, que é um dos três centros reconhecidos pelo Iclas (International Consul for Laboratory Sciences).

Os animais foram recebidos em caixas de PVC (cloreto de polivinil) de 30 x 12 cm, com maravalha, e transferidos imediatamente para sala de acesso restrito, no Laboratório de Microbiologia da Seção de Controle de Qualidade Sanitária, localizado no Instituto de Biologia da Unicamp. Eles foram manuseados de acordo com as orientações do Conselho Canadense sobre Cuidados com Animais (**CONSEJO CANADIENSE DE PROTECCIÓN DE LOS ANIMALES, 1998**).

Inicialmente, foram retirados os animais imunodeficientes usados na fase A do experimento. Os *nudes* foram recebidos do referido centro em caixas com isolamento protetor para o transporte.

Eles foram mantidos, dois a dois, em caixas semelhantes às descritas e identificadas pelas siglas IV, IP e ID. As caixas foram forradas com maravalhas autoclavadas de *Pinus* sp. que foram trocadas de dois em dois dias. Receberam *ad libitum* água potável por gotejamento e ração autoclavável CR-1, Nuvital. O início do experimento aconteceu seis horas depois da retirada dos animais.

Nove dias depois, os animais imunocompetentes foram retirados, transferidos para a mesma sala e mantidos, dois a dois, em caixas semelhantes às descritas e identificadas da mesma forma. Eles estiveram sob as mesmas condições que os primeiros. A inoculação que deu início à fase B ocorreu no dia seguinte.

Todos eles foram inoculados com concentração estimada de *B. henselae* (Houston 1, American Type Culture Collection, Rockville, MD, ATCC 49882<sup>T</sup>). Essas bartonelas foram inicialmente recuperadas de um paciente com Aids com quadro febril, em Houston, em 1990, sendo mantidas a -70°C (REGNERY et al., 1992a).

O Prof. Dr. Didier Raoult, da Unidade de Riquetsias da Faculdade de Medicina de Timone, em Marselha, forneceu amostra desta cepa ao Prof. Dr. Mário E. Camargo do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo. Colônias destas bactérias, com nove dias de crescimento, foram, posteriormente, encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica, setor de Microbiologia, do Hospital das Clínicas, HC-Unicamp, onde foram mantidas. As bartonelas foram semeadas em placas de Petri com meio de Müller-Hinton, enriquecido com 5% de sangue de carneiro.

O laboratório de microbiologia do HC- Unicamp é um laboratório de rotina para diagnóstico que atende todo complexo hospitalar que compreende o Hospital de Clínicas, o Pronto Socorro deste hospital, o Caism (Centro de Atendimento Integrado à Saúde da Mulher), o Gastrocentro e o Hemocentro. Nele são realizados, em média, 9 mil exames por mês.

Os meios utilizados foram preparados no próprio serviço, com ágar de Müller-Hinton (CM 337, Oxoid). Foram utilizados meios com 24 horas de preparo, guardados sob refrigeração a 8°C, sendo aquecidos à temperatura ambiente imediatamente antes da semeadura.

Neste laboratório, as bactérias foram mantidas em jarras de 3,5 litros, da Becton Dickinson, com geradores de anaerobiose (Anaerobac, Probac do Brasil). Estes geradores foram usados seguindo as instruções do fabricante, com viragem colorimétrica indicando efetivo funcionamento no consumo de oxigênio e produção de gás carbônico. Com a adequada conversão do sistema, eram colocadas em estufa a 37°C.

#### **4.2.2. Modelo experimental**

Para a obtenção das colônias a serem estudadas comparativamente à microscopia eletrônica de transmissão, o estudo foi dividido em duas fases.

Na primeira delas (fase A), os camundongos imunodeficientes seriam inoculados.

Após seis dias, amostras teciduais e sangüíneas seriam coletadas e cultivadas.

Para dar início à segunda fase (fase B), bactérias, recuperadas de alguma cultura positiva, seriam suspensas para ser inoculadas nos animais imunocompetentes. No sexto dia após a inoculação desses animais, amostras sangüíneas e teciduais seriam coletadas e semeadas. Havendo recuperação do agente de alguma dessas culturas, o estudo morfológico das colônias teria seguimento.

##### **4.2.2.1. Fase A**

As bartonelas recebidas para o experimento foram repicadas no laboratório por três vezes. Colônias dessas bactérias, com dez dias de crescimento, foram coletadas superficialmente e diretamente do ágar de uma das placas e imersas em BHI (*brain heart infusion*) para a obtenção da suspensão de inoculação. Esta suspensão foi diluída com BHI até a equivalência com o tubo 10 da escala de McFarland (MCFARLAND, 1907). Este procedimento permitiu a obtenção de uma suspensão inicial com concentração de aproximadamente  $3 \times 10^9$  unidades formadoras de colônias/ml.

Para a primeira fase, foram recebidos os seis camundongos imunodeficientes.

Cada grupo de dois animais, colocados em caixas distintas, foi inoculado pelas vias IV no plexo ocular, IP ou ID. A concentração do inóculo foi de  $3 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias, num volume de 0,1 ml da suspensão inicial, para os animais inoculados vias IV e IP. Nos dois animais restantes,  $9 \times 10^7$  unidades formadoras de colônias foram inoculadas via ID num volume de 0,03 ml, da mesma suspensão, na região interescapular.

No dia inicial, foi coletado sangue para realização de exame direto.

No primeiro, terceiro e sexto dias após a inoculação, amostras sangüíneas foram coletadas para exame direto.

No sexto dia, os animais foram anestesiados com 0,04 ml de uma mistura de 0,5 ml de Rompum (xiliasina a 2%, Bayer) com 1,6 ml de Ketalar (quetamina, Happyvet), inoculados via IP. Amostras sangüíneas foram coletadas por punção intracardíaca, lisadas em tubos apropriados e semeadas. O fígado e o baço de cada animal foram retirados assepticamente, fragmentados sobre uma placa de Petri estéril e semeados para cultura. Outros fragmentos, dos mesmos tecidos, foram conservados em formaldeído tamponado a 10%, para posterior avaliação histopatológica.

#### **4.2.2.2. Fase B**

Na segunda fase, quatro dias depois de sacrificados os animais do primeiro grupo, os seis camundongos imunocompetentes foram inoculados com bactérias obtidas da hemocultura positiva de um animal imunodeficiente inoculado via ID. Essas bactérias foram igualmente imersas em BHI, e o mesmo procedimento se fez para obter uma suspensão de inoculação com a mesma concentração que a inicial.

A inoculação se fez, dois a dois, pelas mesmas vias e com as iguais concentrações e volumes anteriormente descritos. O estudo repetiu-se, da mesma forma.

Tendo havido morte, à exceção do esfregaço e da cultura sangüínea, os demais procedimentos foram realizados.

#### **4.2.2.3. Fase C**

Para a avaliação ultra-estrutural, foram utilizadas colônias das bactérias recuperadas da suspensão de inoculação da fase A (colônia I), colônias obtidas da suspensão inoculada nos animais da fase B (II) e colônias recuperadas do baço de um camundongo morto, do final do experimento (III). De cada uma dessas colônias foram coletadas amostras com diferentes dias de crescimento bacteriano.

### **4.2.3. Técnicas**

#### **4.2.3.1. Observação clínica**

Todos foram observados clinicamente, pela manhã e no final de tarde, durante os seis dias entre a inoculação e o sacrifício, tanto na fase A como na B.

#### **4.2.3.2. Exame direto**

Uma gota de sangue coletada por trauma no rabo de cada animal e colocada em lâmina de vidro previamente desengordurada com álcool 70°GL. Foi feito o esfregaço e corado pelo método de Giemsa 1:10, em água tamponada e fixado em metanol por três minutos.

#### **4.2.3.3. Bacteriologia**

Alíquotas das suspensões utilizadas para a inoculação nos camundongos, tanto da fase A como B, foram semeadas em placas de Petri com MHS para avaliar a viabilidade das bactérias injetadas nos animais. O mesmo se fez com as culturas teciduais coletadas dos camundongos no final das referidas fases.



As amostras sanguíneas das punções intracardíacas foram colocadas em tubos de 1,5 ml, para lise microbiana, com saponina e polianetolesulfonato de sódio (Isolator Microbial Tube 1,5 da Wampole Laboratories). Do sangue lisado foram semeados, mesmo sem centrifugação, aproximadamente 0,3 ml por placa, como as descritas.

Todas as placas foram mantidas em jarras, com os geradores de anaerobiose já descritos e em estufa, a 37°C.

Todas as culturas foram mantidas por seis semanas antes de ser descartadas, com leituras, diárias na primeira semana e, pelo menos, semanais a partir da segunda semana.

A identificação das colônias se fez por suas morfologias, coloração de Gram e teste da oxidase.

Bactérias das colônias I, II e III foram coletadas das placas em que as amostras foram semeadas e congeladas a -20°C, diretamente em sangue de carneiro tratado com EDTA. Para o estudo ultra-estrutural, foram, posteriormente, descongeladas em temperatura ambiente e então semeadas em placas com meio MHS, em duplicata.

As placas foram todas incubadas em jarra com anaerobiose e esta mantida à mesma temperatura descrita. Quinze dias depois foram abertas para avaliação macroscópica das colônias, realização de exame microbiológico direto corados pelo Gram e testes da catalase e oxidase. Dessas placas foram coletadas colônias para fixação em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965).

As placas voltaram a ser mantidas em anaerobiose, sendo coletadas novas amostras das três colônias com 25, 35 e 45 dias de crescimento.

#### **4.2.3.4. Microscopia de luz do fígado e do baço**

Os fragmentos de fígado e baço foram fixados e processados rotineiramente para inclusão em parafina. As amostras parafinadas foram então seccionadas em cortes de 4-5µ de espessura. Alguns destes cortes foram coletados em lâminas, desparafinados e corados pela técnica de HE e pelo método de Giemsa para posterior análise histológica.

#### **4.2.3.5. Microscopia das colônias**

Amostras das colônias I, II e III foram diretamente fixadas na solução descrita, pH 7,2, durante pelo menos duas horas. Após serem fixadas em tetróxido de ósmio 1% por duas horas, foram deixadas *over night* em acetato de uranila 0,5%. A desidratação foi feita em uma série crescente de acetona e a inclusão feita em resina Araldite, permanecendo na estufa a 60°C por 48 horas. Os cortes semifinos foram feitos em torno de 300 nm, com navalha de vidro, no ultramicrotomo MT-6000 XL-RMC e corados com azul de toluidina 2%, para melhor seleção da área e avaliação panorâmica das colônias. Estes cortes foram examinados à microscopia de luz. Cortes ultrafinos, de aproximadamente 90 nm, foram realizados com navalha de diamante (Diatome), no ultramicrotomo Leica Ultracut UCT, colocados em tela de cobre e corados com citrato de chumbo. Foram examinados no microscópio eletrônico LEO-906 da Zeiss.



***RESULTADOS***

## **5.1. OBJETIVO 1**

A revisão bibliográfica foi apresentada na introdução deste trabalho e considerações a respeito deste estudo serão tecidas no capítulo da Discussão.

## **5.2. OBJETIVO 2**

Para o seguimento dos animais foram usados:

5.2.1. observação clínica diária;

5.2.2. exame direto do sangue coletado nos dias 1, 3 e 6 após a inoculação;

5.2.3. bacteriologia das culturas teciduais e sangüíneas, coletadas no sexto dia da infecção experimental.

### **5.2.1. Observação clínica**

Vinte e quatro horas depois de iniciado o experimento, quatro animais imunodeficientes apresentaram-se letárgicos. Eram aqueles inoculados vias IV e IP. No dia seguinte, estes já não exibiam evidência clínica de infecção, porém os inoculados via ID estavam letárgicos, o que também não durou mais de um dia.

Na fase B, os seis animais imunocompetentes mostravam-se, todos, letárgicos na avaliação do primeiro dia após a inoculação e, um dos inoculados via IV, com tremores sugestivos de bacteremia.

Exceto pela letargia, nenhuma outra observação como pápula de inoculação ou outras lesões cutâneas, febre, diarréia, inapetência ou alteração de comportamento, foram constatadas nos animais inoculados.

No dia do sacrifício dos camundongos imunocompetentes, na fase B, o mesmo animal que havia apresentado tremores foi encontrado moribundo pela manhã e, à tarde, morto, mas ainda sem rigidez.

### **5.2.2. Exame direto**

No primeiro dia após a inoculação dos animais imunodeficientes, todos os esfregaços sangüíneos corados pelo método de Giemsa mostravam grumos da bactéria.

Bartonelas isoladas também podiam ser identificadas entre as células. Não foram evidentes bactérias aderidas à superfície das hemáceas. Em nenhum dos esfregaços coletados no terceiro dia de infecção foi constatada a presença das bartonelas e, no sexto dia, foram negativos apenas os exames dos camundongos inoculados via IP.

Na segunda fase, tanto no primeiro, terceiro como no sexto dias após a inoculação das bactérias, todos os esfregaços mostravam grandes grumos de *B. henselae*, independentemente da via de inoculação.

### **5.2.3. Bacteriologia**

Alíquotas das suspensões de bactérias utilizadas para a inoculação tanto na fase A quanto na fase B foram semeadas e apresentaram crescimento da *B. henselae*.

Na fase A, as culturas sangüíneas tornaram-se rapidamente positivas em quatro dos seis animais imunodeficientes infectados. Com 24 horas, a cultura de um dos camundongos inoculados via ID já estava positiva. As únicas a manterem-se negativas após quatro dias, foram as dos dois camundongos inoculados via IV.

Três semanas após a coleta, uma dessas culturas tornou-se positiva, mantendo-se a outra negativa, pelas seis semanas de observação.

Todas as culturas de fragmentos hepáticos e esplênicos semeados mostraram abundante crescimento bacteriano, já com quatro dias após a coleta, inclusive as do camundongo inoculados via IV que se manteve com hemocultura negativa durante as seis semanas de observação.

Foram utilizadas, para inoculação nos imunocompetentes, bactérias obtidas da cultura sangüínea de um camundongo imunodeficiente, inoculado via ID, coletadas com quatro dias de crescimento.

Na fase B, dos cinco animais imunocompetentes vivos na hora do sacrifício foram coletadas amostras sangüíneas para culturas. Todas apresentaram crescimento das bartonelas.

Nesta fase, as hemoculturas dos camundongos inoculados intradermicamente foram as que não estavam positivas em observação com 24 horas de crescimento.

Nos dois animais inoculados via IP e no animal inoculado via IV que estava vivo na hora do sacrifício a positividade da cultura era evidente apesar do pouco tempo de incubação.

Do camundongo morto e dos demais, todas as culturas teciduais realizadas foram positivas, já com 72 horas de incubação. Aspecto de véu sobre o meio de cultura foi observado em todas estas culturas.

As culturas teciduais e sangüíneas obtidas nesta fase tiveram abundante crescimento.

As colônias, utilizadas para avaliação ultra-estrutural, chamadas de III, foram obtidas do baço daquele animal que apresentou morte espontânea.

### 5.3. OBJETIVO 3

#### 5.3.1. Microscopia de luz do fígado e do baço

Examinando os fragmentos de baço, dos animais imunodeficientes, todos mostravam evidente lise folicular, especialmente aqueles inoculados via IP. A polpa vermelha apresentava-se congesta e hipercelular, com aumento numérico de segmentados. Nos inoculados via IP, havia a mesma alteração sobretudo na região subcapsular. Também megacariócitos apresentavam-se proliferados. Exceto nos camundongos inoculados via IV, pôde-se observar proliferação endotelial. Naqueles inoculados via ID, esta proliferação assumia aspecto agiotamos e, em áreas, fibrótico (Fig. 3). Em um deles também notou-se um microabcesso hilar.

As alterações hepáticas, muito mais tênues, foram de um leve infiltrado inflamatório portal e aumento de megacariócitos, observáveis nos inoculados vias ID e IP. Microabcessos lobulares foram notados nos inoculados vias ID e IV. Na zona 2 (médio-zonal), os hepatócitos exibiam sinais degenerativos, com marcado edema intracelular nos inoculados vias IV e IP. Em um dos inoculados via IP, em um espaço portal maior, foi observado infiltrado rico em eosinófilos e neutrófilos.

Alterações hepáticas e esplênicas foram muito mais discretas nos animais imunocompetentes. No baço, apenas os inoculados IP mostraram leve aumento volumétrico de polpa vermelha e do número de neutrófilos. Um deles apresentou pequena área de proliferação capilar subcapsular.

Nos fragmentos de fígado houve um leve infiltrado inflamatório portal. No fragmento hepático do animal morto, foram observados vacúolos citoplasmáticos em hepatócitos e hiperplasia de células de Kupffer. Havia tendência à formação de granuloma (Fig. 3).

A coloração com Giemsa não acrescentou novos achados ao estudo.

## 5.4. OBJETIVO 4

### 5.4.1. Macroscopia das colônias

**Tabela 4:** Resumo das alterações morfológicas do fígado e do baço dos camundongos imunodeficientes (fase A) e dos imunocompetentes (fase B).

	Imunodeficientes (fase A)	Imunocompetentes (fase B)
Baço	.lise folicular (maior nos IP) .polpa vermelha: congestão e hiper celularidade com aumento de neutrófilos e megacariócitos .proliferação endotelial (exceto nos IV) .microabcesso hilar (em um ID)	.leve aumento polpa vermelha e aumento de neutrófilos (nos IP) .proliferação capilar subcapsular (em um IP)
Fígado	.leve infiltrado inflamatório portal .aumento de megacariócitos (IP/ID) .microabcessos lobulares (ID/IV) .zona 2 com hepatócitos degenerados .infiltrado rico em eosinófilos e neutrófilos no espaço porta (em um IP)	.infiltrado inflamatório portal leve .vacúolos citoplasmáticos em hepatócitos, volumosas células de Kupffer e tendência a formação de granulomas (no IV, morto)

IP: camundongos inoculados via intraperitoneal, IV: camundongos inoculados via intravenosa, ID: camundongos inoculados via intradérmica

As colônias chamadas de I, recuperadas da suspensão de inoculação da fase A, tinham aspecto mucóide e eram pequenas e acastanhadas, superficialmente colocadas no ágar. Estas colônias eram semelhantes àquelas observadas na primeira placa recebida para o estudo.

As colônias recuperadas da suspensão de inoculação utilizada nos animais imunocompetentes eram esbranquiçadas, secas, de aspecto rugoso e fortemente aderidas ao ágar.



As colônias de número III, recuperadas no final da fase B, formaram um aspecto de véu, forrando toda a superfície do ágar. Tanto esta característica como o odor exalado quando se abria a jarra, mantida em anaerobiose, lembravam as características observadas em culturas de *Proteus* sp., o que sugeria a presença de contaminantes nessas placas. Esta possibilidade foi descartada pelos exames já mencionados e pela avaliação ultra-estrutural.

Ao exame direto corado pelo método de Gram, as bactérias das colônias I eram mais cocóides e menos aderidas, enquanto as bartonelas das colônias III eram mais bacilares e apresentavam-se em grumos, na maioria. As colônias II eram as mais pleomórficas das três.

O teste da oxidase foi negativo para as diferentes colônias. O teste da catalase foi negativo para as colônias I e III e positivo para as colônias II.

#### **5.4.2. Microscopia das colônias**

Observando-se as colônias das bartonelas, nos cortes semifinos e ultrafinos, foram encontradas áreas claras e escuras. Essas imagens foram comuns às diferentes amostras (I, II e III) coletadas com 15, 25, 35 e 45 dias.

À microscopia eletrônica de transmissão, pôde-se notar que, nas regiões elétron-densas, predominavam bactérias com numerosas fímbrias longas, o que lhes conferia uma parede celular mais espessa. Nas elétron-lúcidas observou-se uma maior quantidade de bartonelas com poucas e menores fímbrias ou sem as mesmas.

Outro fator que permitia o contraste entre estas áreas era a disposição do conteúdo protéico citoplasmático; nas áreas escuras havia distribuição mais homogênea deste material e, quando apareciam os pontos negros (*dark spots*), que nesse caso possivelmente correspondem ao DNA densamente compactado, o restante do citoplasma não se corava, apresentando-se claro.

As áreas elétron-lúcidas apresentavam microorganismos agregados, maiores e menos uniformes que a maioria dos encontrados nas áreas elétron-densas, onde as bartonelas tinham tamanho e contornos mais regulares.

Essas áreas assumiam disposição particular nas colônias I, a partir do 25º dia, com a porção elétron-densa disposta em faixa convexa, na superfície livre de uma secção transversal, achando-se a porção mais elétron-lúcida, em contato com o ágar (Fig. 3).

Nas colônias I, mesmo nos diferentes dias, a densidade de bactérias manteve-se sem grande variação. Somente uma porcentagem pequena delas passou a apresentar *dark spots* no seu interior, pouco organizados, mesmo nas colônias com 45 dias (Fig. 4, Fig. 5).

Nestas colônias, as bactérias mais elétron-densas mantiveram suas fímbrias, que eram estruturas longas e numerosas, até o dia 45 (Fig. 4, Fig. 5).

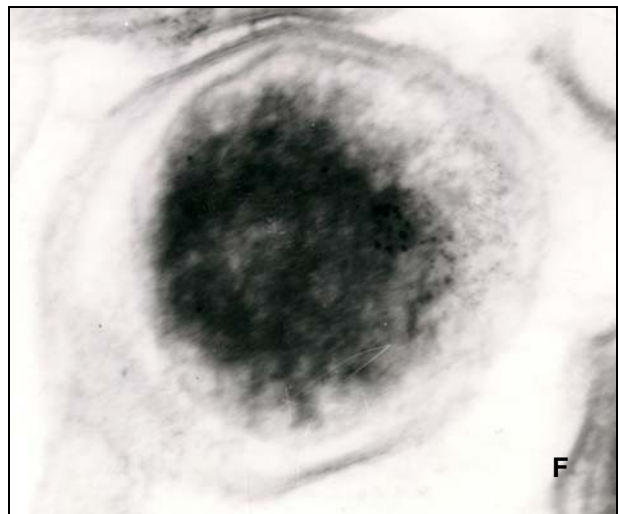
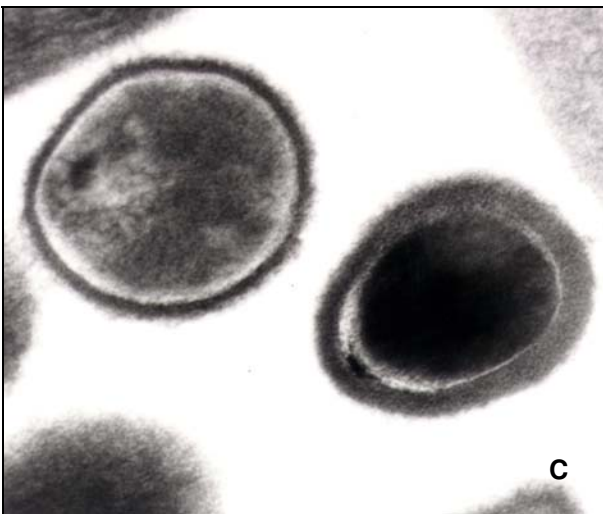
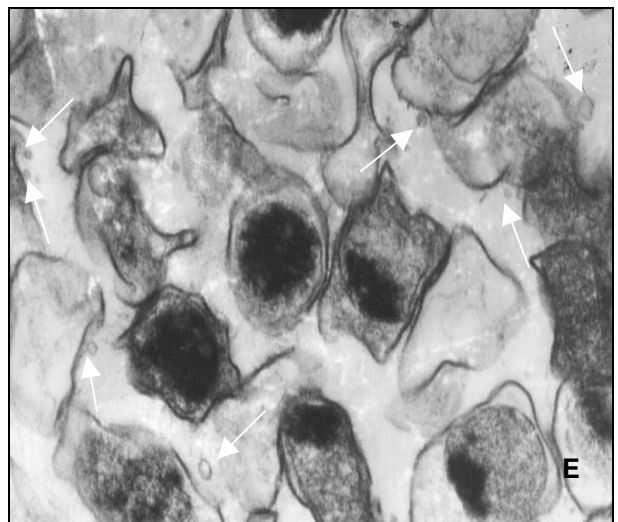
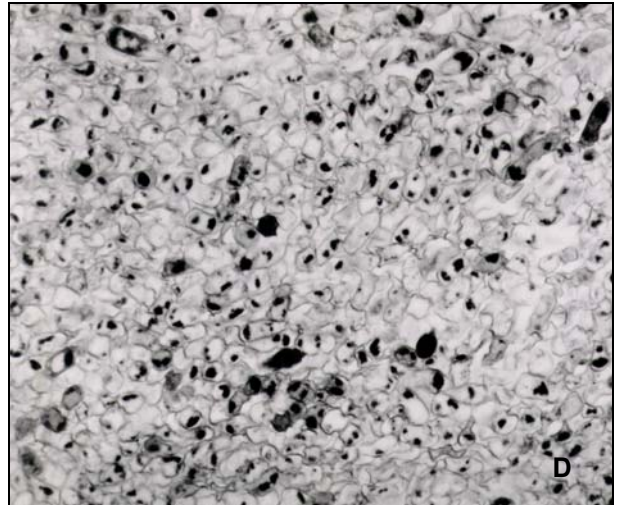
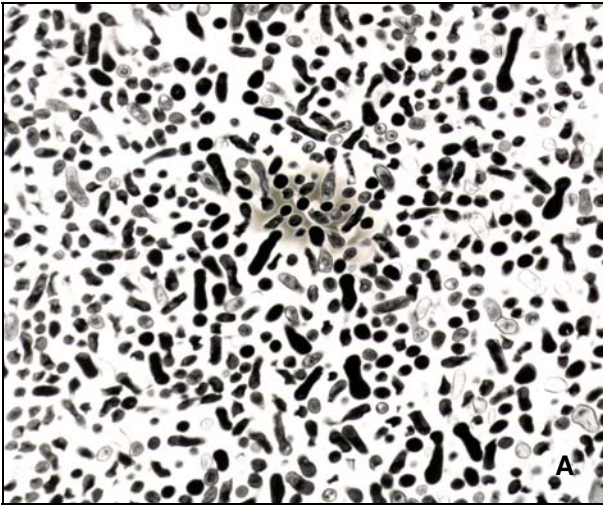
As colônias II exibiam características intermediárias às iniciais e às obtidas da passagem no camundongo imunocompetente. Eram semelhantes às colônias de *B. henselae* ATCC 49793 que, segundo a descrição de **BATTERMAN et al. (1995)** apresentavam pili menores, sendo a maioria não pilosa.

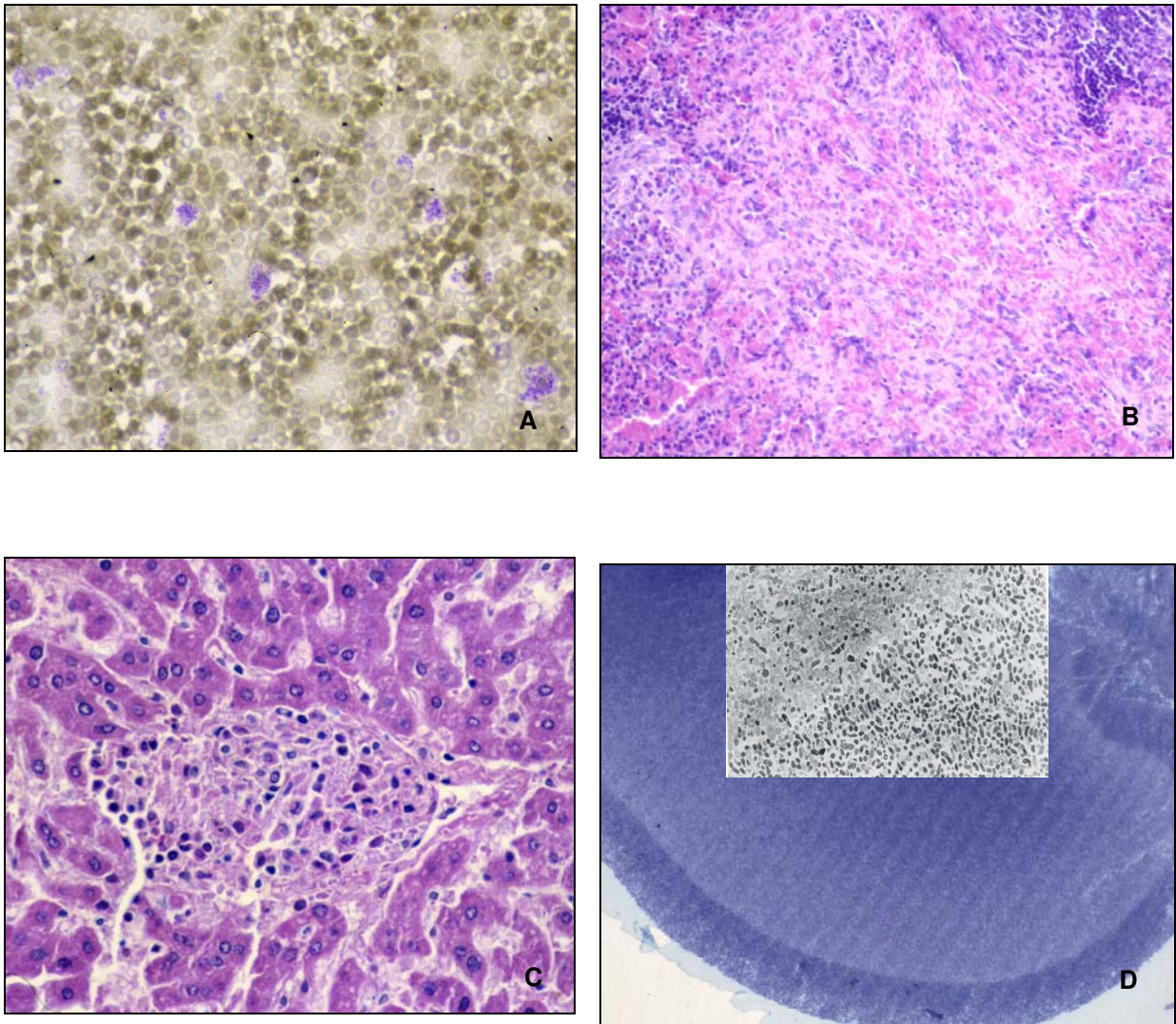
As colônias III, considerando a descrição do mesmo estudo, eram, predominantemente, semelhantes às *B. quintana* VR-358 que não expressavam pili (Fig. 4, Fig. 5).

Contudo, estas colônias, com 45 dias, apresentavam bactérias com numerosas fímbrias como as observadas nas colônias I, em pequenas áreas escuras. Nestas áreas, eram encontrados os bacilos mais encurvados.

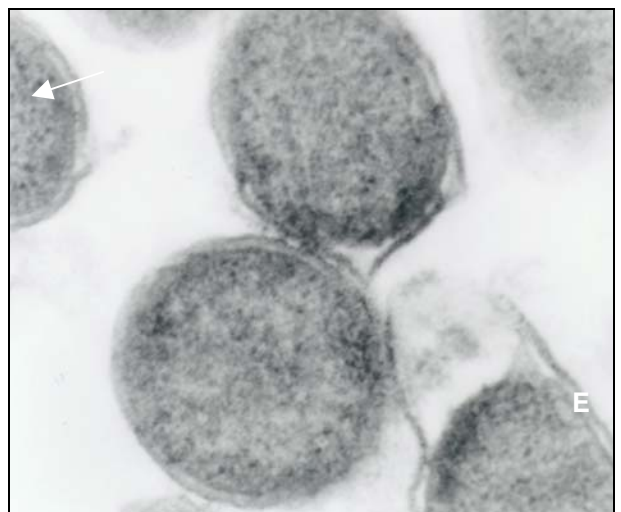
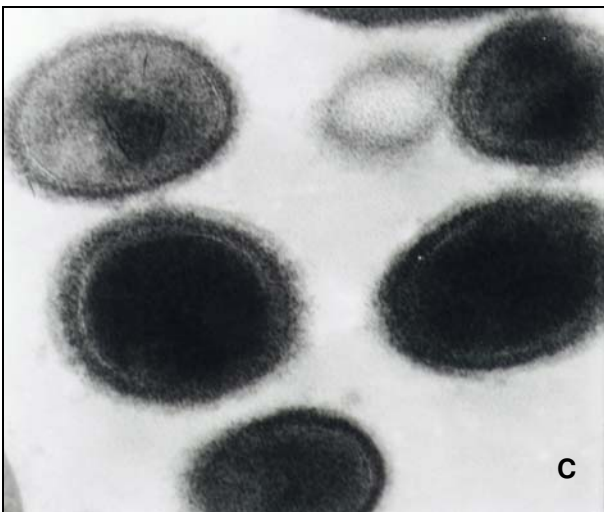
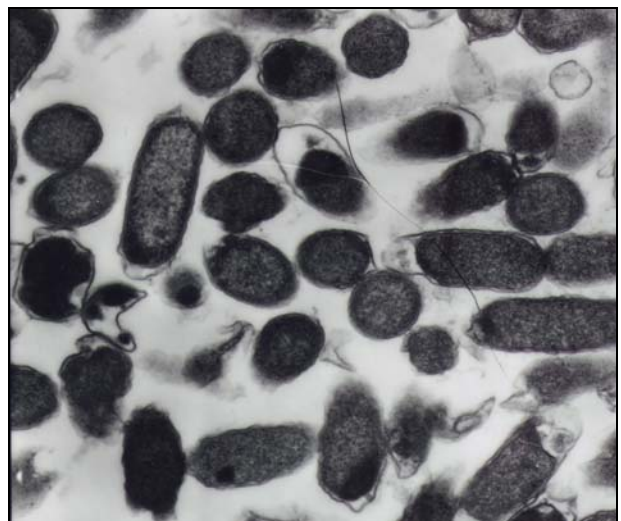
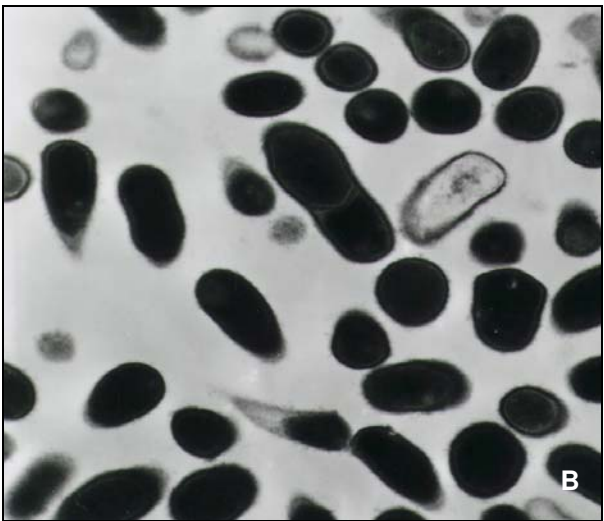
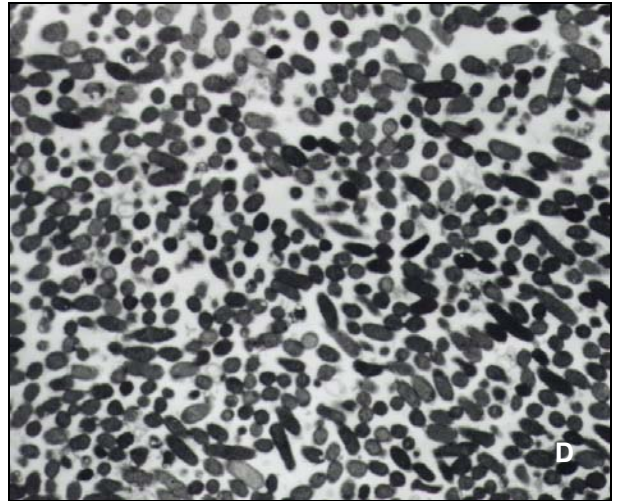
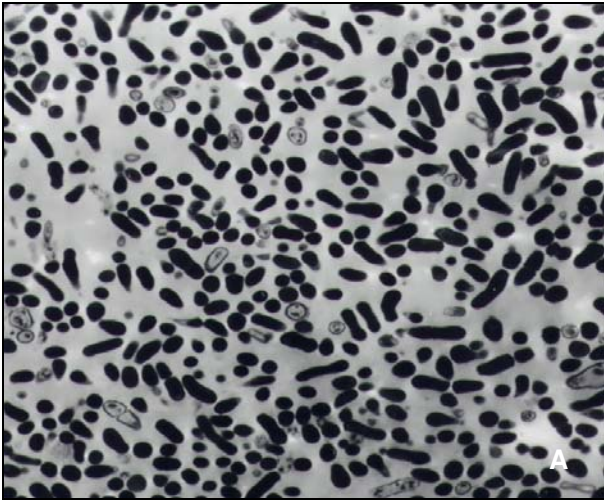
Nas colônias III, desde o dia 15, foram observados pontos negros no interior de algumas bartonelas, porém, predominavam bactérias de elétron-densidade intermediária e com conteúdo citoplasmático mais homogêneo (Fig. 4). Com 25 dias, as bactérias destas colônias eram claras e com pontos negros dispostos na periferia celular. Imagens mitóticas foram observadas, em maior número, com 35 dias, quando se atingia grande densidade bacteriana (Fig. 5).

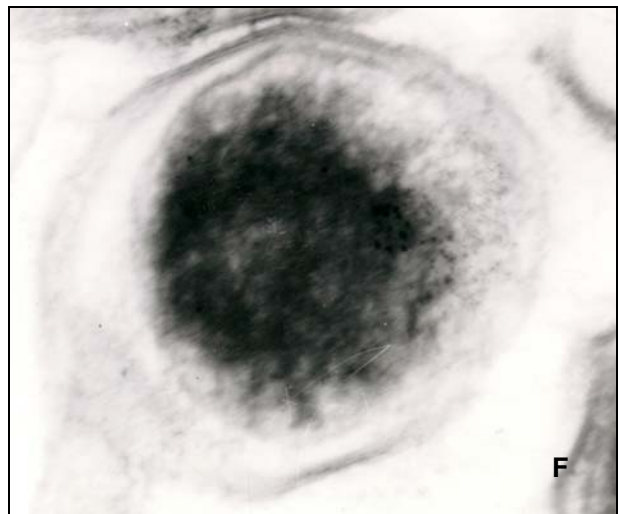
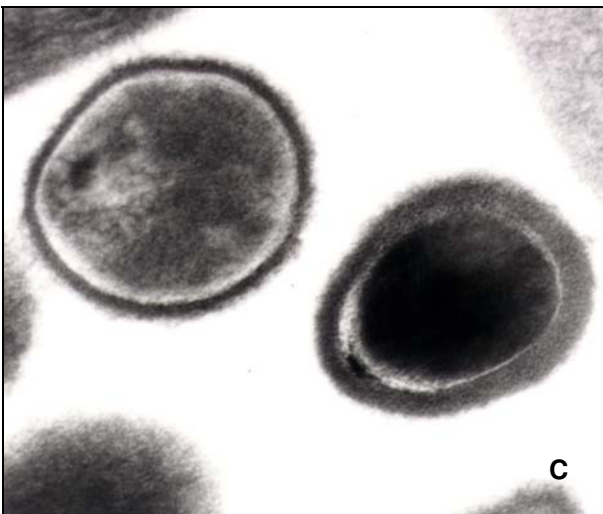
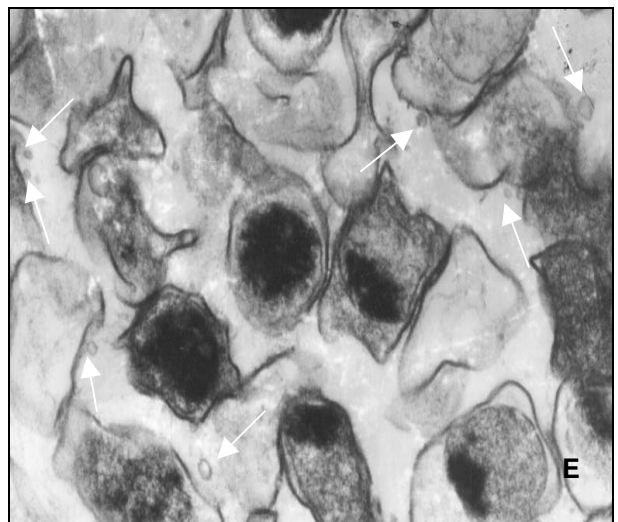
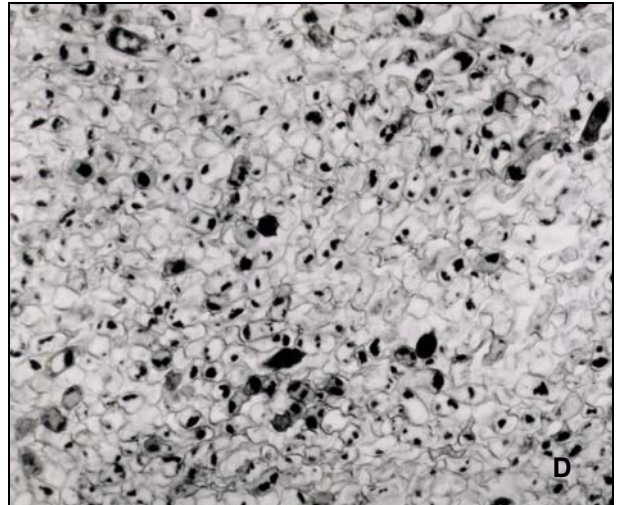
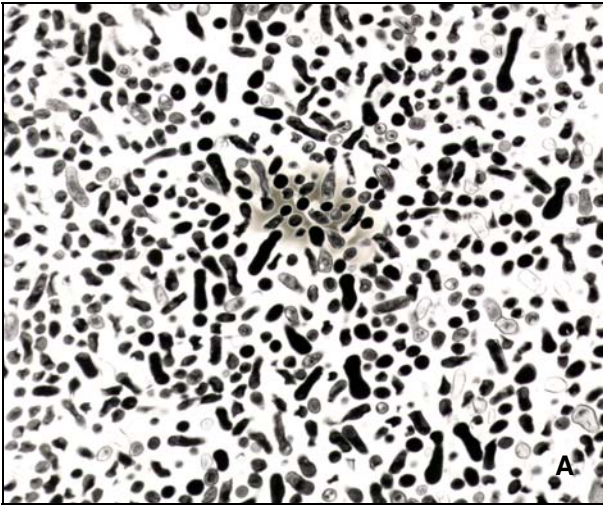
Os *blebs*, como são chamadas estruturas semelhantes a vesículas, que se dispõem ao redor das bactérias, já descritas em colônias de *B. henselae* e *B. quintana* crescidas em ágar, não eram observáveis nas colônias iniciais, mesmo nas mais velhas, mas já podiam ser notados nas colônias II e III, com 15 dias. Eles se tornaram abundantes nas colônias mais velhas (Fig. 4, Fig. 5). Maior irregularidade do contorno bacteriano pôde ser observada nas colônias III, especialmente as com 25 e 35 dias, e com parede celular de menor espessura. Estas bartonelas apresentaram-se como estruturas poligonais ou estelares (Fig. 4, Fig. 5).





**Figura 3:** A. Amostra sanguínea de um camundongo imunodeficiente infectado há um dia, via ID, com *B. henselae*. As bactérias acham-se agregadas. (Giemsa, aumento original x 40). B. Tecido esplênico de camundongo imunodeficiente infectado há seis dias, via ID, com *B. henselae* – aspecto angiomatoso. (HE, aumento original x 20). C. Tecido hepático do camundongo imunocompetente inoculado via IV, que morreu espontaneamente - tendência à formação de granulomas. (HE, aumento original x 40). D. Colônia de *B. henselae* que não passou pelos camundongos, 25 dias de crescimento em ágar enriquecido, secção transversal. À direita, nota-se faixa convexa mais escura na superfície livre e, à esquerda, região central mais clara. Os microorganismos estão densamente agregados na região central. (Azul de toluidina, aumento original x 20); *Inset*. Fotoelétron-micrografia da mesma colônia de *B. henselae* mostrando a transição das fases elétron-densa e elétron-lucente. (Aumento original x 2.500).







*DISCUSSÃO*



## 6.1. O PRESENTE ESTUDO

Adaptando o que traz MARCONI & LAKATOS (1996), a pesquisa ora desenvolvida pode ser classificada como *básica e bibliográfica* em seu primeiro objetivo.

Em relação aos demais, é uma pesquisa *básica e experimental*, tendo como método de análise a *construção de um modelo e descritiva* quanto ao nível de interpretação. Utilizou-se para tanto uma pequena amostra que, pela *tipicidade*, a torna representativa.

Para as autoras, o estudo seria classificado como *viável*, porque pode ser resolvido com pesquisa, *relevante*, porque é capaz de trazer novos conhecimentos, *novo*, porque está adequado ao estágio atual, *exequível*, porque pode chegar a uma conclusão, e *oportuno*, por atender a interesse geral.

## 6.2. OS RESULTADOS

### 6.2.1. Objetivo 1

A apresentação da revisão bibliográfica como um dos objetivos desta tese se justifica pela inexistência de um amplo estudo conjunto das bartoneloses humanas e uma correlação detalhada das infecções naturais e experimentais por estas bactérias. Para a apresentação dos demais objetivos, uma revisão bem mais sucinta seria mais adequada, porém limitaria as discussões ora apresentadas.

#### 6.2.1.1. As bartonelas

Este gênero tem sido considerado um dentre aqueles com bactérias de relevância recentemente reconhecida, tanto que, em 1999, na Alemanha, houve uma conferência cujo tema foi “*Bartonella* como patógeno emergente”. Nos últimos anos, tem aumentado dramaticamente o número de espécies de *Bartonella* identificadas e o espectro clínico associado à infecção por espécies deste gênero (DEHIO & SANDER, 1999).

O gênero criado para conter o agente da DC, descrito por Barton, em 1909, manteve-se com uma única espécie até que **BRENNER et al., em 1993**, propuseram a unificação do gênero *Rochalimaea* e *Bartonella*. Desde então, a *B. henselae* ocupa papel importante nos estudos sobre estes microorganismos. As relações filogenéticas com as *Brucella* spp. e evidências sorológicas, tanto em humanos como em gatos, da infecção por esta bactéria faz supor que sua infecção seja mais freqüente do que sabemos (**DALY et al., 1993; RATH, VON RECKLINGHAUSEN, ANSORG, 1997; SLHESSARENKO, 1998**). **BROUQUI et al. (1999)** mencionaram que a infecção pela *Bartonella quintana* também deva ser muito mais prevalente do que normalmente é reconhecida (**BROUQUI et al., 1999**).

Hoje são reconhecidas 18 espécies de bartonelas, sendo oito delas consideradas patogênicas ao homem, conforme apresentada na Tabela 1 (página 90).

Contudo, possivelmente outras espécies dessas bactérias venham a ser descritas. Isto é sugerido pelo encontro de cepas ainda não-identificadas entre ratos (**KOSOY et al., 1999**). Também é sugerido pela referência à observação de uma bartonela uniflagelada quando da descrição do primeiro caso de AB em imunocompetentes (**COCKERELL & LEBOIT, 1990**). Das espécies até hoje descritas neste gênero, nenhuma tem esta expressão fenotípica.

Embora **ELLIS et al. (1999)** tenham aventado a possibilidade da infecção pelas bartonelas ter sido trazida do Velho Mundo às Américas após o descobrimento, há evidências da era pré-colombiana da ocorrência das duas fases da DC na região onde é endêmica (**ALEXANDER, 1995 ; GARCIA-CACERES & GARCIA, 1991**).

A habilidade de uma bactéria causar proliferação de células endoteliais, resultando na formação de novos vasos, é única no gênero *Bartonella* (**MINNICK, 1994; ANDERSON & NEUMAN, 1997**). Esta capacidade foi demonstrada *in vitro* e *in vivo* por **GARCIA et al. (1990)** e **GARCIA et al. (1992)**. Igualmente, isto pôde ser observado nos resultados do trabalho aqui apresentado.

**ANDERSON & NEUMAN (1997)**, mencionando múltiplos casos de encefalite no sul da Flórida, questionaram a existência de cepas de *B. henselae* de diferentes virulências. **BERGMANS et al. (1997b)** associaram diferenças de infectividade a cepas de *B. henselae*. Os

resultados do presente estudo, comparados com os apresentados por **REGNATH et al. (1998)** e **VELHO et al. (1998)**, mostram que diferenças numa mesma cepa podem determinar manifestações clínicas também diferentes. As alterações morfológicas resultantes da passagem *in vivo* da *B. henselae* devem estar relacionadas à mudança da virulência observada nessas bactérias. Isto reforça a idéia de que a expressão clínica das doenças não depende isoladamente de características bacterianas ou do hospedeiro, mas da interação entre elas.

As observações de alterações histológicas granulomatosas e de angioproliferação concomitantes ou progressivas encontradas em relatos da infecção pelas bartonelas sugerem haver dinâmica alteração nesta relação parasita hospedeiro.

#### **6.2.1.2. As bartoneloses**

O termo verruga foi mantido para referir-se à fase tecidual da DC, embora, em português, a palavra tenha o significado de pápula ceratótica, o que não se aplica à descrição das lesões angiomasosas próprias desta fase.

**REGNERY & TAPPERO (1995)** mencionaram que o termo bartonelose deveria ser usado apenas para referir-se à DC, já que classicamente era assim entendido. Autores como **BASS; VINCENT; PERSON (1997a)** optaram por fazê-lo, porém, desde que a classificação proposta por **BRENNER et al. (1993)** foi amplamente aceita e a *B. bacilliformis* deixou de ser a única espécie do seu gênero, a literatura médica tem usado este termo referindo-se às diferentes expressões da infecção humana por bartonelas.

A DC, a FT, a DAG e a AB são os quadros clínicos mais característicos da infecção por espécies deste gênero. Contudo, o espectro clínico da infecção por essas bactérias vem ampliando rapidamente e tornando-se maldefinido. Contribuem para isto, entre outros fatores, um avanço nas técnicas diagnósticas. Porém, a falta de padronização dessas técnicas e a inexistência de uma com sensibilidade e especificidade adequadas têm gerado inconstância nos resultados diagnósticos. Soma-se a isto o desconhecimento sobre a patogênese da infecção por esses microorganismos.

As alterações na relação parasita hospedeiro são dinâmicas, como já foi mencionado e isto é sugerido, por exemplo, no relato de caso de infecção do SNC em que a biópsia inicial mostrava-se sem vasoproliferação e uma segunda com proeminência da microvasculatura e com atipias de células endoteliais. Quatro meses depois, o aparecimento de lesão cutânea de AB permitiu o diagnóstico e o tratamento com melhora do quadro neurológico. Além deste, há relato de concomitância de manifestações histológicas de fígado e baço com peliose, angioproliferação e inflamação piogranulomatosa. Outro paciente, soropositivo para o HIV e diabético, apresentou evolução de quadro clínico e histológico, sugestivo de DAG para lesões angioproliferativas associadas às iniciais, após uso de corticoesteróides sistemicamente. Um terceiro paciente apresentou tecido de granulação cutâneo associado a granulomas malformados, em área de arranhadura por gato (SPACH, 1992; SCHLOSSBERG et al., 1989; HALL et al., 1988).

Da mesma forma, divergências na classificação podem ser observadas na literatura como a manutenção do uso do termo de DAG atípica e a controvérsia na caracterização da peliose bacilar como outra entidade clínica, diferindo substancialmente das outras manifestações de angiomatose bacilar parenquimatosa (KEMPER et al., 1990; MOHLE-BOETANI et al., 1996; MAURIN & RAOULT, 1996; SCHWARTZMAN, 1996).

BASS et al. (1997) consideraram AB como manifestação atípica da DAG. Vários outros autores consideram-na como entidade clínica distinta, como mencionaram TAPPERO & KOEHLER (1991).

Manifestações oculares e/ou neurológicas, não associadas à linfonodomegalia ou processo granulomatoso, poderiam não ser incluídos como manifestação atípica da DAG.

Essas dificuldades encontradas na literatura em apresentar uma classificação das doenças também são causadas pelo fato de diferentes espécies de *Bartonella* poderem determinar o mesmo quadro clínico e uma mesma espécie ser responsável por diferentes manifestações clínicas.

ALEXANDER (1995) mencionou as diferenças clínicas entre a bartonelose que ocorre no Equador e a clássica DC. Este autor acreditava que isto era determinado por diferenças entre espécies, entre a virulência das cepas ou mesmo causada por uma adaptação imunitária do hospedeiro.

A febre quintana clássica é causada pela *B. quintana*. Porém, o quadro clínico descrito como febre das trincheiras dos dias atuais é associado à mesma espécie e caracteriza-se por uma bacteremia cíclica que também pode ser causada pela *B. henselae*, tanto em homens como nos felinos.

Sabe-se que a DAG é, na maioria dos casos, causada pela *B. henselae*, porém também pode ser causada pela *B. clarridgeiae* e *A. felis*. A *B. quintana* foi associada a padrão granulomatoso em linfonodos, embora o único caso típico de DAG relatado seja de AZEVEDO et al. (2000).

A AB tem como agentes a *B. quintana* e a *B. henselae*, que aparentemente, é a única a apresentar a manifestação de peliose bacilar. O primeiro caso de AB em imunocompetentes foi descrito por COCKERELL & LEBOIT (1990), que demonstraram ser causada por uma bactéria semelhante às espécies de *Bartonella*, porém uniflagelada. Esta expressão fenotípica não foi descrita para as espécies conhecidas.

Tem sido proposto que as variações de patogenicidade entre as variantes de *B. henselae* possam resultar em diferentes apresentações clínicas da doença, acompanhadas de resposta imunológica igualmente diversificada (BERGMANS et al., 1997a). Contudo, além das características genotípicas das diferentes cepas, o estudo ora apresentado permite supor que a interação do agente com o organismo do hospedeiro seria fator determinante na expressão fenotípica do mesmo e, por si só, determinar variações antigênicas.

Interessante também é a relação filogenética das bartonelas com bactérias dos gêneros *Brucella* e *Agrobacterium*. As primeiras determinam infecção humana polimórfica em sua expressão clínica predominando quadros febris crônicos, muitas vezes recorrentes; elas crescem lentamente em meios enriquecidos e a *Brucella abortus*, que é a mais relacionada às bartonelas, exige ambiente saturado de gás carbônico. *Agrobacterium* spp. são bactérias que podem determinar angioproliferação em plantas, o que é exclusivo do gênero *Bartonella* na infecção humana, como já mencionado.

A participação de uma lutzomia como vetor da DC é bem definida. Na FT, tanto o piolho do corpo como o piolho da cabeça, já foram associados à transmissão da infecção. O primeiro também foi relatado em casos de febre das trincheiras dos dias atuais e

na AB. Há também a associação de carrapatos a FT, DAG e bacteremia. As pulgas são sabidamente vetores na transmissão da *B. henselae* entre os felinos. Seu papel na transmissão da infecção ao homem é desconhecido, porém foi associada à DAG e AB. Igualmente o *Sarcoptes scabiei* foi associado com bacteremia por bartonelas (LUCEY et al., 1992). Nos pacientes com AB acompanhados pela disciplina de Dermatologia do HC – Unicamp, mais da metade apresentava infestação por este ácaro.

Porém, o papel do vetor na infecção pelas bartonelas ainda precisa ser mais bem estudado. Na febre maculosa brasileira a ativação do agente possivelmente se dê no vetor, e a infecção não aconteça sem este processo (LEMOS, 1996).

Sabe-se que carrapatos são tanto reservatórios como vetores da *Rickettsia rickettsii* e apenas certas espécies de pequenos mamíferos desenvolvem suficiente riquetsemia durante a infecção aguda para permitir a infecção de outros carrapatos. Mamíferos maiores, como cães e homens, desenvolvem doença clínica, porém, a baixa quantidade do agente no sangue destes inviabiliza a transmissão a novos carrapatos, impossibilitando-os de se tornarem reservatórios. A “teoria da reativação” sugere que as riquetsias se tornem avirulentas durante os meses de inverno. Este processo, pouco entendido, exigiria que os carrapatos sugassem um animal para a produção de organismos infectantes nas glândulas salivares. Carrapatos não infectam um novo hospedeiro até que tenham sugado o primeiro por pelo menos cinco a 20 horas. Assim, a doença humana é adquirida após contato prolongado com os carrapatos, a menos que estes tenham estado sugando um outro hospedeiro, estando aptos a induzir a infecção. O certo é que os carrapatos são fundamentais para a transmissão da doença em condições naturais. A relação dos cães com a infecção humana parece residir na exposição comum dos animais e seus proprietários ao carrapato infectante. Além disso, sugar os cães pode reativar a infecção nos carrapatos e assim pode haver infecção direta ou indireta, pelos fluidos corpóreos dos carrapatos que podem ser imediatamente infectante quando em contato com as pessoas, por meio da hemolinfa do carrapato durante a remoção da mesma ou de suas fezes em contato com a conjuntiva ou com uma pele lesada. Os cães servem de organismos sentinelas para a infecção humana (GREENE, 1987).

O mesmo modelo talvez possa ser aplicado à infecção pelas bartonelas, sobretudo a *B. henselae* e o gato doméstico. Pode ser, porém, que na transmissão da DAG uma ativação não seja necessária. Também na FT foi demonstrado por Rocha Lima a presença da *B. quintana* apenas no lúmen intestinal do vetor, em suas fezes e saliva, podendo atuar apenas como fonte de bactéria e estímulo ao trauma cutâneo.

Na FT a *B. quintana* pôde ser isolada de saliva e urina de doentes. A importância disso na transmissão da doença é desconhecida. Também não se conhecem reservatórios animais para esta bactéria nem para a *B. bacilliformis*. O papel do homem como reservatório da DAG ou da AB é desconhecido.

Porém, o gato doméstico foi, desde a descrição da DAG, reconhecido como reservatório desta doença. Esta relação foi tão valorizada que este passou a ser considerado um dos critérios diagnósticos. Embora raros, há relatos do isolamento de *B. henselae* de cães (MARGILETH, 1993; TSUKAHARA et al., 1998).

Na Alemanha, possuir ou não gatos domésticos não aumenta o risco de infecção pela *B. henselae* já que não há diferença estatística na sorologia entre os dois grupos (RATH, VON RECKLINGHAUSEN, ANSORG, 1997).

Pouco se conhece sobre os reservatórios das bactérias deste gênero. Talvez, como o homem na infecção pela *B. quintana* e *B. bacilliformis*, os outros reservatórios possam eventualmente apresentar manifestações da infecção, como fica evidente quando se observa o resultado de alguns estudos com gatos. Manifestações clínicas destes animais após infecção experimental foram pápula de inoculação, febre e letargia transitórias, anorexia, linfonomegalia, alteração de comportamento, alterações neurológicas, linfonomegalia, anemia e eosinofilia. Estes achados igualmente foram descritos na infecção humana. KORDICK et al. (1999), mencionou que várias doenças chamadas de idiopáticas em gatos possam ser a expressão da infecção por bartonelas. Também há a descrição nos homens de quadros inespecíficos como eritema nodoso, exantema máculo-papular, eritema anular e multiforme, púrpura trombocitopênica e, também, anemia e eosinofilia. Pouco se sabe sobre a patogenia da infecção pelas bartonelas. FUMAROLA, GIULIANI, PECE (1996) mencionaram o mesmo sobre os fatores responsáveis pelos danos produzidos pela *B. henselae* nos múltiplos órgãos envolvidos.

**KOEHLER (1995)** referiu que a maioria dos casos de AB cutânea e outras formas de infecção por *Bartonella* sp. aparentemente localizadas, são, de fato, doenças disseminadas e freqüentemente crônicas.

Considerando a cronicidade da infecção pode-se levantar a hipótese que, em indivíduos imunocompetentes, a angiomatose bacilar represente uma forma de reexposição a uma bactéria deste gênero. Outra possibilidade seria a evolução da não-eliminação completa do agente ainda durante uma imunodeficiência por ele produzida.

Isto é observado na verruga peruana, que reflete uma imunidade parcial à *B. bacilliformis* (**NOSAL, 1997**).

A maior incidência da DAG na infância e da AB na vida adulta e sobretudo de pacientes com imunodeficiência reforça esta hipótese.

O modelo da infecção pelo vírus da varicela zoster exemplifica o que poderia acontecer com a infecção por essas bartonelas. Nesta infecção, quando não há imunidade ao vírus, uma exposição poderá determinar um quadro de varicela. Oportunamente, havendo uma queda da imunidade específica para o vírus, pode ocorrer manifestação clínica da infecção até então latente. O herpes zoster também pode acontecer após reexposição de pacientes com imunidade parcial ao vírus.

Deve existir também um fator genético envolvido na defesa do hospedeiro, na resistência parcial, total ou na susceptibilidade, como demonstrado em camundongos para infecções por vírus, bactérias e protozoários, como comentam **ANDERSON & OSTERMAN (1980)**. Isto também é observado na clínica de doenças humanas como hanseníase e paracoccidiodomicose.

**PIÉMONT & HELLER (1999)** mencionam que a *B. quintana* é responsável pela febre das trincheiras em pacientes imunocompetentes e a *B. henselae* por uma resposta granulomatosa e supurativa que se resolve espontaneamente nesses pacientes. Em imunodeficientes, a resposta a ambas pode ser vasoproliferativa, com as bactérias sendo encontradas tanto extra como intracelularmente. Nesses pacientes, a infecção pode ser progressiva e letal na ausência de antibióticos.



Nos pacientes infectados pelo HIV, a infecção pela *B. henselae* é de desenvolvimento insidioso e sintomas como mal-estar, fadiga, perda de peso e febre recorrente progressivamente mais elevada duram de semanas a meses antes do diagnóstico. Neles, os leucócitos mostram diminuída fagocitose e geração de radicais de oxigênio, o que permite supor que haja persistência intracelular do agente, levando a maior susceptibilidade de infecção crônica e disseminada nestes pacientes.

O oposto acontece nos pacientes soronegativos para tal vírus, que têm instalação abrupta dos episódios febris, segundo **WELCH et al. (1992)**.

Porém, além de fatores bacterianos e do hospedeiro, existe um envolvimento imunitário causado pela relação das bartonelas com o hospedeiro. Existem evidências de que a FO seja mais grave em indivíduos não-nativos da região e, portanto, não-ímmunes. A imunodeficiência celular adquirida durante a febre de Oroya, com negatificação de testes tuberculínicos e alteração da relação CD4/CD8, referida por **BASS; VINCENT; PERSON (1997a)** reforçam esta idéia. Também colaboram com este raciocínio os resultados deste estudo, que serão discutidos adiante.

Para **MILLER et al. (1991)**, as altas concentrações de gás carbônico na pele poderiam justificar a preferência de larvas de *Strongyloides stercoralis* por este órgão. Aparentemente as bartonelas também têm esta predileção, talvez pelo mesmo motivo.

A infecção assintomática por bartonelas é bastante freqüente. Até 60% dos habitantes da região endêmica da DC eram soropositivos para *B. bacilliformis*. Em circunstâncias epidêmicas, 40% das pessoas aparentemente saudáveis tinham piolhos infectados com *B. quintana*. Além disso, a soropositividade à *B. henselae* na população normal suíça chega a 48% e 19% na Alemanha. Dois a seis por cento da população norte-americana tem positividade de anticorpos anti-*B. henselae*. Dentre os usuários de drogas de Baltimore, 33% são sororreagentes para a *B. elizabethae* (**GARCIA-CACERES & GARCIA, 1991; BASS, VINCENT, PERSON, 1997 a; RATH, VON RECKLINGHAUSEN, ANSORG, 1997, BERGMANS et al., 1997b; COMER et al., 1996**).

A infecção pela *B. quintana* em humanos pode ser crônica como a infecção pela *B. henselae* em gatos (**BROUQUI et al., 1999**). Isto pode ser documentado por bacteremia assintomática por 15 meses após a febre de Oroya e o isolamento de *B. quintana* de hemocultura de paciente com história de infecção acidental pela bactéria há oito anos.

O comprometimento do sistema retículo endotelial é evidenciável pela hepatoespleno e linfonodomegalias observadas na febre de Oroya, pela esplenomegalia que ocorre na FT, a linfonodomegalia da DAG típica e comprometimento parenquimatoso da angiomatose bacilar no fígado, no baço e nos linfonodos.

Do estudo conjunto das manifestações clínicas das bartoneloses observa-se que várias síndromes deveriam ser rotineiramente investigadas para a infecção por essas bactérias. Quadros psiquiátricos, neurológicos (sobretudo convulsões em crianças), lesões oftalmológicas, cutâneas e hematológicas inespecíficas deveriam incluir a infecção por essas bactérias entre os possíveis agentes etiológicos.

Dentre as alterações hematológicas descritas encontram-se anemia, linfopenia e púrpura trombocitopênica. Também foram observados hemocromatose, esferocitose e linfoma em quimioterapia em pacientes com infecção por bartonelas.

Alterações ósseas, principalmente líticas, podem ser determinadas por bactérias desde gênero. Na DAG, por exemplo, pode haver osteólise por extensão direta do linfonodo acometido, mas, na maioria dos casos, ocorrem lesões líticas distantes do sítio de inoculação e, portanto, de disseminação hematogênica.

**MOHLE-BOETANI et al. (1996)** em seu estudo caso-controle mostraram que anemia e níveis elevados de fosfatase alcalina estão mais associados à infecção pelas *B. henselae* e *B. quintana*, como já foi mencionado. Para quem trabalha com estes pacientes é evidente a alta prevalência destes achados, considerados, muitas vezes, como secundário à própria infecção pelo HIV.

Contudo, existem dificuldades diagnósticas.

O exame direto é o principal método diagnóstico para a infecção pela *B. bacilliformis* na febre de Oroya. Permite também avaliação prognóstica, com a mudança no formato das bactérias, inicialmente mais bacilares, e em grande número e tornando-se cocóides antes de desaparecerem nos esfregaços (**BASS; VICENT; PERSON, 1997a**). Contudo, este clearance sanguíneo das bactérias não define cura, já que a infecção poder-se-á manifestar oportunamente na sua fase tecidual, a verruga peruana.

Este exame foi usado também para demonstrar infecção natural e experimental, em animais, por bartonelas dos gêneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon* (BAKER, CASSELL, LINDSEY, 1971).

Não há referência ao uso do exame direto do sangue em outros quadros febris dentre os vários causados pelas *Bartonella* sp. nem para diagnóstico nem para seguimento dos casos.

A sorologia tem sido o método diagnóstico mais utilizado, porém, ainda permanecem dificuldades de interpretação em seus resultados. Os estudos experimentais em gatos, realizados por GREENE et al. (1996) e REGNERY et al. (1996) são discordantes dos resultados de RATH, VON RECKLINGHAUSEN, ANSORG (1997) quanto à existência de reações cruzadas em testes sorológicos anti-*B. henselae* e *B. quintana*. Diferenças genotípicas e fenotípicas com variação antigênica podem justificar resultados sorológicos discrepantes. Para SCOLA & RAOULT (1999), a resposta sorológica negativa de muitos casos de angiomatose bacilar poderia se dar pelo estado imunológico dos pacientes com Aids, porém, estes mesmos pacientes são capazes de produzir anticorpos contra outros agentes ainda que sua imunidade esteja bastante diminuída. Já YOUSIF et al. (1996) encontraram maior soroprevalência para *B. henselae* entre os pacientes soropositivos para o HIV que na população controle.

O teste de imunofluorescência indireta é o mais utilizado teste de laboratório para o diagnóstico de DAG, porém, sua sensibilidade em diagnosticar infecção aguda é questionável. Isto porque o teste é dependente da cepa bacteriana utilizada e do método pelo qual os antígenos são preparados. CHOMEL et al. (1995) referiram a ausência de anticorpos IgG detectáveis em gatos expostos à *B. henselae*, sugerindo haver um grupo de gatos com tolerância parcial induzida, o que poderia ser explicado pela solubilidade ou tamanho do antígeno, dose do inóculo e a via de administração.

Estudos têm demonstrado a baixa sensibilidade da cultura primária e da detecção gênica por técnica da PCR (DEHIO & SANDER, 1999; ZANUTTO, 2000).

A cultura foge da rotina diagnóstica da maioria dos laboratórios clínicos. DOUGHERTY et al. (1996) e LA SCOLA & RAOULT (1999) referem que o subcultivo altera sensivelmente a morfologia das colônias. Aparentemente um fator que aumenta a

sensibilidade da cultura é o congelamento prévio (BRENNER et al., 1997; RAOULT, 1999). Isto poderia se justificar pela lise das células sanguíneas com liberação de microorganismos intracelulares, substituindo, assim, os tubos de lise que encarecem o procedimento. Não existem, contudo, estudos comparativos, e o que se tem utilizado é a congelação a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Em tese, este período de tempo seria desnecessário, já que a referida lise poder-se-ia obter em menor intervalo de tempo. Outro fator que deverá ser mais bem estudado é a preferência das bactérias deste gênero quanto à disponibilidade de oxigênio e de gás carbônico na atmosfera de incubação. As bartonelas são consideradas aerófilas ou microaerófilas (BIRTLES et al., 1995; SLHESSARENKO, 1998). Porém, no cultivo destas bactérias no laboratório de microbiologia do HC–Unicamp, aparentemente o crescimento foi facilitado com a incubação inicial em ambiente com concentrações muito reduzidas de oxigênio gerado com o uso de Anaerobac da Probac do Brasil. Este procedimento passou a ser feito rotineiramente no laboratório por prévia comparação de crescimento nas placas mantidas nestas jarras e naquelas mantidas em recipientes com consumo de gás carbônico pelo uso de velas, como é comumente mencionado na literatura. Esta conduta diminuiu também a contaminação por outras bactérias e, especialmente, por fungos. Após o crescimento inicial, a exposição a um ambiente aeróbico permitiu um crescimento ainda mais rápido. Isto sugere que a bactéria seja aeróbica facultativa porém com predileção por anaerobiose nos primeiros dias de crescimento em meios de cultura. Estudos posteriores deverão documentar estas impressões.

A sensibilidade do teste cutâneo parece ser baixa (SLHESSARENKO, 1998). Especialmente em adultos que gostem de gatos desde a infância, sua positividade deveria ser questionada quanto ao indício de doença ativa, já que, como sugere CARITHERS (1985), esta positividade parece durar por toda a vida.

Técnicas de detecção gênica por PCR têm sido usadas e, na DAG, sua sensibilidade é maior no material aspirado do gânglio acometido (SLHESSARENKO, 1998). Porém, suas limitações vão além da impossibilidade de uso rotineiro destas técnicas na maioria dos hospitais ou das dificuldades próprias da sua realização. Como foi apresentado, estudos científicos discordam sobre a sensibilidade do método.

Tanto na DAG como na AB a presença de infiltrado neutrofílico entre os granulomas ou angioproliferação sem ulceração sugerirão o diagnóstico de infecção por bartonelas, com a possibilidade de demonstração do agente, sobretudo nas lesões mais iniciais.

A posição intra ou extracelular do agente da DAG permanece uma contradição (WEAR et al., 1985; GUCCION et al., 1996).

O tratamento das bartoneloses ainda é pouco definido. Sabe-se que na DC a fase febril responde rapidamente à tetraciclina e ao cloranfenicol. Um sinal de boa evolução é o aparecimento de formas cocóides das bactérias nos esfregaços sangüíneos, o que auxilia no monitoramento da resposta antibiótica. Porém, na fase tecidual, a resposta à antibioterapia é questionável (BASS, VINCENT, PERSON, 1997a).

Na FT há resposta ao tratamento com os mesmos antibióticos com involução do quadro em um a dois dias. Contudo, há descrição de recrudescência, não se sabendo a efetiva ação dessas medicações sobre as bactérias. A infecção também não oferece proteção imune, já que a reinfecção experimental foi possível em voluntários humanos.

A resposta ao tratamento também é diferente na DAG e na AB. Na primeira há evidente melhora com o uso de antibióticos e, na segunda, isto é questionável. O único trabalho duplo-cego e randomizado sobre antibioterapia nas bartoneloses é de (BASS et al., 1998) e demonstra uma redução no tempo de doença com o uso de azitromicina para a DAG. Talvez esta diferente resposta ao tratamento da AB e a DAG deva-se à manutenção dos granulomas por mecanismos imunológicos e não à permanência do agente.

A prevenção da infecção humana pela *B. henselae* supostamente poderia ser obtida pela vacinação de gatos domésticos. Contudo, vacinação de gatos com bactérias inativas conferiram proteção apenas contra a infecção por cepas homólogas às inoculadas (DEHIO & SANDER 1999). Considerando não haver proteção cruzada entre cepas de *B. henselae* e entre espécies de *Bartonella*, YAMAMOTO et al. (1998) sugeriram que o uso de um esquema vacinal para ser efetivo em conter a disseminação da infecção entre gatos de determinado lugar, estaria na dependência do uso de vacinas com cepas e espécies que ocorrem nos animais daquela região.

O valor do uso de vacinas em felinos para diminuir o reservatório para doença humana ainda está na dependência do melhor entendimento sobre as diferenças entre as cepas e a imunogenicidade das bartonelas. O controle das infestações cutâneas nestes animais e nos homens parece ser a única alternativa preventiva eficaz, disponível atualmente.

### 6.2.1.3. Os modelos experimentais

FENG, WEN, WALKER (1993) ressaltam a importância dos camundongos para modelos animais. Entre outros fatores, mencionam que isto se deve a disponibilidade de reagentes comerciais para testes imunológicos apropriados ao uso deles.

O uso de animais isogênicos permitiria a utilização de um menor número destes animais e maior possibilidade de reprodução dos resultados. Bartonelas de cepas padrão foram usadas com a mesma intenção de tornar os resultados mais facilmente reproduzíveis.

O uso de animais imunodeficientes geneticamente pelo gen *nu* na infecção experimental por bartonelas poderia mimetizar as alterações imunes que pacientes imunodeficientes apresentam, sobretudo, os soropositivos para o HIV. Sua marcada deficiência celular e o comprometimento da imunidade humoral é, dos modelos encontrados na literatura, o que mais se aproxima do que é observado na clínica.

Nos camundongos de padrão sanitário SPF infectados experimentalmente com *Haemobartonella* sp. ou *Eperythrozoon* sp., o comprometimento esplênico foi evidente ao redor do quinto dia, porém rapidamente tendeu a normalizar-se. Dez a 14 dias depois da inoculação, pouca ou nenhuma evidência da infecção se manteve. No fígado, foi observado um aumento precoce no número de células de Kupffer que já havia se normalizado na segunda semana da infecção.

Os resultados positivos obtidos com a inoculação de macacos com *B. bacilliformis* isolada de paciente, não puderam ser reproduzidos posteriormente, utilizando-se colônias da mesma bactéria (GARCIA-CACERES & GARCIA, 1991). Uma possível justificativa para esta discrepância seja a menor virulência das colônias utilizadas, após repiques em laboratórios.

Os trabalhos de **GARCIA et al. (1990)** e **GARCIA et al. (1992)** demonstraram que um extrato protéico obtido de colônias de *B. bacilliformis* era capaz de estimular a proliferação de células endoteliais. Estes achados corroboram com a hipótese de **MOE et al. (1976)** que, trabalhando com *R. rickettsii*, sugeriram que a vasculite resultante da infecção por estes microorganismos poderia não depender de uma ação direta da presença na célula do hospedeiro, mas de um efeito tóxico de produtos ou componentes antigênicos do agente.

Somente estudos com voluntários humanos puderam reproduzir o quadro clínico da FT (**MAURIN, 1996**).

Trabalhos que tentaram reproduzir a DAG em diferentes espécies de animais tiveram em comum que os melhores resultados foram obtidos pela inoculação via ID (**MOLARET, 1951; ENGLISH et al., 1988**).

Dos estudos experimentais com bartonelas, a maioria tem sido conduzida utilizando colônias de *B. henselae*.

As observações de **RODRIGUEZ-BARRADAS et al. (1995)** de que mesmo o soro não-imune tem efeito bactericida sobre a *B. henselae* pode justificar parcialmente os resultados de **SLATER (1992)** que mencionam tolerância de camundongos CD-1 à inoculação via IP de grande quantidade de *B. henselae* e *B. quintana* viáveis. Esta ação bactericida do soro poderia ser variável entre diferentes espécies e linhagens de animais e ter bases genéticas, como sugerem os estudos de **ANDERSON & OSTERMAN (1980)**. Estes autores demonstraram que camundongos de diferentes linhagens BALB/c poderiam ter susceptibilidade intermediária ou ser resistentes à inoculação pela *R. akari*.

Observando estes achados, pode-se compreender os resultados obtidos por **VELHO et al. (1998)** que encontraram tolerância à inoculação via ID de *B. henselae* em camundongos imunocompetentes e susceptibilidade intermediária nos camundongos imunodeficientes da mesma linhagem, inoculados pela mesma via e com igual quantidade de unidades formadoras de colônias. Estes últimos apresentaram sinais clínicos da infecção, porém as culturas de diferentes tecidos foram negativas.

Os mesmos camundongos imunocompetentes inoculados no presente estudo com quantidade semelhante da mesma cepa de bactérias também apresentaram manifestações clínicas da infecção experimental, quando as bactérias inoculadas foram recuperadas após passagem *in vivo*. Estes dados foram apresentados no capítulo dos resultados e serão discutidos adiante.

Portanto, fica evidente que, além dos fatores genéticos de tolerância à infecção existe uma outra variável: a virulência das bactérias, inclusive de uma mesma cepa.

O estudo de FUMAROLA et al. (1996) demonstrou reduzida capacidade da *B. henselae* em estimular macrófagos humanos. Esta observação é compatível com o que é observado na infecção humana, quando uma alta prevalência de soropositividade na população, sem manifestações clínicas na maioria das pessoas. Contudo, na DAG há uma resposta inflamatória muito exuberante, inclusive com formação de granulomas. Possivelmente, esta baixa atividade biológica não seja característica aplicável a todas as colônias desta bactéria.

As bartonelas mantêm relações filogenéticas com as riquetsias. Microorganismos dos dois gêneros têm tropismo por células endoteliais e podem ser veiculadas por carrapatos, pulgas, mosquitos e piolhos. Estudos com a inoculação destes organismos em camundongos serviram de orientação para definição das concentrações dos inóculos e período de observação clínica e histológica, entre outros fatores.

Desde 1996, trabalhos experimentais com gatos têm sido realizados.

Vários estudos têm usado a escala de McFarland (MCFARLAND, 1907) para a obtenção de suspensões de inoculação que permite uma equivalência exponencial adequada como demonstrada por GUPTILL et al. (1998). Contudo, os resultados obtidos em nosso estudo, diante da grande variação morfológica observada nas bartonelas, sugere que possa haver uma variação significativa entre suspensões de bactérias com parede celular mais ou menos espessa. Isto poderia interferir no uso da escala de McFarland e de técnicas fotométricas.



A comprovação do envolvimento da pulga como vetor na transmissão entre estes animais foi obtida com os trabalhos de **HIGGINS et al.** e **CHOMEL et al.**, ambos deste ano. A convivência de animais infectados mas livres de artrópodes não levou à transmissão.

Um aspecto intrigante da infecção felina por *B. henselae* é o fato de uma forte resposta imunológica, com produção de altos títulos de anticorpos, ser insuficiente para eliminar as bactérias do organismo. Porém, sugeriu-se que a imunoprofilaxia em gatos pudesse ser benéfica em reduzir riscos para saúde pública. Anticorpos IgG foram detectados com uma semana de infecção experimental de *B. henselae* e mantiveram-se por 6 meses. Reinoculadas não desenvolveram bacteremia (**REGNERY et al., 1996**). **ABBOTT et al. (1997)** também não observaram reinfeção quando da reinoculação de animais que haviam ficado abacterêmicos. Demonstraram também que os gatos faziam bacteremia cíclica, o que também se observa na infecção humana por bactérias deste gênero, por exemplo, na FT. Seu trabalho evidenciou também que a via ID era a mais efetiva em causar a bacteremia.

A resposta à antibioterapia nestes animais é inconstante como exemplificaram os trabalhos de **REGNERY et al. (1996)** e **GREENE et al. (1996)**.

**GUPTILL et al. (1997)** referem linfonodomegalia generalizada em todos os gatos infectados experimentalmente com bartonela isolada de gato de paciente com DAG e minimamente subcultivada. Além disso, febre transitória foi observada em alguns gatos, anorexia e letargia que durou poucas horas. Este quadro poderia ser considerado como idiopático em gatos e o mesmo, possivelmente, aconteça com a infecção humana. A menção de que as bartonelas possam ser seqüestradas em locais imunologicamente protegidos como o SNC igualmente se aplica à infecção humana. Esta idéia é reforçada pelas alterações neurológicas e/ou de comportamento descritas nestes animais quando infectados e também em pacientes, sobretudo soropositivos para o HIV. Quadros psiquiátricos e a demência ligada à Aids obtiveram melhora com tratamento quando se demonstrou o envolvimento das bartonelas (**GUPTILL, 1998**; **SCHWARTZMAN, 1995**; **LOUTIT, 1997**).

Fezes de pulgas que sugaram gatos infectados com *B. henselae* quando inoculadas via ID em gatos livres de infecção puderam torná-los bacterêmicos e soroconverterem. **FOIL et al. (1998)** sugeriram com isto que a penetração do agente por fezes contaminadas por meio de uma perda de continuidade da pele poderia ocorrer.

O estudo de **KORDICK et al. (1999)** demonstrou que o sangue contaminado pode causar infecção no receptor quando inocularam, via IV, sangue de gatos infectados com *B. henselae* e/ou *B. clarridgeiae* em gatos de padrão sanitário SPF. Observaram entre os gatos inoculados bacteremia cíclica e comprometimento neurológico. Eosinofilia foi a única alteração hematológica encontrada nestes animais. Ela também é frequentemente observada nos pacientes com infecção pelo HIV, muitas vezes considerada idiopática. O mesmo foi observado por **O'REILLY et al. (1999)** que inocularam também, via ID, em outros gatos, fezes de pulgas ou sangue de felinos contaminados. Todos ficaram bacterêmicos. Os gatos apresentaram febre, letargia, anorexia e eritema/edema no local da inoculação.

Foi demonstrado nos trabalhos de **ABBOTT et al. (1997)**; **GUPTILL et al. (1998)** e **YAMAMOTO et al. (1998)** não ocorrer transmissão da infecção pela *B. henselae* entre os gatos por via placentária, durante o parto ou mesmo na amamentação. Contudo, algumas gatas infectadas experimentalmente com esta bactéria tiveram dificuldade para engravidar ou manter a gestação. Observando a similaridade das manifestações entre felinos e humanos, como mencionado acima, supõe-se que a infecção por bartonelas possa causar esterilidade ou abortamentos de repetição também em mulheres.

A inoculação em *cotton rats* imunocompetentes por **KOSOY et al. (1999)** de diferentes cepas de bartonelas naturalmente isoladas destes roedores não determinou manifestações clínicas mesmo nos animais que fizeram bacteremia.

A importância de se estabelecerem modelos animais para a infecção por estas bactérias de comportamento pouco usual foi reconhecida por **DEHIO & SANDER (1999)**. Eles estão sujeitos a múltiplas variáveis, entre elas a virulência da bactéria.

Para **REGNATH et al. (1998)**, o elemento-chave para ser estabelecido um modelo da infecção, pela *B. henselae*, em camundongos, foram as passagens prévias da bactéria *in vivo*.

Considerando que este procedimento provocou mudanças nas bartonelas, foi proposta a avaliação morfológica das colônias de uma cepa padrão de *B. henselae*, (Houston, ATCC 49882<sup>T</sup>), após a passagem em camundongo BALB/cAn. Os resultados confirmaram a existência de alterações decorrentes deste estímulo.

YOUSIF et al. (1996) não notaram auto-aglutinação quando suspenderam colônias de *B. henselae* de cepa de referência. Eles utilizaram a suspensão de McFarland para obter determinada concentração destas bactérias a fim de preparar antígenos para imunofluorescência indireta. Os resultados que obtiveram foram os mesmos quando utilizaram antígenos por eles preparados a partir da cepa referida e antígenos fornecidos pelo CDC. Consideram como fatores para justificar maior soroprevalência entre os HIV que a população controle o fato de a infecção nos primeiros ser mais persistente, entendendo que os imunocompetentes tenham tido apenas DAG como doença causada pela *B. henselae*. Outra justificativa seria uma incidência maior de proprietários de gatos entre HIV positivos. Uma hipótese aqui aventada é que o organismo imunodeficiente estimularia expressões antigênicas das bartonelas que o imunocompetente não é capaz de produzir. Se esta hipótese é correta, talvez a prevalência da infecção por estes microorganismos na população HIV negativa seja maior do que sugerem alguns inquéritos sorológicos.

KORDICK et al. (1999) observaram que, após mais de um ano da inoculação experimental de *B. henselae* e/ou *B. clarridgeiae* em gatos, alguns apresentaram discretas alterações histológicas hepáticas, miocárdicas e nefréticas, apesar de terem sido mínimas as alterações clínicas durante o período de observação dos animais. Aventaram a possibilidade da infecção crônica por essas bactérias poder estar associada à instalação e progressão destas alterações. Estes achados corroboram com a hipótese que ENDER et al. (2001) não puderam confirmar em seu estudo piloto. Eles sugerem que espécies de *Bartonella* possam estar envolvidas na doença coronária, que é uma condição inflamatória associada a infecção crônica pela *Chlamydia pneumoniae* entre outras bactérias. Como já foram demonstradas reações cruzadas de anticorpos anti-*Chlamydia pneumoniae* e espécies de *Bartonella* estudos futuros serão necessários para descartar definitivamente a possibilidade do envolvimento da infecção crônica por bartonelas com esta doença (MAURIN, ETIENNE, RAOULT, 1997).

### 6.2.2. Objetivo 2

O desenho do estudo apresentado buscou permitir a reprodutibilidade dos resultados. Por isso foram usados animais isogênicos e bactérias de cepa padrão.

Os camundongos, mesmo os imunodeficientes, foram mantidos sem proteção reversa pela transitoriedade do tempo de observação, de apenas seis dias para cada grupo.

Houve a intenção de aumentar a virulência da cepa de bartonela recebida e que havia sido eliminada pelos camundongos do estudo de **VELHO et al. (1998)**. Baseados na observação da letargia que os camundongos imunodeficientes daquele estudo haviam apresentado, foram utilizados os BALB/cAn *nudes* para a primeira passagem das bactérias. O estudo ultra-estrutural das colônias das bactérias iniciais e recuperadas dos camundongos foi estabelecido como o primeiro passo.

**REGNATH et al. (1998)** não observaram sinais de morbidade nos camundongos BALB/c e C57BL/6 imunocompetentes inoculados com quantidade aproximada da mesma bactéria, mesmo após, pelo menos, quatro passagens *in vivo* em camundongos imunocompetentes. Os autores também não puderam recuperar as bartonelas de culturas sanguíneas ou teciduais, no sexto dia após a inoculação. No presente estudo, os 12 animais mostraram letargia transitória, 24 ou 48 horas depois de infectados. Um camundongo imunocompetente inoculado por via IV com a bartonela recuperada de um dos animais imunodeficientes, morreu no sexto dia da infecção experimental.

Talvez as células do hospedeiro imunodeficiente tenham induzido transformações na bartonela, que o imunocompetente não pôde promover, o que justificaria os diferentes resultados da observação clínica.

Esta hipótese é reforçada pelas observações de **BROUQUI & RAOULT (1996)** que referem existir uma interação específica entre determinantes bacterianos e receptores das células de mamíferos. Além disso, o crescimento destes agentes é facilitado pelo contato com células eucariontes, o que sugere que tais células poderiam prover nutrientes necessários ao crescimento do microorganismo. Portanto, modificações no estímulo do hospedeiro poderiam determinar diferentes respostas bacterianas.

Questionam-se aqui se os diferentes vetores envolvidos nas bartoneloses humanas, discutidos acima, teriam participação, como determinantes da expressão clínica da infecção pela bactéria que veiculam.

O exame direto do sangue, corado pelo método de Giemsa, mostrou-se útil e também eficaz na demonstração de bacteremia no modelo apresentado. O aspecto dos *clumps* bacterianos observados no exame direto no presente estudo se assemelham muito àquele descrito por **LARSON et al. (1994)** que realizou coloração de Gram de amostra de frascos de hemoculturas com positividade para *B. quintana*.

Na primeira fase, os animais imunodeficientes puderam fazer o clearance sanguíneo no terceiro dia pós inoculação, independentemente da via de inoculação. O desaparecimento das bactérias do sangue periférico, contudo, deve ter representado uma fase de maior invasão tecidual, já que no sexto dia novamente foram observadas nos animais inoculados via IV e ID.

Na segunda fase, em todas as avaliações, foi possível identificar a bacteremia. A presença, no sangue, de grumos maiores de bactérias na segunda fase, pode sugerir uma maior capacidade de adesão entre as bactérias.

Esta virulência aumentada também é sugerida pela avaliação clínica quando observou-se letargia em todos os animais imunocompetentes, o que difere dos resultados de **REGNATH et al. (1998)** e **VELHO et al. (1998)**. Também a morte espontânea de um deles, no sexto dia após a infecção experimental.

Ademais, houve recuperação das bactérias de hemoculturas e de todas as culturas teciduais. Apenas um dos camundongos imunodeficientes, utilizado na primeira fase do experimento, inoculado via IV, não apresentou crescimento bacteriano da amostra sanguínea.

**LA SCOLA & RAOULT (1999)** utilizaram inicialmente a morfologia das colônias, o teste da catalase e oxidase para identificação presuntiva dos isolados microbiológicos de *B. henselae*. **WONG et al.** fizeram o mesmo, porém, esta bactéria pode ser catalase variável, como descrito por **(SLHESSARENKO, 1998)** e confirmado em nossas observações.

O aspecto da colônia III, forrando toda a superfície da placa, dando um aspecto de véu, foi inicialmente interpretado como de contaminação por *Proteus* sp.. O forte odor quando da abertura da jarra, igualmente lembrava o das culturas destas bactérias. Feita a identificação pela morfologia, coloração de Gram e teste da oxidase, verificou-se que as únicas diferenças com as bactérias da colônia I eram que aquelas estavam menos aderidas umas às outras e eram mais cocóides. A microscopia eletrônica de transmissão confirmou tratar-se da mesma bartonela.

É de se supor que a colônia III seja a de bactérias mais virulentas e isto deverá ser comprovado oportunamente. Porém, sua morfologia não foi descrita na literatura que menciona dois padrões: o mucóide, de bactérias menos virulentas e observados na colônia I e o rugoso, de bactérias mais virulentas e encontrados na colônia II.

**HENSEL & SLATER (1995)** mencionaram que também a *B. bacilliformis* tem as duas variedades na morfologia das colônias, diferindo na capacidade de aderência a eritrócitos, *in vitro*, sugerindo diferença de virulência entre os fenótipos.

Esta informação reveste-se de importância ao considerar que, possivelmente, culturas positivas com o padrão da colônia III estejam sendo desprezadas como culturas contaminadas.

### **6.2.3. Objetivo 3**

Dentre os achados histológicos, chamou a atenção a presença de proliferação endotelial, no baço dos animais imunodeficientes, inoculados via IP e ID. Na região subcapsular do baço de um dos animais imunocompetentes, inoculados via IP, houve proliferação capilar. Destacou-se, também, o esboço de granulomas, no fígado do camundongo que morreu espontaneamente.

**REGNATH et al. (1999)** mostraram a presença de agregados linfomonocitários no fígado dos camundongos, a partir do terceiro dia de infecção, chegando à formação de granulomas, na segunda semana. Não foram referidas proliferações endoteliais ou capilares, como aqui observado, sobretudo no baço dos camundongos imunodeficientes.

Dos modelos animais revisados, apenas aqueles realizados com macacos, no início do século passado, chegaram a apresentar angioproliferação tecidual. Os resultados deste estudo foram únicos em evidenciar esta proliferação capilar em outro mamífero a partir da inoculação de bactérias viáveis. Este achado foi mais constante entre os camundongos imunodeficientes, como também é observado na clínica da infecção humana por bartonelas.

#### 6.2.4. Objetivo 4

Foram, porém, os resultados ultra-estruturais os mais expressivos.

A presença de duas fases diferentes, numa mesma colônia de *B. henselae*, diferiu dos dados encontrados na literatura (BATTERMAN., 1995; BROUQUI & RAOULT, 1996). Esta observação foi uma constante, independentemente da colônia avaliada ou do tempo de cultivo. Foi expressa como áreas claras e escuras e determinada por dois fatores possíveis de ser identificados: a quantidade e o tamanho das fímbrias e a disposição do conteúdo ribonucleico do citoplasma.

Portanto, a aparente contradição entre os achados de *B. quintana* desprovida de fímbrias e a descrição de bactérias da mesma espécie, com fímbrias, descritas, respectivamente, por BATTERMAN et al. (1995) e BROUQUI & RAOULT (1996), pôde ser observada na mesma colônia de *B. henselae*.

As colônias I mantiveram-se com pouca variação, quanto à densidade, organização citoplasmática e contornos celulares. Durante os 45 dias, apresentaram fímbrias.

Quando comparadas às colônias III, ficou evidente que as bactérias desta última exibiam menor número de fímbrias, sendo a maioria desprovidas destas estruturas, com material citoplasmático organizando-se em pontos negros já com 15 dias, com densidade muito maior que as primeiras. Outro dado interessante foi a presença de bactérias semelhantes às iniciais, porém mais encurvadas, em pequena quantidade, no dia 45.

Bactérias crescendo num organismo estão, constantemente, perdendo e substituindo fímbrias, o que, para algumas delas, tem o importante papel de defendê-las da resposta imune do hospedeiro. Além disso, elas podem possuir proteínas de adesão, ligadas diretamente à superfície celular, as chamadas adesinas afimbriadas (SALYERS & WHITT, 1994). Assim, mesmo não possuindo estas estruturas, as bartonelas das colônias III poderiam apresentar maior adesividade, como sugeriram os exames sangüíneos diretos.

Esta maior adesividade poder-se-á comprovar com testes de aderência a hemáceas de carneiro e com co-cultivo celular para avaliação, também, da capacidade de invasão. Além deste fator, a capacidade descrita por **BROUQUI & RAOULT (1996)** da *B. quintana* de localizar-se intracelularmente e aí multiplicar-se, poderia ser um fator, de proteção contra a resposta imune do hospedeiro e de defesa contra a ação de antibióticos. Este fator poderia ter relação com a recidiva de infecções tratadas, como mencionam os autores (**BROUQUI & RAOULT, 1996**), e, possivelmente, também, com a sintomatologia clínica de febre intermitente, observada na febre das trincheiras.

Outro fator de possível proteção, da bactéria, à ação de anticorpos, seria a produção dos *blebs* (**BROUQUI & RAOULT, 1996**). As colônias das bactérias, recuperadas da passagem, nos camundongos, apresentavam *blebs* já com 15 dias e eram abundantes nas colônias mais velhas.

É importante ressaltar que, para a avaliação ultra-estrutural, as bactérias foram semeadas no mesmo dia, a partir de espécimes congeladas, diretamente em sangue, e mantidas sob as mesmas condições. Foram coletadas, fixadas e processadas conjuntamente, o que permite a comparação das diferentes colônias, a cada dia de coleta. **ITO & VINSON (1965)** sugeriram que as irregularidades no contorno destas bactérias deviam-se a problemas técnicos ou de condições de crescimento inadequadas. As diferenças encontradas entre as colônias I e III, permitiram supor que a diminuição da espessura da parede celular observada deva ser um fator envolvido na mudança de contorno das bartonelas, inclusive porque ela normalmente é responsável pela integridade estrutural das bactérias.

### **6.3. CONSIDERAÇÕES GERAIS**

O estudo apresentado, ainda que bibliográfico e descritivo, apresenta muitas implicações práticas, como listadas no item seguinte de Prioridades de Pesquisa. Isto se deve ao fato de o gênero estudado conter bactérias emergentes, com maior patogenicidade aos seres humanos do que se poderia pensar há poucos anos.



Para a prática clínica, o estudo conjunto das bartoneloses permite supor que bactérias deste gênero estejam envolvidas em quadros clínicos em que não se consegue determinar a etiologia ou que sejam considerados idiopáticos.

Conforme referido, **SCHWARTZMAN (1996)** mencionou que a AB é infreqüentemente considerada no diagnóstico diferencial de um complexo relativamente comum nos pacientes com Aids: febre, viceromegalia, anemia e níveis elevados de fosfatase alcalina.

Quadros psiquiátricos e a demência ligada à Aids também foram associados à infecção pelas bartonelas, com melhora com antibioterapia. Sendo estas bactérias capazes de provocar uma infecção crônica e por terem tropismo por células endoteliais, poder-se-ia conjecturar que possam estar envolvidas em quadros centrais, associados com degeneração vascular, não apenas entre os pacientes soropositivos para o HIV.

Sob o mesmo raciocínio, a possibilidade de inflamações crônicas de as paredes vasculares poderem ser determinadas por infecções igualmente crônicas, **ENDER et al. (2001)** supôs o envolvimento das bartonelas com doença coronariana, já que o papel da *Chlamydia pneumoniae* como agente envolvido neste processo é conhecido e ela apresenta reação sorológica cruzada com espécies de *Bartonella*.

Outras doenças inflamatórias crônicas relatadas em associação à infecção por bartonelas poderão, talvez, ser causadas pelas bactérias.

O relato de **GUPTILL et al. (1998)** de que gatas infectadas por *B. henselae* tiveram dificuldades em engravidar e manter a gestação e as semelhanças entre manifestações da infecção observadas na doença humana nos felinos sugerem que esta bactéria possa ser responsável por parte dos casos de esterilidade ou de abortamento de repetição. Estudos futuros deverão confirmar esta possibilidade.

Somam-se a estas hipóteses a alta soroprevalência encontrada entre algumas populações: 60% da população de área endêmica da DC são soropositivos para a *B. bacilliformis*. Quarenta e cinco por cento dos suíços e 19% dos alemães estudados apresentaram anticorpos anti-*B. henselae*. Nos Estados Unidos da América, a

soroprevalência para esta bactéria é de 2%-6%, porém pode ser muito maior em determinados grupos, como entre os usuários de drogas. Nesta população, a positividade para anticorpos anti-*B. elizabethae* chegou a 33% (GARCIA-CACERES & GARCIA, 1991; BASS, VINCENT, PERSON, 1997a; RATH, VON RECKLINGHAUSEN, ANSORG, 1997; BERGMANS et al., 1997b; COMER et al., 1996).

Em vista destas informações, pode-se imaginar por que as bartonelas aparecem entre as bactérias que vêm acometendo pacientes neutropênicos com câncer, mudando a epidemiologia da infecção bacteriana nestes pacientes (ZINNER et al. 1999).

O estudo de LUCEY et al. (1992) sugeriu que pessoas infectadas pela *B. henselae* deveriam ser aconselhadas a se absterem de doar sangue até que hemoculturas se negativassem após antibioterapia. À luz do que foi apresentado, considerando que muitos dos receptores de transfusões sanguíneas são ou virão a ser pacientes imunodeficientes, haverá a necessidade de se priorizarem as pesquisas nesta área para, ativamente, ser impedida a inoculação destas bactérias durante este procedimento, já que entre os gatos esta possibilidade foi confirmada pelo trabalho de KORDICK et al. (1999).

Quanto à relação destas bactérias com os humanos e outros animais, muito teremos a aprender. Relatos recentes de doença humana causada por espécies antes não consideradas como patogênicas ao homem envolveram camundongos e cachorros entre os reservatórios das bartoneloses. O verdadeiro papel dos vetores ainda deverá ser estudado.

Métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos poderão contribuir para o entendimento destes questionamentos.

A antigenicidade das bactérias deverá ser mais bem compreendida para que os testes sorológicos, hoje o recurso diagnóstico mais utilizado, possam ter resultados mais confiáveis. A observação das alterações ultra-estruturais aqui descritas fará supor que a *B. henselae*, se não as demais espécies deste gênero, é capaz de alterar grandemente suas expressões fenotípicas e isto deve ter implicações na sua antigenicidade.

Além disso, o estudo apresentado contribui com algumas sugestões práticas.

O uso dos camundongos imunodeficientes possibilitou observar características histológicas antes não-descritas, exceto na doença humana e em modelos com macacos utilizados há mais de 70 anos.

Este modelo permite avaliar uma das características que na clínica é muito importante, a imunidade do hospedeiro. O uso conjunto de animais isogênicos imunocompetentes e imunodeficientes deverá possibilitar um controle mútuo, esclarecendo o papel desta variável na patogenicidade das bartoneloses.

O estudo sugere que o exame direto do sangue possa ser pesquisado como um recurso diagnóstico a ser incorporado na prática clínica de febres de origem indeterminada ou recorrentes.

Em doenças infecciosas o critério diagnóstico ouro é o isolamento do agente envolvido.

Conforme foi apresentado, todos os 12 camundongos inoculados com cepa padrão de *B. henselae* tiveram culturas teciduais e/ou sangüíneas positivas para esta bactéria. A metodologia empregada na manutenção destas bactérias no laboratório de microbiologia do HC–Unicamp deverá ser estudada, pois sugere sensibilizar este método diagnóstico. A utilização do congelamento do sangue ou tecido a ser semeado poderá ser incorporado à rotina dos laboratórios de microbiologia clínica, buscando também sensibilizar o método diagnóstico, sem onerá-lo, o que acontece quando se utilizam os tubos de lise microbiana.

As morfologias das colônias descritas para a *B. henselae* são as mesmas observadas para a *B. quintana* e para a *B. bacilliformis*. Não há relato da morfologia observada quando foram recuperadas as bactérias após a passagem nos camundongos imunodeficientes e imunocompetentes. O aspecto de véu e odor exalado à abertura da jarra de anaerobiose sugeriram o de contaminantes de laboratório, como *Proteus* spp.. Esta morfologia deverá ser documentada e publicada para facilitar seu diagnóstico.

As alterações ultra-estruturais que sofreu a cepa de *B. henselae*, após a passagem em camundongos imunodeficientes e imunocompetentes, são evidentes e deverão ser consideradas na realização de futuros estudos sobre modelos experimentais para a infecção por este agente e na reavaliação de trabalhos anteriores que tenham utilizado cepas mantidas em laboratório e, provavelmente, menos virulentas.

Após toda a revisão apresentada, sugere-se a seguinte classificação das infecções humanas por *Bartonella* spp.:

- .doença de Carrión - compreendendo a febre de Oroya e a verruga peruana
- .febre das trincheiras - forma clássica de febre quintana
- .doença da arranhadura do gato - forma típica
- .angiomatose bacilar - comprometimento cutâneo e/ou extracutâneo (com peliose ou não)
- .bacteremia sintomática ou assintomática - inclui a “febre das trincheiras dos dias modernos”
- .endocardite
- .septicemia
- .manifestações neurológicas
- .manifestações oftalmológicas
- .manifestações psiquiátricas
- .linfonodomegalia crônica
- .síndrome oculoglandular de Parinaud
- .outras manifestações cutâneas não-angiomasas - inclui eritema nodoso, eritema anular, eritema multiforme, exantema máculo-papular.
- .manifestações hematológicas - anemia, linfopenia e púrpura trombocitopênica.

#### 6.4. PRIORIDADES DE PESQUISA

1. Comparar, à ME, colônias I e III após 5, 10, 15 e 20 repiques com intervalos semanais para avaliar se alterações morfológicas acontecem pela manutenção da bactéria em laboratório.
2. Comparar o crescimento microbiológico das bartonelas em ambiente com aerobiose e anaerobiose produzida por geradores de marcas internacionalmente reconhecidas e, utilizando sangue de animais infectados experimentalmente, com diferentes concentrações de inóculos, determinar sensibilidade do uso da técnica de lise e centrifugação e simples congelamento por seis horas.
3. Avaliar a infectividade das colônias I, II e III em camundongos, a adesividade das mesmas colônias em hemáceas de carneiro e fazer co-cultivo celular para avaliar aderência e penetração.
4. Promover o armazenamento de sangue de gato infectado experimentalmente nas mesmas condições que se faz o armazenamento em hemocentros, com culturas sucessivas durante período de manutenção.
5. Avaliar a soroprevalência em doadores de sangue em uma região brasileira para anticorpos anti-*B. henselae*. Comparar a prevalência entre os que têm e/ou gostam de gatos com aqueles que não os têm e/ou não gostam destes animais.
6. Fazer cultura sangüínea dos soropositivos e de amostra populacional entre os doadores soronegativos.
7. Observar a soroprevalência em gatos atendidos em clínicas veterinárias da cidade e colher hemoculturas dos mesmos. Colher cultura e sorologia dos contactantes daqueles animais que tiverem um e/ou outro exames positivos.

8. Realizar hemocultura e sorologia de todas as febres de longa duração ou de origem indeterminada, atendidas nas enfermarias de pediatria, infectologia e hematologia do HC-Unicamp, em meios enriquecidos com sangue e mantidos sob anaerobiose, por um período de incubação maior que o de rotina, após congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$ , por seis horas.
9. Realizar inquérito sorológico anti-*B. henselae* em mulheres estéreis e aquelas com aborto de repetição, usando pareamento com gestantes normais.
10. Realizar inquérito sorológico anti-*B. henselae* em pacientes com demência, pareados com controles normais.



*CONCLUSÕES*

1. O estudo conjunto das doenças causadas pelas *Bartonella* spp. revela relações patogênicas entre elas. Os trabalhos experimentais têm contribuído de forma parcial à elucidação da fisiopatogenia da infecção por estas bactérias.
2. O seguimento dos camundongos infectados experimentalmente pela *B. henselae* sugere um padrão semelhante ao observado aos inoculados com *Haemobartonella* sp.. O exame direto do sangue destes animais mostrou-se eficaz na avaliação da bacteremia e todos eles tiveram expressão clínica da infecção e culturas sanguíneas e/ou teciduais positivas.
3. As alterações determinadas no fígado e no baço dos animais utilizados esboçou o mesmo padrão observado na angiomatose bacilar e na doença da arranhadura do gato, expressões histopatológicas polares da infecção pela *B. henselae* nos pacientes imunodeficientes e imunocompetentes, respectivamente.
4. Houve evidentes alterações morfológicas nas colônias de *B. henselae*, após passagens *in vivo*. Macroscopicamente, as colônias iniciais apresentavam aspecto de colônias menos virulentas, segundo a descrição da literatura. Assumiram aspecto próprio daquelas recuperadas de pacientes, depois da passagem nos camundongos imunodeficientes. Após a segunda passagem nos animais, foi observado padrão não-descrito previamente. As alterações microscópicas evidenciaram uma perda progressiva de fímbrias e maior produção de *blebs*. Estes achados morfológicos poderão justificar o aumento da virulência sugerido neste estudo.
5. Estudos futuros sobre a patogênese das bartonelas, como aqueles sugeridos em Prioridades de Pesquisa, deverão considerar os achados aqui apresentados.





*SUMMARY*

Human bartonellosis are a group of illnesses of poorly understood pathogenesis. *Bartonella henselae* is one of the most studied bacterium of its genus. The objective of this study was to observe whether passages of these bacteria, *in vivo*, would determine ultrastructural changes in them. For this purpose, isogenic mice were inoculated with a standard strain of *B. henselae* (I). These were initially retrieved from genetically immunodeficient animals (II) and then inoculated in immunocompetent ones. The bacterial colonies obtained (III) were compared, by transmission electron microscopy, with colonies I and II. Loss of fimbriae and an abundant bleb formation were the most common morphological changes found in colony III. Also, on day 6 postinfection, the main histological abnormalities were the endothelial proliferation presented in immunodeficient animals and the incipient granulomata reaction found in one of the immunocompetent inoculated mice, which died spontaneously. These features agree with the *Bartonella* human disease clinical and histological observations. Our studies demonstrate that *B. henselae in vivo* passages induced morphological changes in them and these abnormalities could explain their seemingly greater virulence. Most of these observations have not been previously described. So, further studies on the *Bartonella* species pathogenesis should consider these data.



*REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS*

- ABBOTT, R.C.; CHOMEL, B.B.; KASTEN, R.W.; FLOYD-HAWKINS, K.A.; KIKUCHI, Y.; KOEHLER, J.E.; PEDERSEN, N.C. – Experimental and natural infection with *Bartonella henselae* in domestic cats. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, **20**:41–51, 1997.
- ALEXANDER, B. – Review of bartonellosis in Ecuador and Colombia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **52**:354–9, 1995.
- ANDERSON, B.E.; NEUMAN, M.A. – *Bartonella spp.* as emerging human pathogens. **Clin. Microbiol. Rev.**, **10**:203–19, 1997.
- ANDERSON, G.W., JR.; OSTERMAN, J.V. – Host defenses in experimental rickettsialpox: genetics of natural resistance to infection. **Infect. Immun.**, **28**:132–6, 1980.
- ANGRITT, P.; TUUR, S.M.; MACHER, A.M.; SMITH, K.J.; PARK, C.S.; HOBIN, F.P.; MYRIE-WILLIAMS, C. – Epithelioid angiomatosis in HIV infection: neoplasm or cat-scratch disease? **Lancet**, **1**:996, 1988. [Letter]
- AZEVEDO, Z.M.; HIGA, L.Y.; BOECHAT, M.B.; KLAPLAUCH, F. – Cat-scratch disease caused by *Bartonella quintana* in an infant: an unusual presentation. **Rev. Bras. Med. Trop.**, **33**:313–17, 2000.
- BAKER, H.J.; CASSEL, G.H.; LINDSEY, J.R. – Research complications due to *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* infections in experimental animals. **Am. J. Pathol.**, **64**:625–32, 1971.
- BAKER, J.; RUIN-RODRIGUEZ, R.; WHITFIELD, M.; HEON, V.; BERGER, T. G. – Bacillary angiomatosis: a treatable cause of acute psychiatric symptoms in human immunodeficiency virus infection. **J. Clin. Psychiatry**, **56**:161–6, 1995.
- BANETH, G.; KORDICK, D.L.; HEGARTY, B.C.; BREITSCHWERDT, E.B. – Comparative seroreactivity to *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* among cats from Israel and North Carolina. **Vet. Microbiol.**, **50**:95–103, 1996.

- BASS, J.W.; VINCENT, J.M.; PERSON, D.A. – The expanding spectrum of Bartonella infections: I. Bartonellosis and trench fever. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, **16**:2–10, 1997.
- BASS, J.W.; VINCENT, J.M.; PERSON, D.A. – The expanding spectrum of Bartonella infections: II. Cat–Scratch disease. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, **16**:163–79, 1997.
- BASS, J.W.; FREITAS, B.C.; FREITAS, A.D.; SISLER, C.L.; CHAN, D.S.; VINCENT, J.M.; PERSON, D.A.; CLAYBAUGH, J.R.; WITTLER, R.R.; WEISSE, M.E.; REGNERY, R.L.; SLATER, L.N. – Prospective randomized double blind placebo–evaluation of azithromycin for treatment of cat–scratch disease. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, **17**:447–52, 1998.
- BATTERMAN, H.J.; PEEK, J.A.; LOUTIT, J.S.; FALKOW, S.; TOMPKINS, L.S. – Bartonella henselae and Bartonella quintana adherence to and entry into cultured human epithelial cells. **Infect. Immun.**, **63**:4553–6, 1995.
- BENSON, L.A.; KAR, S.; MCLAUGHLIN, G.; IHLER, M. – Entry of Bartonella bacilliformis into erythrocytes. **Infect. Immun.**, **54**:347–53, 1986.
- BERGER, T.G.; TAPPERO, J.W.; KAYMEN, A.; LEBOIT, P.E. – Bacillary (epithelioid) angiomatosis and concurrent Kaposi's sarcoma in acquired immunodeficiency syndrome. **Arch. Dermatol.**, **125**:1543–7, 1989.
- BERGMANS, A.M.C.; GROOTHEDDE, J.W.; SCHELLEKENS, J.F.P.; VAN EMBDEN, J.D.A.; OSSEWAARDE, J.M.; SCHOULS, L.M. – 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.**, **171**:916–23, 1995.
- BERGMANS, A.M.C.; JONG, C.M.A.; AMERONGEM, V.; SHOT, C.S.; SCHOULS, L.M. – Prevalence of Bartonella species in domestic cats in the Netherlands. **J. Clin. Microbiol.**, **35**:2256–61, 1997b.

- BERGMANS, A.M.C.; PEETERS, M.F.; SCHELLEKENS, J.F.P.; VOS, M.C.; SABBE, L.J.M.; OSSEWAARDE, J.M.; VERBAKEL, H.; HOOFT, H.J.; SCHOULS, L.M. – Pitfalls and fallacies of cat scratch disease serology: evaluation of *Bartonella henselae* – based indirect fluorescence assay and enzyme–linked immunoassay. **J. Clin. Microbiol.**, **35**:1931–7, 1997a.
- BERMOND, D.; HELLER, R.; BARRAT, F.; DELACOUR, G.; DEHIO, C.; ALLIOT, A.; MONTEIL, H.; CHOMEL, B.; BOULOIS H.J.; PIÉMONT, Y. – *Bartonella birtlesii* sp. nov., isolated from small mammals (*Apodemus* sp.). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, **50**:1973–9, 2000.
- BIRTLES, R.J.; HARRISON, T.G.; SAUNDERS, N.A.; MOLYNEUX, D.H. – Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **45**:1–8, 1995.
- BORCZUK, A.C.; NIEDT, G.; SABLAY, L.B.; KRESS, Y.; MANNION, C.M.; FACTOR, S.M.; TANAKA, K.E. – Fibrous long–spacing collagen in bacillary angiomatosis. **Ultrastruct. Pathol.**, **22**:127–33, 1998.
- BOYLER, K.M.; CHERRY, J.D. – Cat scratch disease. In FEIGIN, R.D.; CHERRY, J.D. **Textbook of pediatric infectious diseases**. 3 ed. Philadelphia, W.B. Saunders, v.1, 1084–9, 1992.
- BREITSCHWERDT, E.B.; KORDICK, D.L.; MALARKEY, D.E.; KEENE, B.; HADIFIELD, T.L.; KENNETH, W. – Endocarditis in a dog due to infection with a novel *Bartonella* subspecies. **J. Clin. Microbiol.**, **33**:154–60, 1995.
- BREITSCHWERDT, E.B.; SONTAKKE, S.; CANNEDY, A.; HANCOCK, S.I.; BRADLEY, J.M. – Infection with *Bartonella weissii* and detection of nanobacterium antigens in a North Carolina beef hurt. **J. Clin. Microbiol.**, **39**:879–82, 2001.

BRENNER, D.J.; HOLLIS, D.G.; MOSS, C.W.; ENGLISH, C.K.; HALL, G.S.; VINCENT, J.; RADOSEVIC, J.; BIRKNESS, K.A.; BIBB, W.F.; QUINN, F.D.; SWAMINATHAN, B.; WEAVER, R.E.; REEVES, M.W.; O'CONNOR, S.P.; HAYES, P.S.; TENOVER, F.C.; STEINGERWALT, A.G.; PERKINS, B.A.; DANESHVAR, M.I.; HILL, B.C.; WASHINGTON, J.A.; WOODS, T.C.; HUNTER, S.B.; HADFIELD, T.L.; AJELLO, G.W.; KAUFMANN, A.F.; WEAR, D.J.; WENGER, J.D. – Proposal of *Afipia* gen. nov., with *Afipia felis* sp. nov. (formerly the cat scratch disease bacillus), *Afipia clevelandensis* sp. nov. (formerly the Cleveland clinic foundation strain), *Afipia broomeae* sp. nov., and three unnamed genospecies. **J. Clin. Microbiol.**, **29**:2425–60, 1991.

BRENNER, D.J.; O'CONNOR, S.P.; WINKLER, H.H.; STEIGERWALT, A.G. – Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from the order Rickettsiales. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **43**:777–86, 1993.

BRENNER, S.A.; ROONEY, J.A.; MANZEWITSCH, P.; REGNERY, R.L. – Isolation of *Bartonella (Rochalimae) henselae*: effects of methods of blood collection and handling. **J. Clin. Microbiol.**, **35**:544–7, 1997.

BROOKS, J.J.; FISHER, C. – Epithelioid angiomatosis: a variant of Kaposi's sarcoma. **Lancet**, **i**:1214–15, 1987. [Letter]

BROUQUI, P.; HOUPIKIAN, P.; DUPONT, H.T.; TOUBIANA, P.; OBADIA, Y.; LAFAY, V.; RAOULT, D. – Survey of the seroprevalence of *Bartonella quintana* in homeless people. **Clin. Infect. Dis.**, **23**:756–9, 1996.

BROUQUI, P.; LA SCOLA, B.; ROUX, V.; RAOULT, D. – Chronic *Bartonella quintana* bacteremia in homeless patients. **N. Engl. J. Med.**, **340**:184–9, 1999.

- BROUQUI, P.; RAOULT, D. – *Bartonella quintana* invades and multiplies within endothelial cells *in vitro* and *in vivo* and forms intracellular blebs. **Res. Microbiol.**, **147**:719–31, 1996.
- CARITHERS, H.A. – Cat–scratch disease: notes on its history. **Am. J. Dis. Child.**, **119**:200–3, 1970.
- CARITHERS, H.A.– Cat–scratch disease. An overview based on a study of 1200 patients. **Am. J. Dis. Child.**, **139**:1124–33, 1985.
- CHAN, J.K.C.; KUNG; I.T.M.; LONG, F.C.; NG, C.S.; WU, C. – No cat–scratch disease bacilli in sporadic epithelioid haemangiomas. **Lancet**, **i**:454, 1988. [Letter]
- CHAN, J.K.C.; LEWIN, K.J.; LOMBARD, C.M.; TEITELBAUM, S.; DORFMAN, R.F. – Histopathology of bacillary angiomatosis of lymph node. **Am. J. Surg. Pathol.**, **15**:430–7, 1991.
- CHILDS, J.E.; ROONEY, J.A.; COOPER, J.L.; OLSON, J.E.; REGNERY, R.L. – Epidemiological observations on infection with *Rochalimae* species among cats living in Baltimore, MD. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **204**:1775–8, 1994.
- CHOMEL, B.B.; ABBOTT, R.C.; KASTEN, R.W.; FLOYD–HAWKINS, K.A.; KASS, P.H.; GLASER, C.A.; PEDERSEN, N.C.; KOEHLER, J.E. – *Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. **J. Clin. Microbiol.**, **33**:2445–50, 1995.
- CHOMEL, B.B.; KASTEN R.W.; FLOYD–HAWKIN, K.; CHI, B.; YAMAMOTO, K.; ROBERTS–WILSON, J.; GURFIELD, A.N.; ABBOTT, R.C.; TEDERSEN, N.C.; KOEHLER, J.E. – Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. **J. Clin. Microbiol.**, **34**: 1952–6, 1996.
- CLARRIDGE, J.E.; RAICH, T.J.; PIRWANI, D.; SIMON, B.; TSAI, L.; RODRIGUEZ–BARRADAS, M.C.; REGNERY, R.; ZOLLO, A.; JONES, D.C.; RAMBO, C. – Strategy to detect and identify *Bartonella species* in routine clinical laboratory yields *Bartonella henselae* from immunodeficiency virus–positive patient and unique bartonella strain from his cat. **J. Clin. Microbiol.**, **33**:2107–13, 1995.



- COCKERELL, C.J.; BERGSTRESSER, P.R.; MYRIE–WILLIAMS, C.; TIERNO, P.M. – Bacillary epithelioid angiomatosis occurring in an immunocompetent individual. **Arch. Dermatol.**, **126**:787–90, 1990.
- COCKERELL, C.J.; FRIEDMAN–KIEN, A.E. – Epithelioid angiomatosis and cat scratch disease bacillus. **Lancet**, **i**:1334–5, 1988. [Letter]
- COCKERELL, C.J.; LEBOIT, P.E. – Bacillary angiomatosis: A newly characterized, pseudoneoplastic, infectious, cutaneous vascular disorder. **J. Am. Acad. Dermatol.**, **22**:501–12, 1990.
- COCKERELL, C.J.; WHITLOW, M.A.; WEBSTER, G.F.; FRIEDMAN–KIEN, A.E. – Epithelioid angiomatosis: a distinct vascular disorder in patients with the acquired immunodeficiency or aids–related complex. **Lancet**, **i**:654–6, 1987.
- COMER, J.A.; FLYNN, C.; REGNERY, R.L.; VLAHOV, D.; CHILDS, J.E.– Antibodies to *Bartonella species* in inner–city intravenous drug users in Baltimore, Md. **Arch. Intern. Med.**, **156**:2491–5, 1996.
- CONSEJO CANADIENSE DE PROTECCIÓN DE LOS ANIMALES. **Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación**. 2.ed. Ottawa, Ed. Bradda Printing Services, 1998. 1v.
- COTELL, S.L.; NOSKIN, G.A.– Bacillary angiomatosis – clinical and histologic features, diagnosis, and treatment. **Arch. Intern. Med.**, **154**:524–8, 1994.
- DALTON, M.J.; ROBINSON, L.E.; COOPER, J.; REGNERY, R.L.; OLSON, J.G.; CHILDS, J.E. – Use of *Bartonella antigens* for serologic diagnosis of cat–scratch disease at a national referral center. **Arch Intern. Med.**, **155**:1675–6, 1995.
- DALY, J.S.; WORTHINGTON, M.G.; BRENNER, D.J.; MOSS, C.W.; HOLLIS, D.G.; WEYANT, R.S.; STEIGERWALT, A.G.; WEAVER, R.E.; DANESHVAR, M.I.; O’CONNOR, S.P. – *Rochalimae elizabethae* sp. nov. isolated from a patient with endocarditis. **J. Clin. Microbiol.**, **31**:872–81, 1993.

- DEHIO, C.; SANDER, A. – *Bartonella* as emerging pathogens. **Trends Microbiol.** 7:226–8, 1999.
- DOLAN, M.J.; WONG, M.T.; REGNERY, R.L.; JORGENSEN, J.H.; GARCIA, M.; PETERS, J.; DREHNER, D. – Syndrome of *Rochalimaea henselae* adenitis suggesting cat scratch disease. **Ann. Intern. Med.**, 118:331–6, 1993.
- DOUGHERTY, M.J., SPACH, D.H.; LARSON, A.M.; HOOTON, T.M.; COYLE, M.B. – Evaluation of an extended blood culture protocol to isolate fastidious organisms from patients with Aids. **J. Clin. Microbiol.**, 34:2444–7, 1996.
- DRANCOURT, M.; BIRTLES, R.; CHAUMENTIN, G.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J.; RAOULT, D. – New serotype of *Bartonella henselae* in endocarditis and cat-scratch disease. **Lancet**, 347:441–3, 1996.
- DRANCOURT, M.; MAINARDI, J.L.; BROUQUI, P.; VANDENESCH, F.; CARTA, A.; LEHNERT, F.; ETIENNE, J.; GOLDSTEIN, F.; ACAR, J.; RAOULT, D. – *Bartonella (Rochalimaea) quintana* endocarditis in three homeless men. **N. Engl. J. Med.**, 332:419–23, 1995.
- DROZ, S.; CHI, B.; HORN, E.; STEIGERWALT, A.G.; WHITNEY, A.M.; BRENNER, D.J. – *Bartonella koehlerae* sp. nov., isolated from cats. **J. Clin. Microbiol.**, 37:1117–22, 1999.
- DUARTE, M.I.S.; OLIVEIRA, M.S.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; MARIANO, O.N.; TAKAKURA, C.F.H.; PAGLIARI, C.; CORBETT, C.E.P. – *Haemobartonella*-like microorganism infection in Aids patients: ultrastructural pathology. **J. Infect. Dis.**, 165:976–7, 1992. [Letter]
- ELLIS, B.A.; REGNERY, R.L.; BEATI, L.; BACELLAR, F.; ROOD, M.; GLASS, G.G.; KSIAZEK, T.G.; JONES, D.; CHILDS, J.E. – Rats of the genus *Rattus* are reservoir hosts for pathogenic *Bartonella* species: an old world origin for a new world disease? **J. Infect. Dis.**, 180:220–224, 1999.

- ENDER, P.T.; PHARES, J.; GERSON, G.; TAYLOR, S.E.; REGNER, R.; CHALLENGER, R.C., DOLAN, M.J. – Association of *Bartonella* species and *Coxiella burnetii* infection with coronary artery disease. **J. Infect.**, **183**:831–4, 2001.
- ENGLISH, C.K.; WEAR, D.J.; MARGILETH, A.M.; LISSNER, C.R.; WALSH, G.P. – Cat–scratch disease: isolation and culture of the bacterial agent. **J. Am. Med. Assoc.**, **259**:1347–52, 1988.
- ESTRADA, J.A.; PIÉRARD, G.E. – Dendrocytes in verruga peruana and bacillary angiomatosis. **Dermatol.**, **184**:22–5, 1992.
- FENG, H.M.; WEN, J.; WALKER, D.H. – *Rickettsia australis* infection: a murine model of a highly invasive vasculopathic rickettsiosis. **Am. J. Pathol.**, **142**:1471–82, 1993.
- FOIL L.; ANDRESS, E.; FREELAND R.L.; ROY, A.F.; RUTLEDGE, R.; TRICHE, P.C.; O'REILLY, K.L. – Experimental infections of domestic cats with *Bartonella henselae* by inoculation of *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Publicidae) feces. **J. Med. Entomol.**, **35**:625–8, 1998.
- FUMAROLA, D.; GIULIANI, G.; PECE, S. – Pathogenic mechanisms of *Bartonella henselae* infections. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, **15**:385–6, 1996. [Letter]
- GARCIA–CACERES, U.; GARCIA, F.U. – Bartonellosis: an immunodepressive disease and the life of Daniel Alcides Carrión. **Am. J. Clin. Pathol.**, **95** (suppl.1):58–66, 1991.
- GARCIA, F.U.; WOJTA, J.; BROADLEY, K.N.; DAVIDSON, J.M.; HOOVER, R.L. – *Bartonella bacilliformis* stimulates endothelial cells *in vitro* and is angiogenic *in vivo*. **Am. J. Pathol.**, **136**:1125–34, 1990.
- GARCIA, F.U.; WOJTA, J.; HOOVER, R.H. – Interactions between live *Bartonella bacilliformis* and endothelial cells. **J. Infect. Dis.**, **165**:1138–41, 1992.
- GILADI, M.; AVIDOR, B.; KLETTER, Y.; ABULAFIA, S.; SLATER, L.N.; WELCH, D.F.; BRENNER, D.J.; STEIGERWALT, A.G.; WHITNEY, A.M.; EPHROS, M. – Cat scratch disease: the rare role of *Afipia felis*. **J. Clin. Microbiol.**, **36**:2499–502, 1998.

- GREENE, C.E. – Rocky mountain spotted fever. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **191**:666–71, 1987.
- GREENE, C.E.; MCDERMOTT, M.; JAMESOM, P.H.; ATKINS, C.L.; MARKS, A.M. – *Bartonella henselae* infection in cats: evaluation during primary infection, treatment, and rechallenge infection. **J. Clin. Microbiol.**, **34**:1682–5, 1996.
- GUCCION, J.G.; GILBERT, C.L.; ORTEGA, L.G.; HADFIELD, T.L. – Cat scratch disease and acquired immunodeficiency disease: diagnosis by transmission electron microscopy. **Ultrastruct. Pathol.**, **20**:195–202, 1996.
- GUPTILL, L.; SLATER, L.; WU, C.C.; LIN, T.L.; GLICKMAN, L.T.; WELCH, D.F.; ESCH, H.H. – Experimental infection of young specific pathogen-free cats with *Bartonella henselae*. **J. Infect. Dis.**, **176**:206–16, 1997.
- GUPTILL, L.; SLATER, L.N.; WU, C.C.; LIN, T.L.; GLICKIMAN, L.T.; WELCH, D.F.; TOBOLSKI, J.; HOGENESCH, H. – Evidence of reproductive failure and lack of perinatal transmission of *Bartonella henselae* in experimentally infected cats. **Vet. Immun. Immunopathol.**, **65**:177–89, 1998.
- GURFIELD, A.N.; BOULOUIS, H.J.; CHOMEL, B.B.; HELLER, R.; KASTEN, R.; YAMAMOTO, K.; PIEMONT, Y. – Coinfection with *Bartonella clarridgeiae* and *Bartonella henselae* and with different *Bartonella henselae* strains in domestic cats. **J. Clin. Microbiol.**, **35**:2120–3, 1997.
- HADFIELD, T.L.; MALATY, R.H.; VAN DELLEN, A.; WEAR, D.J.; MARGILETH, A.M. – Electron microscopy of the bacillus causing cat-scratch disease. **J. Infect. Dis.**, **152**:643–5, 1985.
- HALL, A.V.; ROBERTS, C.M.; MAURICE, P.D.; MCLEAN, K.A.; SHOUSHA, S. – Cat-scratch disease in patient with Aids: atypical skin manifestation. **Lancet**, **i**:453–4, 1988. [Letter]

- HELLER, R.; ARTOIS, M.; XEMAR, V.; DE BRIEL, D.; GEHIN, H.; JAULHAC, B.; MONTEIL, H.; PIÉMONT, Y. – Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in stray cats. **J. Clin. Microbiol.**, **35**:1327–31, 1997.
- HELLER, R.; KUBINA, M.; MARIET, P.; RIEGEL, P.; DELACOUR, G.; DEHIO, C.; LAMARQUE, F.; KASTEN, R.; BOULOUIS, H.J.; MONTEIL, H.; CHOMEL, B.; PIÉMONT, Y. – *Bartonella alsatica* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rabbits. **Int. Syst. Bacteriol.**, **49**:283–8, 1999.
- HELLER, R.; RIEGEL, P.; HANSMANN, Y.; DELACOUR, G.; BERMOND, D.; DEHIO, C.; LAMARQUE, F.; MONTEIL, H.; CHOMEL, B.; PIÉMONT, Y. – *Bartonella tribocorum* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rats. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **48**:1333–9, 1998.
- HENSEL, D.M.; SLATER, L.N. – The genus *Bartonella*. **Clin. Microbiol. Newslett**, **17**:9–14, 1995.
- HIGGINS, J.A.; RADULOVIC, S.; JAWORSKI, D.C.; AZAD, A.F. – Acquisition of the cat scratch disease agent *Bartonella henselae* by cat fleas (*Siphonaptera pulicidae*). **J. Med. Entomol.**, **33**:490–5, 1996.
- HILDEBRANDT, P.K.; FOSTER, H. – *Rickettsial* and chlamydial disease. In: FOSTER, H., ed. **The mouse in biochemical research**. New York, Academic Press, 1982. p.99–107. (Disease, v. 2).
- HUANG, M.C.; DREYER, E. – Parinaud's oculoglandular conjunctivitis and cat-scratch disease. **Int. Ophthalmol., Clin.** **36**:29–36, 1996.
- ITIN, P.H.; FLÜCKIGER, R.; ZBINDEN, R.; FREI, R. – Recurrent pyogenic granuloma with satellitosis – a localized variant of bacillary angiomatosis? **Dermatol.**, **189**:409–12, 1994.
- ITO, S.; VINSON, W. – Fine structure of *Rickettsia quintana* cultivated in vitro and the louse. **J. Bacteriol.**, **89**:481–95, 1965.

- JACOBS, R.F.; SCHUTZE, G.E. – *Bartonella henselae* as a cause of prolonged fever and of unknown origin in children. **Clin. Infect. Dis.**, **26**:80–4, 1998.
- JAFFE, R. – Epitheloid angiomatosis: a variant of Kaposi's sarcoma. **Lancet**, **i**:1214–5, 1987.
- JENSEN, W.A.; FALL, M.Z.; ROONEY, J.; KORDICK, D.L.; BREITSCHWERDT, E.B. – Rapid identification and differentiation of *Bartonella species* using a single-step PCR assay. **J. Clin. Microbiol.**, **38**:1717–22, 2000.
- JONES, E.W.; ORKIN, M. – Tufted angioma (angioblastoma) a begin progressive angioma, not to be confused with Kaposi's sarcoma or low-grade angiosarcoma. **J. Am. Acad. Dermatol.**, **20**:214–25, 1989.
- JUMAS-BILAK, E.; MICHAUX-CHARACHON, S.; BOURG, G.; RAMUZ, M.; ALLARDET-SERVENT, A. – Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the *Proteobacteria*. **J. Bacteriol.**, **180**:2749–55, 1998.
- KAPLAN, M.H.; SADICK, N.; MCNUTT, N.S.; MELTZER, M.; SARNGADHARAN, M.G.; PAHWA, S. – Dermatologic findings and manifestations of acquired immunodeficiency syndrome (Aids). **J. Am. Acad. Dermatol.**, **16**:485–506, 1987.
- KARNOVSKY, M.D.A. – Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron-microscopy. **J. Cell. Biol.**, **27**:137a, 1965. (Abstract)
- KEMPER, C.A.; LOMBARD, C.M.; DERESINSKI, S.C.; TOMPKINS, L.S.– Visceral bacillary angiomatosis: possible manifestations of disseminated cat-scratch disease in the immunocompromised host: a report of two cases. **Am. J. Med.**, **89**:216–22, 1990.
- KERKHOFF, F.T.; BERGMANS, A.M., VAN DER ZEE, A., ROTHOVA, A. – Demonstration of *Bartonella grahamii* DNA in ocular fluids of a patient with neuroretinitis. **J. Clin. Microbiol.**, **37**:4034–8, 1999.

- KNOBLER, E.H., SILVERS, D.N.; FINE, K.C.; LEFKOWIYTCH, J.H.; GROSSMAN, M.E. – Unique vascular skin lesions associated with human immunodeficiency virus. **J. Am. Med. Assoc.**, **260**:524–7, 1988.
- KOEHLER, J.E. – *Bartonella*–associated infections in HIV–infected patients. **Aids Clin. Care**, **7**:97–102, 1995.
- KOEHLER, J.E.; GLASER, C.A.; TAPPERO, J.W. – *Rochalimaea henselae* infection: a new zoonosis with the domestic cat as reservoir. **J. Am. Med. Assoc.**, **271**:531–5, 1994.
- KOEHLER, J.E.; QUINN, F.D.; BERGER, T.G.; LEBEIT, P.E.; TAPPERO, J.W. – Isolation of *Rochalimaea* species from cutaneous and osseous lesions of bacillary angiomatosis. **N. Engl. J. Med.**, **327**:1625–31, 1992.
- KOEHLER, J.E.; TAPPERO, J.W. – Bacillary angiomatosis and bacillary peliosis infected with human immunodeficiency virus. **Clin. Infect. Dis.**, **17**:612–24, 1993.
- KORDICK, D.; BREITSCHWERDT, E.B. – Intraerythrocytic presence of *Bartonella henselae*. **J. Clin. Microbiol.**, **33**:1655–6, 1995.
- KORDICK, D.L.; BROWN, T.T.; SHIN, K.; BREITSCHWERDT, E.B. – Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cat. **J. Clin. Microbiol.**, **37**:1536–47, 1999.
- KORDICK, D.L.; HILYARD, E.J.; HADFIELD, T.L.; WILSON, K.H.; STEIGERWALT, A.G.; BRENNER, D.J.; BREITSCHWERDT, E.B. – *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease). **J. Clin. Microbiol.**, **35**:1813–8, 1997.
- KORDICK, D.L.; SWAMINATHAN, B.; GREENE, C.E.; WILSON, K.H.; WHITNEY, A.M.; O’CONNOR, S.; HOLLIS, D.G.; MATAR, G.M.; STEIGERWALT, A.G.; MALCOLM, G.B.; HAYES, P.S.; HADIFIELD, T.L.; BREITSCHWERDT, E.B.; BRENNER, D.J. – *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* nov., isolated from dogs. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **46**:704–9, 1996.

- KOSOY, M.Y.; REGNERY, R.L.; KOSAYA, O.I.; CHILDS, J.E. – Experimental infections of cotton rats with three naturally occurring *Bartonella* species. **J. Wild. Dis.**, **35**:275–84, 1999.
- KOSTIANOVSKY, M.; GRECO, M.A. – Angiogenic process in bacillary angiomatosis. **Ultras. Pathol.**, **18**:349–55, 1994.
- LARSON, A.M.; DOUGHERTY, M.J.; NOWOWIEJSKI, D.J.; WELCH, D.F.; MATAR, G.M.; SWAMINATHAN, B.; COYLE, M.B. – Detection of *Bartonella (Rochalimaea) quintana* by routine acridine orange staining of broth blood cultures. **J. Clin. Microbiol.**, **32**:1492–6, 1994.
- LA SCOLA, B.L.; RAOULT, D. – Culture of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* from human samples: a 5–year experience (1993 to 1998). **J. Clin. Microbiol.**, **37**:1899–905, 1999.
- LAWSON, P.A.; COLLINS, M.D. – Description of *Bartonella clarridgeiae* sp. nov. isolated from the cat of a patient with *Bartonella henselae* septicemia. **Med. Microbiol. Lett.**, **5**:64–73, 1996.
- LEBOIT, P.E.; BERGER, T.G.; EGBERT, B.M.; BECKSTEAD, J.H.; YEN, T.S.B.; STOLER, M.H. – Bacillary angiomatosis: the histopathology and differential diagnosis of a pseudoneoplastic infection in patients with human immunodeficiency virus disease. **Am. J. Surg. Pathol.**, **13**:909–10, 1989.
- LEBOIT, P.E.; EGBERT, B.M.; STOLER, M.H.; STRAUCHEN, J.A.; WEAR, D.J.; BERGER, T.G.; YEN, T.S.B.; BONFIGLIO, T.A.; ENGLISH, C.K. – Epithelioid haemangioma–like vascular proliferation in Aids; manifestation of cat scratch disease bacillus infection? **Lancet**, **i**:960–3, 1988.
- LEMOS, E.R.S. – Febre maculosa brasileira em uma área endêmica no município de Pedreira, São Paulo, Brasil. Rio de Janeiro, 1996. [Tese – Doutorado – Instituto Oswaldo Cruz].



- LEVELL, N.J.; BEWLEY, A.P.; CHOPRA, S.; CHURCHILL, D.; FRENCH, P.; MILLER, R.; GILKES, J.J.H. – Bacillary angiomatosis with cutaneous and oral lesions in an HIV–infected patient from the U.K. **Britt. J. Dermatol.**, **132**:113–5, 1995.
- LONG, S.R.; WHITFIELD, M.J.; EADS, C.; KOEHLER, J.E.; KORN, A.P.; ZALOUDEK, C.J. – Bacillary angiomatosis of the cervix and vulva in a patient with Aids. **Obstet. Gynecol.**, **88**:709–11, 1996.
- LOUTIT, J.S. – *Bartonella* infections. **Cur. Clin. Top. Infect. Dis.**, **17**:269–90, 1997.
- LUCEY, D.; DOLAN, M.J.; MOSS, C.W.; GARCIA, M.; HOLLIS, D.G.; WEGNER, S.; MORGAN, G.; ALMEIDA, R.; LEONG, D.; GREISEN, K.S.; WELCH, D.F.; SLATER, L.N. – Relapsing illness due to *Rochalimaea henselae* in immunocompetent hosts: implications for therapy and new epidemiological associations. **Clin. Inf. Dis.**, **14**:683–8, 1992.
- MCFARLAND, J. – Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculation the opsonic index and for vaccines. **J. Am. Med. Assoc.**, **14**:1176–8, 1907.
- MARCONI, M.A.; LAKATOS, E.M. – **Técnicas de pesquisa**. 3.ed. São Paulo, Ed. Atlas, 1996.
- MARGILETH, A.M. – Cat–scratch disease. **Adv. Pediatr. Infect. Dis.**, **8**:1–21, 1993.
- MARGILETH, A.M. – Cat–scratch disease. **Adv. Pediatr. Infect. Dis.**, **8**:1–21, 1993.
- MARGILETH, A.M.; WEAR, D.J.; ENGLISH, C.K. – Sistemic cat scratch disease: report of 23 patients with prolonged or recurrent severe bacterial infection. **J. Infect. Dis.**, **155**:390–402, 1987.
- MARGILETH, A.M.; WEAR, D.J.; HADIFIELD, T.L.; SCHLAGEL, C.J.; SPIGEL, G.T.; MUHLBAUER, J.E. – Cat–scratch disease. Bacteria in skin at the primary inoculation site. **J. Am. Med. Assoc.**, **252**:928–31, 1984.

- MATTEELLI, A.; CASTELLI, F.; SPINETTI, A.; BONETTI, F.; GRAIFENBERGHI, S.; CAROSI, G. – Verruga peruana in an Italian traveler from Peru. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **50**:143–4, 1994.
- MAURIN, M.; EB, F.; ETIENNE, J.; RAOULT, D. – Serological cross–reactions between *Bartonella* and species: implications for diagnosis. **J. Clin. Microbiol.**, **35**:2283–7, 1997.
- MAURIN, M.; RAOULT, D. – *Bartonella (Rochalimaea) quintana* infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, **9**:273–92, 1996.
- MEHOCK, J.R.; GRENNE, C.E.; GHERARDINI, F.C.; HAHN, T.W.; KRAUSE, D.C. – *Bartonella henselae* invasion of feline erythrocytes in vitro. **Infect. Immun.**, **66**:3462–6, 1998.
- MERNAUGH, G.; IHLER, G.M. – Deformation factor: an extra cellular protein synthesized by *Bartonella bacilliformis* that deforms erythrocyte membranes. **Infect. Immun.**, **60**:937–43, 1992.
- MILAM, M.W.; BALERDI, M.J.; TONEY, J.F.; FOULIS, P.R.; MILAM, C.P.; BEHNKE, R.H. – Epithelioid angiomatosis secondary to disseminated cat–scratch disease involving bone marrow and skin in a patient with acquired disease syndrome: a case report. **Am. J. Med.**, **88**:180–3, 1990.
- MILLER, A.C.; WALKER, J.; JAWORSKI, R.; LAUNEY, W.; PAVER, R. – Hookworm folliculitis. **Arch. Dermatol.**, **127**: 547–9, 1991.
- MITCHELL, S.J.; MINNICK, M.F. – Characterization of a two–gene locus from *Bartonella bacilliformis* associated with the ability to invade human erythrocytes. **Infect. Immun.**, **63**:1552–62, 1995.
- MOE, J.B.; MOSHER, D.F.; KENYON, R.H.; WHITE, J.D.; STOOKEY, J.L.; BAGLEY, L.R.; FINE, D.P. – Functional and morphologic changes during experimental rocky mountain spotted fever in Guinea pigs. **Lab. Invest.**, **35**:235–45, 1976.

- MOHLE-BOETANI, J.C.; KOEHLER, J.E.; BERGER, T.G.; LEBOIT, P.E.; KEMPER, C.A.; REINGOLD, A.L.; PLIKAYTIS, B.D.; WENGER, J.D.; TAPPERO, J.W. – Bacillary angiomatosis and bacillary peliosis in patients infected with human immunodeficiency virus: clinical characteristics in a case–control study. **Clin. Infect. Dis.**, **22**:794–800, 1996.
- MOLARET, P.; REILLY J.; BASTIN, R.; TOUNIER, P. – La découverte du virus de la lymphoréticulose bénigne d'inoculation II – Inoculation expérimentale au singe et colorations. **Presse Méd.**, **59**:701–4, 1951.
- NIELSEN, H.; NIELSEN, P.L. – Cutaneous tufted angioma as a differential diagnosis to Kaposi's sarcoma in HIV infection. **Aids**, **8**:707–18, 1994. [Letter]
- NG, S.O.; YATES, M.T. – Ease of isolation and semiquantitative culture of *Bartonella henselae* from cats in Melbourne. **Pathology**. 333, 1997. [Letter]
- NOSAL, J.M. – Bacillary angiomatosis, cat–scratch disease, and bartonellosis: what's the connection? **Int. J. Dermatol.**, **36**:405–11, 1997.
- OLSEN, C.W. – Vaccination of cats against emerging and reemerging zoonotic pathogens. **Adv. Vet. Med.**, **41**:333–46, 1999.
- OMURA, E.F.; OMURA, G.A. – Human immunodeficiency virus–associated skin lesions. **J. Am. Med. Assoc.**, **261**:991, 1989. [Letter]
- O'CONNOR, S.P.; DORSCH, M.; STEIGERWALT, A.G.; BRENNER, D.J.; STACKEBRANDT, E. – 16S RNA sequences of *Bartonella bacilliformis* and cat scratch disease bacillus reveal phylogenetic relationships with the alpha–2 subgroup of the class *Proteobacteria*. **J. Clin. Microbiol.**, **29**:2144–50, 1991.
- O'HALLORAN, H.S.; DRAUD, K.; MINIX, M.; RIVARD, A.K.; PEARSON, P.A. – Leber's neuroretinitis in a patients with serologic evidence of *Bartonella elizabethae*. **J. Ret. Vit. Dis.**, **18**:276–8, 1998.

- O'REILLY, K.J.; BAUER, R.W.; FREELAND, R.L.; FOIL, L.D.; HUGHES, K.J.; ROHDE, K.R.; ROY, A.F.; STOUT, R.W.; TRICHE, P.C. – Acute clinical disease in cats following infection with a pathogenic strain of *Bartonella henselae* (LSU 16). **Infect. Immun.**, **67**:3066–72, 1999.
- PERKINS, B.A.; SWAMINATHAN, B.; JACKSON, L.A.; BRENNER, D.J.; REGNER, R.L.; WAER, D.J. – Pathogenesis of cat–scratch disease. **N. Engl. J. Med.**, **327**:1599–600, 1992. [Letter]
- PIÉMONT, Y.; HELLER, R. – Les bartonelloses II. *Autres Bartonella* responsables de maladies humaines. **Ann. Biol. Clin.**, **57**:29–36, 1999.
- PRESME, P.; MARCHAND, E. – Sur un nouveau type de conjonctivite infectieuse provoquée par le chat. **J. Med. Bordeaux**, **127**:127–31, 1950.
- RAOULT, D. – Infections humaines à *Bartonella*. **Presse Med.**, **28**:429–34, 1999.
- RAOULT, D.; DRANCOURT, M.; CARTA, A.; GASTAUT, J.A. – *Bartonella (Rochalimaea) quintana* isolation in patient with chronic adenopathy, lymphopenia, and a cat. **Lancet**, **343**:977, 1994. [Letter]
- RATH, P.M.; VON RECKLINGHAUSEN, G.; ANSORG, R. – Seroprevalence of immunoglobulin G antibodies to *Bartonella henselae* in cat owners. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** **16**:326–7, 1997. [Letter]
- REED, J.A.; BRIGATI, D.J.; FLYNN, S.D.; MCNUTT, N.S.; SLATER, L.N. – Immunocytochemical identification of *Rochalimaea henselae* in bacillary (epithelioid) angiomatosis parenchymal bacillary peliosis and persistent fever with bacteremia. **Am. J. Surg. Pathol.**, **16**:650–7, 1992.
- REGNATH, T.; MIELKE, M.E.A.; ARVAND, M.; HAHN, H. – Murine model of *Bartonella henselae* infection in the immunocompetent host. **Infect. Immun.**, **66**:5534–6, 1998.

- REGNERY, R.L.; ANDERSON, B.E.; CLARRIDGE III, J.E.; RODRIGUEZ-BARRADAS, M.C.; JONES, D.C.; CARR, J.H. – Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, virus-positive. **J. Clin. Microbiol.**, **30**:265–74, 1992a.
- REGNERY, R.L.; CHILDS, J.E.; KOEHLER, J.E. – Infectious associated with *Bartonella* species in persons infected with human immunodeficiency virus. **Clin. Infect. Dis.**, **21** (suppl.1):94–8, 1995.
- REGNERY, R.L.; MARTIN, M.; OLSON, J. – Naturally occurring *Rochalimaea henselae* infection in domestic cat. **Lancet**, **340**:557–8, 1992 [Letter].
- REGNERY, R.L.; OLSON, G.J.; PERKINS, B.A.; BIBB, W. – Serological response to *Rochalimaea henselae* antigen in suspected cat-scratch disease. **Lancet**, **339**:1443–5, 1992b.
- REGNERY, R.L.; ROONEY, J.A.; JOHNSON, A.M.; NESBY, S.L.; MANZEWITSCH, P.; BEAVER, K.; OLSON, J.G. – Experimentally induced *Bartonella henselae* infections followed by challenge exposure and antimicrobial therapy in cats. **Am. J. Vet. Res.**, **57**:1714–9, 1996.
- REGNERY, R.L.; TAPPERO, J. – Unraveling mysteries associated with cat-scratch disease, bacillary angiomatosis, and related syndromes. **Emerg. Infect. Dis.**, **1**:16–21, 1995.
- RELMAN, D.A.; FALKOW, S.; LEBOIT, P.E.; PERKOCHA, L.A.; MIN, K.W.; WELCH, D.; SLATER, L.N. – The organism causing bacillary angiomatosis, peliosis hepatis, and fever with bacteremia in immunocompromised patients. **N. Engl. J. Med.**, **324**:1514, 1991. [Letter]
- RELMAN, D.A.; LOUTIT, J.S.; SCHMIDT, T.M.; FALKOW, S.; TOMPKINS, L.S. – The agent of bacillary angiomatosis: an approach to the identification of uncultured pathogens. **N. Engl. J. Med.**, **323**:1587–93, 1990.

- RODRIGUEZ-BARRADAS, M.C.; BANDRES, J.C.; HAMILL, R.J.; TRIAL, J.; CLARRIDGE III, J.E.; BAUGHN, R.E.; ROSSEN, R.D. – *In vitro* evaluation of the role of humoral immunity against *Bartonella henselae*. **Infect. Immun.**, **63**:2367–70, 1995.
- ROUX, V.; EYKYN, S.J.; WYLLIE, S.; RAOULT, D. – *Bartonella visonii* subsp. *berkhoffi* as an agent of afebrile blood culture–negative endocarditis in a human. **J. Clin. Microbiol.**, **38**:1698–700, 2000.
- RYGAARD, J.; POVLSEN, C.O. – Athymic (nude) mice. In: FOSTER, H., ed. **The mouse in biochemical research**. New York, Academic Press, 1982. p.51–67. (Experimental Biology and Oncology, v. 4).
- SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. – **Bacterial pathogenesis: a molecular approach**. Washington, D.C., ASM Press, 1994.
- SCHLOSSBERG, D.; MORAD, Y.; KROUSE, T.B.; WEAR, D.J.; ENGLISH, C.K. – Culture–proved disseminated cat–scratch disease in acquired immunodeficiency syndrome. **Arch Intern. Med.**, **149**:1437–9, 1989.
- SCHUTZE, G.E. – Diagnosis and treatment of *Bartonella henselae* infection. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, **19**:1185–7, 2000.
- SCHWARTZMAN, W.A. – Bacillary angiomatosis and parenchymal peliosis: frequent absence of mucocutaneous lesions. **Clin. Inf. Dis.**, **22**:801–2, 1996. [Editorial]
- SCHWARTZMAN, W.A. – Infection due to *Rochalimae*: the expanding clinical spectrum. **Clin. Infect. Dis.**, **15**:893–902, 1992. [Letter]
- SCHWARTZMAN, W.A.; NESBIT, C.A.; BARON, E.J. – Development and evaluation of a blood–free medium for determining growth curves and optimizing growth of *Rochalimaea henselae*. **J. Clin. Microbiol.**, **31**:1882–5, 1993.

- SCHWARTZMAN, W.A.; PATNAIK, M.; ANGULO, F.J.; VISSCHER, B.R.; PETER, J.B. – *Bartonella (Rochalimae)* antibodies, dementia, and cat ownership among men infected with human immunodeficiency virus. **Clin. Infect. Dis.**, **21**:954–9, 1995.
- SCHWARTZMAN, W.A.; PATNAIK, M.; BARKA, N.E.; PETER, J.B. – *Rochalimaea* antibodies in HIV-associated neurologic disease. **Neurology**, **44**:1312–6, 1994.
- SLATER, L.N.; COODY, D.W.; WOOLORIDGE, L.K.; WELCH, D.F. – Murine antibody responses distinguish *Rochalimaea henselae* from *Rochalimaea quintana*. **J. Clin. Microbiol.**, **30**:1722–7, 1992.
- SLATER, L.N.; WELCH, D.F.; HENSEL, D.; COODY, D.W. – A newly recognized fastidious gram-negative pathogen as a cause of fever and bacteremia. **N. Engl. J. Med.**, **323**:1587–93, 1990.
- SLATER, L.N.; WELCH, D.F.; MIN, K.W. – *Rochalimaea henselae* causes bacillary angiomatosis and peliosis hepatis. **Arch Intern. Med.**, **152**:602–6, 1992.
- SLHESSARENKO, N. – Doença da arranhadura do gato: aspectos clínico-epidemiológicos e laboratoriais em 38 pacientes. São Paulo, 1998. [Tese – Mestrado – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].
- SLHESSARENKO, N.; CAMARGO, M.C.G.O.; D'AURIA, S.R.N.; MOUREIZ, E.S.M.; CAMARGO, M.E. – Soroprevalência de *Bartonella henselae* em gatos do município de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Tropic.** **29**:104, 1996.
- SPACH, D.H. – Bacillary angiomatosis. **Int. J. Dermatol.**, **31**:19–24, 1992.
- SPACH, D.H.; CALLIS, K.P.; PAAUW, D.S.; HOUZE, Y.B.; SCHOENKNECHT, F.D.; WELCH, D.F.; ROSEN, H.; BRENNER, D.J. – Endocarditis caused by *Rochalimaea* quintana in a patient infected with human immunodeficiency virus. **J. Clin. Microbiol.**, **31**:692–4, 1993.
- SPACH, D.H.; KANTER, A.S.; DOUGHERTY, M.J.; LARSON, A.M.; COYLE, M.B.; BRENNER, D.J.; SWAMINATHAN, B.; MATAR, G.M.; WELCH, D.F.; ROOT, R.K.; STAMM, W.E. – *Bartonella (Rochalimae)* quintana bacteremia in inner city patients with chronic alcoholism. **N. Engl. J. Med.**, **332**:424–8, 1995.

- SPACH, D.H.; KOEHLER, J.E. – *Bartonella*-associated infections. **Emerg. Infect. Dis.**, **12**:137–55, 1998.
- SPACH, D.H.; PANTHER, L.A.; THORNING, D.R.; DUNN, J.E.; FLORDE, J.J.; MILLER, R.A. – Intracerebral bacillary angiomatosis in a patient infected with human immunodeficiency virus. **Ann. Intern. Med.**, **116**:740–2, 1992.
- STEVENS, H. – Cat-Scratch fever encephalitis. **Am. J. Dis. Child.**, **84**:218–22, 1952.
- STOLER, M.H.; BONFIGLIO, T.A.; STEIGBIGEL, R.T.; PEREIRA, M. – An atypical subcutaneous infection associated with acquired immune deficiency syndrome. **Am. J. Clin. Pathol.**, **80**:714–8, 1983.
- SZANIAWSKI, W.K.; DON, P.C.; BITTERMAN, S.R.; SCHACHNER, J.R. – Epithelioid angiomatosis in patients with Aids. **J. Am. Acad. Dermatol.**, **23**:41–8, 1990.
- TAPPERO, J.W.; KOEHLER, J.E. – Cat-scratch disease and bacillary angiomatosis. **J. Am. Med. Assoc.**, **266**:1938–9, 1991. [Letter]
- TAPPERO, J.W. ; KOEHLER, J.E.; BERGER, T.G.; COCKERRELL, C.J.; LEE, T.H.; BUSCH, M.P.; STITES, D.P.; MOHELE-BOETANI, J.; REINGOLD, A.L.; LEBOIT, P.E. – Bacillary angiomatosis splenitis in immunocompetent adults. **Annals Intern. Med.**, **118**:363–5, 1993b.
- TAPPERO, J.W.; MOHLE-BOETANI, J.; KOEHLER, J.E.; SWAMINATHAN, B.; BERGER, T.G.; LEBOIT, P.E.; SMITH, L.L.; WENGER, J.D.; PINNER, R.W.; KEMPER, C.A.; REINGOLD, A.L. – The epidemiology of bacillary angiomatosis and bacillary peliosis. **J. Am. Med. Assoc.**, **269**:770–5, 1993a.
- TOMPKINS, L.S. – *Rochalimaea* infections: are they zoonoses? **J. Am. Med. Assoc.**, **271**:553–4, 1994.
- TÖRÖK, L.; VIRÁGH, S.Z.; BORKA, I.; TÁPAI, M. – Bacillary angiomatosis in a patient with lymphocytic leukaemia. **Brit. J. Dermatol.**, **130**:665–8, 1994.



- TSUKAHARA, M.; TSUNEOKA, H.; IINO, H.; OHNO, K.; MURANO, I. – *Bartonella henselae* infection from a dog. **Lancet**, **352**:1682, 1998.
- UENO, H.; HOHDATSU, T.; MURUMATSU, Y.; KOYAMA, H.; MORITA, C. – Does coinfection of *Bartonella henselae* and FIV induce clinical disorders in cats? **Microbiol. Immun.**, **40**:617–20, 1996.
- UENO, H.; MURAMATSU, Y.; CHOMEL, B.B.; HOHDATSU, T.; KOYAMA, H.; MORITA, C. – Seroepidemiological survey of *Bartonella (Rochalimae) henselae* in domestic cats in Japan. **Microbiol. Immun.**, **39**:339–41, 1995.
- VELHO, P.E.N.F.; MORAES, A.M.; CINTRA, M.L.; GIGLIOLI, R.; GONÇALVES, S.A.; SHLESSARENKO, N.; CAMARGO, M.E. – Bacillary angiomatosis: negative results using normal Balb/c and Balb/c nude mice. **Brazil. J. Infect. Dis.**, **2**:300–3, 1998.
- VINSON, J.W.; VARELA, G.; MOLINA–PASQUEL, C. – Induction of clinical disease in volunteers inoculated with *Rickettsia quintana* propagated on blood agar. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **18**:713–22, 1969.
- WALKER, D.H.; HARRISON, A.; HENDERSON, F.; MURPHY, F.A. – Identification of *Rickettsia rickettsii* in a Guinea pig model by immunofluorescent and electron microscopic techniques. **Am. J. Pathol.**, **86**:343–58, 1977.
- WALKER, D.H.; POPOV, V.L.; WEN, J.; FENG, H. – *Rickettsia conorii* infection of C3H/HeN mice: a model of endothelial–target rickettsiosis. **Lab. Inv.**, **70**:358–68, 1994.
- WALKER, D.H.; BARBOUR, A.G.; OLIVER, J.H.; LANE, R.S.; DUMLER, S.; DENNIS, D.T.; PERSING, D.H.; AZAD, A.F.; MCSWEEGAN, E. – Emerging bacterial zoonotic and vector-borne diseases. **J. Am. Med. Assoc.**, **275**:463–9, 1996.
- WARWICK, W.J. – The cat-scratch syndrome, many diseases or one disease? **Progr. Med. Virol.**, **9**:256–301, 1967.

- WEAR, D.J.; MALATY, R.H.; ZIMMERMAN, L.E.; HADIFIELD, T.E.; MARGILETH, A.M. – Cat–scratch disease bacilli in the conjunctiva of patients with Parinaud's oculo–glandular syndrome. **Ophthalmol.**, **92**:1282–7, 1985.
- WEAR, D.J.; MARGILETH, A.M.; HADFIELD, T.L.; FISCHER, G.W.; SCHLAGEL, C.J.; KING, F.M. – Cat scratch disease: a bacterial infection. **Science**, **221**:1403–5, 1983.
- WELCH, D.F.; CARROLL, K.C.; HOFMEISTER, E.K.; PERSING, D.H.; ROBISON, D.A.; STEIGERWALT, A.G.; BRENNER, D.J. – Isolation of a new subspecies, *Bartonella vinsonii* subsp. arupensis, from a cattle rancher: identity with isolates found in conjunction with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* among naturally infected mice. **J. Clin. Microbiol.**, **37**:2598–601, 1999.
- WELCH, D.F.; HENSEL, D.M.; PICKETT, D.A.; SAN JOAQUIN, V.H.; ROBISON, A.; SLATER, L.N. – Bacteremia due to *Rochalimae henselae* in a child: practical identification of isolates in the clinical laboratory. **J. Clin. Microbiol.**, **31**:2381–6, 1993.
- WELCH, D.F.; PICKETT, D.A.; SLATER, L.N.; STEIGERWALT, A.G.; BRENNER, D.J. – *Rochalimaea henselae* sp. nov., a cause of septicemia, bacillary angiomatosis, and parenchymal bacillary peliosis. **J. Clin. Microbiol.**, **30**:275–80, 1992.
- WONG, M.T.; THORNTON, D.C.; KENNEDY, R.C.; DOLAN, M.J.A. – A chemically defined liquid medium that supports primary isolation of *Rochalimaea (Bartonella) henselae* from blood and tissue specimens. **J. Clin. Microbiol.**, **33**:742–4, 1995.
- YAMAMOTO, K.; CHOMEL, B.B.; KASTEN, R.W.; CHANG, C.C.; TSEGGAI, T.; DECKER, P.R.; MACKOWIAK, M.; FLOYD–HAWKINS, K.A.; PEDERSEN, N.C. – Homologous protection but lack of heterologous–protection by various species and types of *Bartonella* in specific pathogen–free cats. **Vet. Immun. Immunopathol.**, **65**:191–204, 1998.

- YOUSIF, A.; FARID, I.; BAIG, B.; CREEK, J.; OLSON, P.; WALLACE, M. – Prevalence of *Bartonella henselae* antibodies among human immunodeficiency virus – infected patients from Bahrain. **Clin. Infect. Dis.**, **23**:398–9, 1996.
- YU, X.; RAOULT, D. – Monoclonal antibodies to *Afipia felis* – a putative agent of cat scratch disease. **Am. J. Clin. Pathol.**, **101**:603–6, 1994.
- ZANGWILL, K.N.; HAMILTON, D.H.; PERKINS, B.A.; REGNERY, R.L.; PLIKAYTIS, B.D.; HADLER, J.L.; CAETTER, M.L.; WENGER, J.D. – Cat scratch disease in Connecticut. **N. Engl. J. Med.**, **329**:8–13, 1993.
- ZANUTTO, M.S. – Estudo da infecção dos felinos domésticos (*Felis domesticus* – Linnaeus, 1758) por *Bartonella henselae* através do isolamento e da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em sangue. São Paulo, 2000. [Tese – Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo].
- ZINNER, S.H. – Changing epidemiology of infections in patients with neutropenia and cancer emphasis on gram-positive and resistant bacteria. **Clin. Infect. Dis.**, **29**:490–4, 1999.



*APÊNDICES*

**O apêndice contém os resumos das referências bibliográficas disponíveis no banco de dados.**

**[www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov) e está disponível apenas no CD**