



**MARINA ROVANI DRUMMOND**

**DETECÇÃO MICROBIOLÓGICA E MOLECULAR DA  
BACTEREMIA POR *Bartonella* spp. EM GATOS**

**CAMPINAS**

**2012**

i



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

MARINA ROVANI DRUMMOND

**DETECÇÃO MICROBIOLÓGICA E MOLECULAR DA BACTEREMIA POR  
*Bartonella* spp. EM GATOS**

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração em Clínica Médica.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA MARINA ROVANI DRUMMOND E ORIENTADA PELO PROF. DR. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO.

Assinatura do Orientador

-----

**CAMPINAS**

**2012**

iii

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

D844d Drummond, Marina Rovani, 1985-  
Detecção microbiológica e molecular da bacteremia  
por *Bartonella* spp. em gatos / Marina Rovani  
Drummond. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Bartonella. 2. Diagnóstico. 3. Bacteremia. 4.  
Gatos. 5. Reação em cadeia da polimerase. I. Velho,  
Paulo Eduardo Neves Ferreira, 1966-. II. Universidade  
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.  
III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Molecular and microbiological detection of *Bartonella* spp. bacteremia in cats.

**Palavras-chave em inglês:**

Bartonella

Diagnosis

Bacteremia

Cats

Polymerase chain reaction

**Área de concentração:** Clínica Médica

**Titulação:** Mestra em Clínica Médica

**Banca examinadora:**

Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho [Orientador]

Thelma Suely Okay

Maria Leticia Cintra

**Data da defesa:** 20-08-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Médica

---

## Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

**Marina Rovani Drummond**

---

---

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho

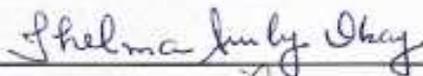
---

---

### Membros:

---

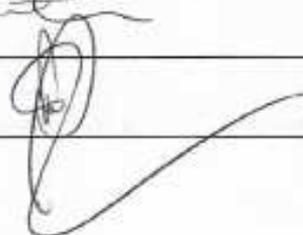
1. Profa. Dra. Thelma Suely Okay



2. Profa. Dra. Maria Leticia Cintra



3. Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho



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

---

Data: 20/08/2012

---

## **Dedicatória**

Ao meu Paixão Elias,

Sem a sua ajuda e compreensão esta dissertação não seria possível.

Obrigada por ser meu amor, melhor amigo e companheiro.

## **Agradecimentos**

A Deus, por ter me dado a oportunidade e capacidade de realizar este trabalho.

Ao meu querido marido Elias, por ter suportado todo este tempo de ausência e ter feito todo o possível para me apoiar e incentivar, sempre me animando com gordices!! Te amo muito!

Aos meus amados pais, pelo esforço que fizeram para me dar a melhor formação possível e pelo apoio, incentivo e tudo o que me ensinaram e me ensinam. Esta tese também é para vocês.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho: com toda a certeza aprendi com você muito mais do que está aqui registrado nesta tese. Seus conselhos, orientações e ações me ensinaram muito além das bartonelas. Aprendi a respeitar e valorizar ainda mais todas as pessoas com quem me relaciono. Obrigada pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e fazer parte da sua vida.

Ao Prof. Dr. Rovilson Gilioli: sem a sua disposição em ceder espaço, reagentes, equipamentos e o seu conhecimento, ou seja, tudo, a pesquisa com a bartonela não teria acontecido. Obrigada pelos conselhos, orientações, broncas, conversas e risadas. Obrigada por tudo!

A toda a equipe do CEMIB: Daniele, Clarice, Josélia, Sílvio e Lenira. Vocês foram mais do que companheiros de laboratório. Com vocês aprendi sobre as técnicas, mas também muito sobre a vida. Obrigada por permitirem que eu usasse o espaço e os equipamentos, mais do que isso: que eu fizesse parte da equipe! Jamais me esquecerei dos momentos que passamos juntos.

À Dra. Hanako Nancy Momma, que prontamente se interessou pelo nosso projeto e se disponibilizou de forma voluntária a coletar todas as amostras. Sem sua boa vontade e interesse em nos ajudar não teríamos conseguido.

À Luiza e ao Bruno, por compartilharem a pesquisa, a bancada, as risadas e os estresses. Sempre é muito bom estar com vocês!

Ao Prof. Dr. Pedro Paulo Vissoto Diniz. Obrigada pelos *primers* desenhados, sintetizados e doados! Obrigada pelas orientações e ajuda na padronização das reações e por se esforçar para que a pesquisa sobre bartonelas cresça no Brasil. Também agradeço pelo empenho em me ajudar a trazer o meio BAPGM para o Brasil. Não foi fácil!!

À Profa. Diana Scorpio por ter apostado em nosso grupo de pesquisa e conseguido o *grant* da Universidade Johns Hopkins que acabou viabilizando a realização deste projeto.

À Profa. Dra. Thelma Suely Okay que no começo de tudo nos incentivou e apoiou. Obrigada pela ajuda e orientação na padronização das reações e por sempre estar disponível para nos atender.

Ao Prof. Dr. Gonçalo Amarante Pereira do Laboratório de Genética e Evolução da Unicamp, por permitir pelo intermédio do Dr. Welbe Oliveira Bragança, o uso de seus equipamentos e espaço, sempre que necessário. A cultura líquida aqui descrita só foi possível pela disponibilidade de ambos.

À Prof. Dra. Kátia Borgia Barbosa Pagnano e à Daiane que mantiveram as portas do Laboratório da Oncohemato do Hemocentro sempre abertas para mim. Obrigada por me socorrerem e me deixarem usar o Venta!!

À Marizete, do setor de Microbiologia da Patologia Clínica do HC, por sempre se disponibilizar em manter as culturas e por ser uma apaixonada pelas bartonelas. Obrigada pelo seu interesse e incentivo em ver a nossa pesquisa crescer! Obrigada pela sua amizade.

À Ângela, do setor de Parasitologia da Patologia Clínica do HC, por sempre estar atenta aos esfregaços e descobrir bartonelas que ninguém enxergaria! Obrigada por sempre nos atender e nos apoiar.

À Mônica, do Instituto Adolfo Lutz, por me ensinar como fazer e manter as culturas sólidas. Obrigada pela atenção e interesse em nos ajudar.

À Deyse pela análise estatística dos meus dados e por esclarecer todas as minhas dúvidas.

Às minhas amigas e companheiras de trabalho na Exactgene: Camila Dutra, Larissa, Camila Beraldo e Aída. O incentivo e as palavras de encorajamento no período de escrever esta tese foram essenciais. Não tenho palavras para agradecer a compreensão e a disponibilidade para me ouvir. Agradeço a Deus pela oportunidade de trabalhar com vocês!

Aos meus amigos do setor de Imunologia da Patologia Clínica do HC da Unicamp, especialmente a Mariusa, a Ana Cristina e a Walderez. O apoio e o incentivo na época das aulas e da qualificação foram essenciais para a conclusão da tese. Obrigada por toda a paciência ao me ensinar e por todos os conselhos. Certamente o que aprendi com toda a equipe ficará guardado para sempre. Saudades!

À minha amiga Lígia Ravagnani, por compartilhar a angústia e as dificuldades de fazer mestrado e trabalhar ao mesmo tempo. Só você realmente entende o que eu passei!! Obrigada pelo incentivo e ombro amigo.

Ao meu grupinho de discipulado, Giu, Ju, Nick, Ana e Luiza. Obrigada pelas orações, incentivo e a compreensão pelas diversas vezes que desmarquei nosso tão esperado encontro. Este é o resultado de tanta dedicação!

Aos meus amigos Dani e Lucas Tutui, por terem assumido parte das minhas funções no Ministério de Adolescentes (Insight!) para que eu pudesse me dedicar e finalizar a dissertação. Obrigada pela força e incentivo! Agradeço a Deus a amizade de vocês.

Ao Faepex (Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão) e ao *Center for Global Health* da Universidade Johns Hopkins, pelo apoio financeiro, fundamental para a realização deste trabalho.

“Pois Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

A Ele seja a glória para sempre! Amém.”

**Romanos 11.36**

## Resumo

Atualmente o gênero *Bartonella* compreende pelo menos 31 espécies e subespécies, sendo 15 delas conhecidamente patogênicas ao homem. Três espécies de *Bartonella* estão associadas ao maior número de manifestações clínicas em seres humanos. São elas: *Bartonella bacilliformis*, *Bartonella quintana* e *Bartonella henselae*. A *B. henselae* é a bactéria mais associada a doenças humanas e sua transmissão é muitas vezes relacionada ao trauma cutâneo causado pelo arranhão de gatos infectados. Em recente estudo, documentou-se que mais de dois por cento dos doadores de sangue da região de Campinas testados estavam bacterêmicos por *Bartonella* spp. e o contato com animais foi um fator de risco para a aquisição da infecção. Com o objetivo de avaliar a prevalência de bacteremia por *Bartonella* spp. e isolar uma cepa regional de *B. henselae*, e foram analisadas 112 amostras de sangue de gatos, sendo que destes, 84 (75%) eram não domiciliados. A partir do sangue total coletado durante o procedimento cirúrgico para castração, foi realizada extração de DNA, seguida de PCR *nested* que amplifica a região *FtsZ* e é específica para *B. henselae*. Este sangue também foi inoculado em meio líquido BAPGM (*Bartonella Alpha-Proteobacteria Growth liquid Medium*). Após dez dias de incubação, parte desta cultura líquida de enriquecimento foi semeada em meio sólido enriquecido com 30% de sangue de carneiro e parte analisada pela mesma PCR *nested* e por PCR simples específica para o gênero *Bartonella* e que amplifica a região ITS. As culturas sólidas foram incubadas por até 45 dias e as que apresentaram crescimento foram encaminhadas às duas diferentes reações de PCR já descritas. O DNA de *B. henselae* foi detectado em 86 (77%) das 112 amostras de sangue e em 56 (50%) das amostras da cultura de líquida de enriquecimento. No total, a bacteremia foi detectada em 90% (101/112) dos gatos deste estudo. Constatou-se maior prevalência entre gatos não domiciliados (95%, 80/84) quando comparada com a dos gatos de proprietários (75%, 21/28). A detecção da bacteremia por meio de PCR simples, específica para o gênero *Bartonella*, foi possível em 31 das 112 (28%) culturas líquidas de enriquecimento.

Dezesseis isolados foram obtidos da cultura sólida, sendo que 11 foram PCR positivos. As amostras foram sequenciadas e três destas colônias, que demonstraram 100% de homologia com a cepa de *B. henselae* Brazil- 1 na região ITS analisada, foram depositadas na Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz, sendo as primeiras do Brasil. A PCR *nested* espécie específica foi positiva em, pelo menos, uma amostra de todos os gatos em que a bacteremia foi detectada. Estes resultados mostram que a bacteremia causada por *Bartonella* spp. é muito frequente nos gatos de Campinas e sugerem que a prevalência da infecção por *Bartonella* spp. nos gatos e suas consequências para a saúde pública têm sido subestimadas. Métodos diagnósticos mais sensíveis precisam ser utilizados na investigação desta infecção.

## Abstract

Currently, Bartonella genus comprises at least 31 species and subspecies, 15 pathogenic to humans. Three species are associated with the largest number of clinical symptoms in human beings: *Bartonella bacilliformis*, *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae*. *B. henselae* is the one most frequently associated with human diseases. This specie is considered zoonotic and its transmission is usually related with infected cat scratches. In a recent study, bacteremia was detected in more than two percent of blood donors from Campinas area and contact with animals was documented as a risk factor for *Bartonella* spp. infection. In order to evaluate *Bartonella* spp. bacteremia prevalence in cats from Campinas and to isolate a *B. henselae* regional strain, we analyzed blood samples from 112 cats (75% stray cats). The whole blood that was collected during spay surgery was submitted to DNA extraction and tested with specie-specific *FtsZ* nested PCR for *B. henselae*. A pre-enrichment culture in liquid medium BAPGM (Bartonella Alpha-Proteobacteria Growth Liquid Medium) was also performed. After ten-day culture, an aliquot was seeded and incubated up to 45 days in a solid medium supplemented with 30% sheep blood and another aliquot was tested for two PCRs: specie-specific *FtsZ* nested PCR for *B. henselae* and Bartonella genus-specific ITS single tube PCR. Sample isolates obtained from solid cultures were also tested by the two different PCR reactions described above. *B. henselae* DNA was detected in 86 (77%) of 112 blood samples and 56 (50%) of pre-enrichment culture samples. In total, bacteremia was detected in 90% (101/112) cats. Higher bacteremia prevalence was detected in stray cats (95%, 80/84 cats) when compared to client-owned subjects (75%, 21/28 cats). When the genus-specific ITS single tube PCR was used, *Bartonella* spp. bacteremia was detected just in 31/112 (28%) of pre-enrichment culture. Sixteen Gram-negative isolates were obtained from solid medium culture and eleven of them were PCR positive. Some samples were sequenced and three of these isolates demonstrated a 100% homology with *B. henselae* Brazil-1 strain at analyzed ITS region. These isolates were the first samples of this strain to be deposited in

Brazil, at Adolfo Lutz Institute Culture Collection. The specie-specific *FtsZ* nested PCR was positive at least at one sample of bacteremic cats. Our results show that *Bartonella* sp. bacteremia prevalence among cats is very frequent in Campinas and suggest that the prevalence of *Bartonella* spp. infection among cats and its consequences for public health remains underestimated. More sensitive diagnostic methods must be used in the study of this infection.

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Epidemiologia brasileira de <i>Bartonella</i> spp. em gatos .....	35
Tabela 2. Epidemiologia de <i>Bartonella</i> spp. em gatos no mundo .....	36
Tabela 3. <i>Primers</i> usados na PCR <i>nested</i> .....	51
Tabela 4. <i>Primers</i> usados na PCR simples.....	53
Tabela 5. <i>Primers</i> usados na PCR controle .....	53
Tabela 6. Proporção da origem dos gatos do estudo .....	57
Tabela 7. Proporção da faixa etária dos gatos do estudo.....	57
Tabela 8. Resultados da PCR <i>nested</i> do DNA extraído do sangue total.....	58
Tabela 9. Resultados da PCR <i>nested</i> do DNA extraído da cultura líquida de enriquecimento .....	58
Tabela 10. Resultados da PCR simples do DNA extraído da cultura líquida de enriquecimento ..	58
Tabela 11. Resultado da PCR <i>nested</i> do DNA extraído dos isolados .....	59
Tabela 12. Resultado da PCR simples do DNA extraído das colônias isoladas.....	59
Tabela 13. Amostras de DNA PCR positivas para <i>Bartonella</i> spp. ....	60
Tabela 14. Resumo de todos os resultados positivos obtidos considerando a origem dos gatos	61
Tabela 15. Resumo de todos os resultados positivos obtidos considerando a faixa etária .....	61
Tabela 16. Limite teórico de detecção de cada método .....	65

## **Lista de Figuras**

<b>Figura 1. Fluxograma de manipulação das amostras .....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 2. Fluxograma do cálculo do limite de detecção das PCRs .....</b>	<b>50</b>

## **Lista de Quadros**

**Quadro 1. Espécies de *Bartonella* patogênicas ao homem e suas manifestações clínicas..... 24**

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
1.1 AS BARTONELAS .....	21
1.2 CARACTERÍSTICAS DA INFECÇÃO .....	25
1.3 EVASÃO DO SISTEMA IMUNE.....	27
1.4 TRANSMISSÃO.....	28
1.5 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS.....	29
1.5.1 Métodos diagnósticos imunológicos .....	30
1.5.2 Cultura .....	31
1.5.3 PCR.....	32
1.6 EPIDEMIOLOGIA .....	33
1.7 A BARTONELLA HENSELAE EM GATOS .....	34
2. JUSTIFICATIVA .....	37
<b>3. HIPÓTESES</b> .....	<b>39</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
4.1 GERAL.....	42
4.2 ESPECÍFICOS .....	42
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
5.1 COLETA DO SANGUE .....	45
5.2 PROCESSAMENTO DO SANGUE .....	45
5.3 CULTURA LÍQUIDA DE ENRIQUECIMENTO .....	45

5.4 CULTURA SÓLIDA .....	46
5.5 EXTRAÇÃO DO DNA A PARTIR DO SANGUE TOTAL.....	47
5.6 EXTRAÇÃO DO DNA A PARTIR DA CULTURA LÍQUIDA DE ENRIQUECIMENTO .....	48
5.7 EXTRAÇÃO DO DNA A PARTIR DE COLÔNIAS.....	49
5.8 AMPLIFICAÇÃO DO DNA .....	49
5.9 PCR NESTED.....	50
5.10 PCR SIMPLES .....	52
5.11 PCR CONTROLE .....	53
5.12 DETECÇÃO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO .....	54
5.13 SEQUENCIAMENTO.....	54
5.14 MEDIDAS PARA MINIMIZAR OS RISCOS DE “CONTAMINAÇÃO” DAS AMPLIFICAÇÕES.....	54
5.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	55
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>56</b>
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>71</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>79</b>
1. MEIO SÓLIDO DUCREY MODIFICADO .....	80
2. COLORAÇÃO DE GRAM .....	81

# ***1. Introdução***

## 1.1 As bartonelas

As bactérias do gênero *Bartonella* têm sido relacionadas a doenças descritas há centenas de anos (1). Apesar do esforço e dos avanços nas pesquisas nas últimas duas décadas, o conhecimento sobre a sua transmissão e patologia ainda é muito limitado (2).

O gênero *Bartonella* é composto de pequenas bactérias cocobacilares, gram-negativas, intracelulares facultativas, pertencentes ao subgrupo alpha-2 da classe Proteobacteria (3). Entre as características mais marcantes estão o crescimento fastidioso, a necessidade de meios enriquecidos com sangue e de atmosfera com 5% de gás carbônico (4-6). Também são conhecidas por infectarem eritrócitos, células endoteliais, células dendríticas e macrófagos, geralmente causando bacteremia persistente em seus hospedeiros (6, 7).

Atualmente o gênero *Bartonella* compreende pelo menos 31 espécies e subespécies, sendo 15 delas conhecidamente patogênicas ao homem. Além destas já bem caracterizadas, existem outras 14 espécies candidatas (2, 8-12). Três espécies de *Bartonella* estão associadas ao maior número de manifestações clínicas em seres humanos. São elas: *Bartonella bacilliformis*, *Bartonella quintana* e *Bartonella henselae* (13). A *B. henselae* é a bactéria mais frequentemente associada a doenças humanas (2, 14, 15).

A primeira espécie de *Bartonella* descrita foi a *B. bacilliformis* identificada pelo microbiologista argentino Alberto Barton que estudava uma doença endêmica no Peru, transmitida por um flebotomíneo (*Lutzomyia verrucarum*). A doença é bifásica: a fase aguda (febre de Oroya) que é caracterizada por uma bacteremia intraeritrocitária que frequentemente resulta em uma anemia hemolítica fatal (de 40 a 90% dos casos na era pré-antibiótico) e a fase crônica (verruga peruana) que consiste em tumores vasculares que se originam de células endoteliais colonizadas. Também é conhecida por doença de Carrión, em homenagem ao médico peruano Daniel Carrión, que em 1885 inoculou em si

mesmo material proveniente de uma lesão cutânea de verruga peruana e faleceu durante a fase aguda da infecção. Atingiu seu objetivo de comprovar que as duas fases eram causadas pelo mesmo agente (16, 17). A *B. bacilliformis* tem como hospedeiro reservatório os humanos e nunca foram relatadas infecções em animais (17).

Os humanos também são considerados o reservatório primário da *B. quintana* que é transmitida pelo piolho de corpo humano. Esta espécie foi identificada como o agente da febre quintana, a febre das trincheiras, pelo microbiologista brasileiro Enrique da Rocha Lima quando investigava o tifo para o governo alemão durante a Primeira Guerra Mundial (18). O agente causou grandes epidemias na Europa durante as Guerras Mundiais e reemergiu no final do século passado, descrita principalmente em pacientes sem-teto e alcoólatras crônicos. Esta doença é caracterizada pelo aparecimento de uma febre súbita acompanhada por uma bacteremia intraeritrocitária tipicamente de cinco dias de duração e recorrência (3-5 por ano) após períodos assintomáticos (2). Esta espécie também pode causar angiomatose bacilar, bacteremia crônica e endocardite (18, 19).

A *B. henselae* foi assim denominada em homenagem à microbiologista Diane Hensel que contribuiu para o seu isolamento inicial (14). É o agente causador da doença da arranhadura do gato (DAG) cuja transmissão é associada a arranhaduras de gatos infectados. Geralmente após três semanas da infecção há o aparecimento linfonodomegalia unilateral no linfonodo mais próximo da região da lesão. É causa comum de linfonodomegalia em crianças que também podem apresentar dor de cabeça, febre ou esplenomegalia. Em alguns casos, pode ocorrer manifestação ocular, como a síndrome de Parinaud, neurorretinite, encefalopatia ou osteomielite. Frequentemente a DAG é autolimitada e o tratamento com antibióticos é questionável. Além destas manifestações, a *B. henselae* também pode provocar angiomatose bacilar, endocardite, anemia, hepatoesplenomegalia, febre prolongada ou de origem desconhecida, sintomas neurológicos, lesões pseudotumorais etc. (15, 18, 20).

Os gatos são o reservatório primário para *B. henselae* sendo considerados os principais responsáveis pela transmissão aos humanos (20). Entre os gatos, o organismo é transmitido por pulgas (*Ctenocephalides felis*). Os cães também são relacionados como reservatórios e potenciais transmissores da infecção para os humanos (2). Em estudo realizado com doadores de sangue do Hemocentro, o contato com cães se mostrou estatisticamente significativo para apresentar bacteremia por *Bartonella* spp. (21).

Além da *B. henselae*, existem duas outras espécies consideradas zoonóticas e transmitidas aos humanos pelos gatos a *Bartonella clarridgeiae* e a *Bartonella koehlerae* (20, 22). A *B. clarridgeiae* foi isolada em 1995 a partir de um gato de um paciente HIV positivo. Existem relatos de que a infecção desta espécie em humanos possa causar pápulas no local da inoculação e febre além de DAG. Os gatos podem apresentar coinfeção de *B. henselae* e *B. clarridgeiae*. (15, 23, 24). A *B. koehlerae* foi descoberta em 1994 durante um estudo para avaliar a prevalência da bacteremia por *B. henselae* em gatos domésticos. O isolado foi obtido a partir de duas pulgas que infestavam gatos saudáveis do nordeste da Califórnia. As manifestações em humanos relacionados a esta espécie compreendem endocardite, fadiga, insônia, dores nas juntas, dores de cabeça, perda de memória, dores musculares, depressão, ansiedade e alucinações, entre outras (25-27).

Além destas espécies patogênicas ao homem, outras dez têm sido relacionadas a doenças em humanos. No quadro 1 é possível obter um panorama geral dos seus reservatórios, vetores e manifestações em humanos (2, 9, 10).

**Quadro 1. Espécies de *Bartonella* patogênicas ao homem e suas manifestações clínicas**

<i>Bartonella</i> spp.	Reservatório	Vetor	Manifestações em humanos
<i>B. bacilliformis</i>	Homem	<i>Lutzomia verrucarum</i>	Doença de Carrion (febre de Oroya e verruga peruana)
<i>B. quintana</i>	Homem	Piolho de corpo	Febre, angiomatose bacilar, bacteremia e endocardite
<i>B. henselae</i>	Gato	Pulga	DAG, linfonodomegalia, angiomatose bacilar e etc.
<i>B. clarridgeiae</i>	Gato	Pulga	DAG
<i>B. koehlerae</i>	Gato	Pulga	Endocardite, dores nas juntas, fadiga, ansiedade e etc.
<i>B. alsatica</i>	Coelho	Desconhecido	Endocardite e linfadenite
<i>B. elizabethae</i>	Rato	Desconhecido	Endocardite e neurorretinite
<i>B. grahamii</i>	Camundongo e ratazana	Pulgas de roedores	Neurorretinite
<i>B. rochalimae</i>	Raposa, guaxinim e coiote	Pulga	Bacteremia e febre
<i>B. tamiae</i>	Ratos (?)	Ácaros (?)	Bacteremia e febre
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i>	Camundongo	Carrapatos(?)	Bacteremia, febre e endocardite(?)
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	Cachorro	Carrapatos(?)	Endocardite
<i>B. washoensis</i>	Esquilo	Desconhecido	Miocardite e endocardite (?)
<i>B. melophagi</i>	Carneiro	Desconhecido	Tosse seca, fadiga, fraqueza
<i>Candidatus B. mayotimonensis</i>	Desconhecido	Desconhecido	Endocardite

Resumindo, a infecção por *Bartonella* spp. pode provocar grande diversidade de manifestações clínicas em humanos como febre de origem indeterminada e recorrente, indisposição, fadiga, insônia, perda da memória, alterações psiquiátricas como depressão e outras alterações do humor, linfadenopatia, esplenomegalia, angiomatose e peliose bacilar, endocardite, hepatite, osteomielites, encefalites, meningites, neurorretinites e outras (15, 22, 28, 29). Apesar da variedade dos sintomas, pode haver bacteremia assintomática como ocorre em doadores infectados por *B. henselae* (30).

A diversidade das manifestações clínicas observada nas infecções por *Bartonella* ssp. está relacionada a vários fatores como a variedade de espécies e cepas, o que leva a diferenças na sua patogenicidade. A peliose bacilar hepática, por exemplo, é expressão da infecção por *B. henselae* e não da *B. quintana* (17, 31). A resposta imunológica do paciente também pode influenciar na clínica: pacientes imunocompetentes fazem mais reação granulomatosa e pacientes imunodeficientes parecem fazer mais angioproliferação, quando infectados pela *B. henselae* (14, 20, 32). O

desenvolvimento de quadros clínicos mais ou menos graves e a diferença de virulência entre as cepas estão relacionados à existência de diversos genótipos (33, 34).

## 1.2 Características da infecção

As *Bartonella* spp. geralmente causam, como marca da infecção, uma bacteremia persistente, assintomática ou subclínica, dependendo do nível de adaptação ao hospedeiro. Cada espécie de *Bartonella* spp. parece estar adaptada a um hospedeiro reservatório mamífero. O homem serve como reservatório natural para a *B. bacilliformis* e para a *B. quintana*. A *B. henselae* infecta naturalmente gatos. A estratégia de infecção hemotrópica provavelmente é uma adaptação específica à transmissão por artrópodes hematófagos e parece ser compartilhada por várias espécies do gênero (6, 35).

Além dos eritrócitos, as células endoteliais representam outro alvo das *Bartonella* spp. em seus hospedeiros mamíferos. Estas células parecem estar mais susceptíveis à invasão por espécies diferentes das específicas ao seu hospedeiro principal, causando manifestações clínicas diversas. Um exemplo é a infecção humana por *B. henselae* típica de gatos. Em humanos ela pode levar a angiomatose bacilar, lesões onde as bactérias são encontradas em estreita associação com proliferação de células endoteliais além de outras várias manifestações clínicas, sendo que em gatos a infecção é usualmente subclínica (6, 35).

Diferentes modelos animais foram usados para estudar a estratégia do estabelecimento e do curso da infecção causada por *Bartonella* spp.. O mecanismo de invasão e da evolução da bacteremia é similar em todos os modelos, mas as informações mais detalhadas são provenientes da infecção causada por *Bartonella tribocorum* em ratos.

Logo após a inoculação intravenosa, a *Bartonella* parece não ser capaz de invadir os eritrócitos, desaparecendo rapidamente do sangue e permanecendo

indetectável por aproximadamente quatro dias. O local onde a bactéria se oculta é denominado nicho primário e sua real localização ainda permanece desconhecida. Algumas teorias apontam que as células endoteliais podem ser este nicho, levando em consideração o tropismo das *Bartonella* spp. por estas células e a proximidade com a corrente sanguínea (29). Existem também outras teorias que sugerem as células dendríticas, por serem migratórias e assim facilitarem o transporte a partir do sítio de inoculação (6, 15).

Após cinco dias da inoculação, grandes quantidades de bactéria são liberadas do nicho primário para a corrente sanguínea. Este ciclo de liberação ocorre em intervalos de aproximadamente cinco dias, provavelmente como resultado da reinfeção pela bactéria liberada a cada ciclo. Assim que as bactérias entram em circulação já estão habilitadas a aderir aos eritrócitos maduros indicando que elas se tornaram competentes a interagir com os eritrócitos apenas depois da colonização do nicho primário. Em seguida à adesão, as *Bartonella* spp. invadem os eritrócitos e replicam intracelularmente até atingir uma quantidade crítica que se mantém estável durante todo ciclo de vida do eritrócito. Curiosamente, o eritrócito invadido possui o mesmo tempo de vida do que os saudáveis (15). Esta natureza cíclica da bacteremia parece ser comum em infecções causadas por *Bartonella* spp. em seus hospedeiros reservatórios (6).

Em gatos a característica cíclica da infecção causada por *B. henselae* foi comprovada em experimento realizado por Abbot *et al.* (36) em que um gato infectado naturalmente foi testado por 24 meses. O nível de bacteremia decaiu ao longo dos primeiros cinco meses até se tornar indetectável. Após dois meses de testes negativos, a bacteremia foi novamente detectada e permaneceu positiva por mais dois meses. Este padrão cíclico com intervalos de dois meses se manteve até o final do experimento.

### 1.3 Evasão do sistema imune

A bacteremia persistente, a característica mais marcante do gênero *Bartonella*, é explicada pelos mecanismos de camuflagem e diminuição da resposta imune que sugerem uma adaptação específica ao seu hospedeiro reservatório (6, 15).

A própria localização intraeritrocitária de algumas espécies dificulta a resposta imune celular e humoral. Devido à falta das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) na superfície, os eritrócitos seriam incapazes de apresentar os antígenos dos seus invasores ao sistema imune. Desta forma, eles continuariam a realizar suas funções e seu tempo de vida parece ser o mesmo dos eritrócitos saudáveis. A única forma que o sistema imune possui para combater a infecção seria por meio da opsonização das bactérias que são periodicamente liberadas do nicho primário para a corrente sanguínea. Desta forma, elas seriam incapacitadas a se ligar aos eritrócitos, impedindo a invasão de novos e com o tempo e a morte natural dos invadidos, a infecção cessaria (6).

Também é possível que as *Bartonella* spp. suprimam diretamente muitos componentes do sistema imune do hospedeiro. Fagócitos e células dendríticas são sentinelas e a primeira barreira de defesa contra a infecção. Logo após a entrada no hospedeiro e na ausência de resposta imune adaptativa, espera-se que os receptores de reconhecimento padrão (PRRs) dos fagócitos profissionais reconheçam a *Bartonella* spp.. Este reconhecimento, no caso de bactérias gram-negativas, acontece nos lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana. O LPS é reconhecido pelo subgrupo *Toll-like* dos PRRs o que provoca a secreção de citocinas pró-inflamatórias e consequente recrutamento de outras células inflamatórias para o local de entrada do patógeno. O LPS das *Bartonella* spp. possui estrutura diferente que pode explicar a falha na ativação do receptor *Toll-like* e o sucesso em não provocar resposta inflamatória (6). A descoberta da *Bartonella* spp. como antagonista do receptor *Toll-like* gerou uma nova forma de

tratamento de doenças auto imunes, auto inflamatórias e inclusive de doenças infecciosas gerando até uma patente: “Use of *Bartonella quintana* derived lipopolysaccharide for the treatment of autoimmune, autoinflammatory or infectious diseases” (37). Esta propriedade tem sido avaliada como uma importante ferramenta terapêutica no tratamento de artrite reumatoide (38).

A evasão do sistema imune é ainda mais facilitada pela geração de variantes genéticas em populações clonais, além da grande diversidade de cepas e espécies já existentes que podem coinfetar o hospedeiro e contornar sua resposta imune. Esta variedade de antígenos ainda é agravada pela ausência ou falhas de proteção imunitária cruzada que torna difícil até o desenvolvimento de vacinas (16, 34, 35).

## 1.4 Transmissão

Muitos artrópodes flebotomíneos como o piolho de corpo humano (*Pediculus humanus humanus*, também conhecido como *Pediculus humanus corporis*), as pulgas de gato (*Ctenocephalides felis*) e a mosca (*Lutzomyia verrucarum*), já foram confirmados como vetores competentes na transmissão de diversas espécies de *Bartonella*. A grande diversidade destes ectoparasitas como vetores sugerem uma adaptação seletiva das espécies de *Bartonella* com o hospedeiro mamífero e o vetor (39). Os carrapatos também têm sido considerados como vetores de bactérias deste gênero (7, 40).

Cada espécie de *Bartonella* está relacionada a um vetor e um hospedeiro preferencial: lutzomia como vetor de *B. bacilliformis* em seres humanos, o piolho de corpo como vetor de *B. quintana* também em humanos, as pulgas como vetores de *B. henselae* em gatos etc.. Apesar desta associação, esta especificidade não é exclusiva uma vez que pode ocorrer a transmissão para hospedeiros acidentais (como a infecção de *B. henselae* em humanos, apesar de ser adaptada a gatos) (35).

A estratégia da *Bartonella* spp. de causar bacteremia intraeritrocitária prolongada em vários hospedeiros é provavelmente uma adaptação específica a esta estratégia de transmissão por artrópodes hematófagos (35). Contudo, é conhecido que a *B. bacilliformis* pode causar uma hemólise massiva dos eritrócitos colonizados causando uma anemia hemolítica, potencialmente fatal (6). Intensa anemia também já foi descrita em pacientes com infecção por *B. henselae* (41, 42).

O contato de um artrópode hematófago (uma pulga ou um mosquito, por exemplo) com um hospedeiro reservatório não infectado pode levar à transmissão da infecção pelo contato direto com o sangue ou por meio da inoculação pela picada. Apesar disso, o maior número de bactérias é encontrado nas fezes das pulgas. A inoculação das fezes infectadas deve acontecer, na maioria das vezes, por ferimentos cutâneos causados por arranhões na pele (6).

Alguns autores acreditam que o principal modo de transmissão de *B. henselae* para humanos seria por meio de trauma cutâneo causado principalmente pelo arranhão de um gato (20, 22). Outras formas de transmissão têm sido relacionadas às infecções por *Bartonella* como transplante de órgãos sólidos, transfusão sanguínea e transmissão vertical (28, 43-45).

## **1.5 Métodos diagnósticos**

Não existe um diagnóstico laboratorial padrão para as infecções causadas por *Bartonella* spp.. Hoje é evidente que várias técnicas precisam ser utilizadas concomitantemente para evitar resultados falso-negativos (46). O diagnóstico laboratorial é baseado principalmente em sorologia por imunofluorescência indireta (IFA), ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), *Western blot*, cultura ou PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (16, 17, 47).

### 1.5.1 Métodos diagnósticos imunológicos

Os métodos imunológicos (IFA, ELISA e *Western blot*) utilizam diversos antígenos e procedimentos para o mesmo tipo de teste. Estas variáveis podem influenciar os resultados finais. No caso da IFA, é necessário considerar que os anticorpos IgG contra *Bartonella* spp. podem ser negativos no início da manifestação da doença e também no final, já que os títulos começam a diminuir. É justamente neste momento que geralmente os testes são realizados. Muitos estudos demonstraram que a diferenciação sorológica entre *B. henselae* e *B. quintana* pela IFA é impossível: a reação cruzada entre estas espécies é muito alta chegando a 95%. Também é necessário levar em consideração as condições da cultura da cepa utilizada como antígeno já que pode haver uma modificação da expressão dos antígenos de superfície.

Outros fatores a serem seriamente analisados e considerados são: a heterogeneidade entre as cepas e genótipos de *Bartonella* spp., as diferenças de parâmetros de análise entre laboratórios e a subjetividade das leituras dos resultados de IFA, a reação cruzada com diversos patógenos, já descrita em vários trabalhos, o que acarretaria falsos-positivos (por exemplo na IFA para IgM que apresentou 80% de reatividade com o vírus Epstein-Barr), além da baixa sensibilidade dos testes de IgM, também relacionados aos diferentes genótipos distribuídos regionalmente (47, 48).

Os resultados de altos índices de reatividade cruzada entre *B. henselae* e *B. quintana* também são relatados em ensaios de ELISA (48). Para este método existe uma reatividade cruzada com soros com altos títulos de anticorpo para uma gama de outros patógenos que inclui *Afipia felis*, outro agente da DAG. Alguns trabalhos sugerem que o ELISA é mais sensível do que a IFA, embora outros contradigam e concluam que para IgG o teste não seja sensível o bastante no diagnóstico de DAG (14, 48).

Existe uma variação considerável da resposta humoral para proteínas de *B. henselae* em humanos. Testes de soros com altos títulos obtidos por IFA não

necessariamente apresentam maior número de bandas ou bandas mais fortes no *Western blot* quando comparados com soros de baixo título. Isto sugere que IFA é mais eficiente do que o *Western blot* para determinar o título de IgG. Além disso, alguns estudos apontam grande reatividade cruzada do soro de pacientes sofrendo de outras infecções bacterianas podendo acarretar equívocos na leitura do resultado (48).

Assim, fica claro que o teste sorológico não pode ser utilizado como única ferramenta diagnóstica. Ele deve ser utilizado em conjunto com outras técnicas como cultura e PCR. É importante ressaltar que os anticorpos IgG permanecem por períodos prolongados em gatos experimentalmente infectados e que, em humanos, a prevalência de anticorpos contra *Bartonella* spp. varia de acordo com a idade dos indivíduos investigados (adultos possuem maiores taxas de prevalência do que crianças) (48, 49). Além disso, para uma clara interpretação da soroprevalência de uma área geográfica em particular, a utilização de antígenos regionais deve ser considerada (48).

### **1.5.2 Cultura**

A cultura líquida de *Bartonella* spp. se faz necessária para aumentar a sensibilidade de detecção da bacteremia por métodos moleculares e é um dos métodos diagnósticos mais utilizados ao redor no mundo (50-52). O sangue coletado assepticamente em tubo contendo EDTA e congelado antes da cultura torna o método mais sensível do que quando comparado com tubos de lise-centrifugação (16). O isolamento da maioria das espécies de *Bartonella* em placas de ágar sangue requer um extenso período de incubação (de 6 a 8 semanas) a 35°C, em atmosfera saturada de água e contendo 5% de CO<sub>2</sub> (20, 49, 50). Raramente é possível o isolamento em hospedeiros não reservatórios e/ou imunocompetentes, assim como em humanos com DAG ou em cachorros com infecções causadas por *Bartonella* (20, 50, 51). O desenvolvimento de um novo meio de cultura líquido denominado BAPGM (*Bartonella Alpha-Proteobacteria Growth Medium*) que permite o crescimento de, pelo menos, sete espécies de *Bartonella*,

possibilitou a melhora deste método como diagnóstico. Este meio é utilizado como pré-enriquecimento e, combinado com diagnósticos moleculares, aumentou o sucesso e a sensibilidade da cultura tanto para diagnóstico em animais como em humanos (50, 53).

### 1.5.3 PCR

Assim como para os outros métodos diagnósticos, não existe um consenso sobre o melhor primer e condições a serem usadas na PCR. Vários artigos descrevem as regiões do gene 16S rRNA, a região intergênica (ITS) 16S-23S rRNA, o gene da citrato sintase, ou da riboflavina sintase, o gene *groEL*, o gene *FtsZ* ou o gene da subunidade beta da RNA polimerase como as mais eficientes e promissoras na detecção e diferenciação das diferentes espécies de *Bartonella* (54). Além do primer que determina a região a ser amplificada e, portanto, a sensibilidade da reação, o tipo de PCR escolhido também influencia no sucesso do diagnóstico. A PCR *nested* (PCR de dupla amplificação) pode aumentar muito a sensibilidade da detecção assim como a PCR em Tempo Real (PCR *Real time*) (16, 49, 52, 55). Apesar de todas estas considerações, a detecção da *Bartonella* spp. por PCR não prediz uma infecção ativa (49). A grande vantagem dos métodos diagnósticos moleculares é a rapidez do resultado quando comparado ao da cultura, além da possível identificação da espécie causadora da infecção. Apesar dos avanços da PCR, o aprimoramento dos métodos de cultura ainda é necessário para facilitar o isolamento ou o aumento da detecção de espécies de *Bartonella* no sangue de pacientes (50).

Como se pode notar, o diagnóstico laboratorial das infecções causadas por *Bartonella* spp. não é trivial. Não existe consenso ou protocolos unificados a serem seguidos e todas as técnicas apresentam vantagens e desvantagens, sendo que nenhum método substitui ou descarta o outro. Esta dificuldade, somada à grande diversidade de manifestações clínicas e ao fato de que infecções crônicas por *Bartonella* spp. podem levar a sintomas inespecíficos ou vagos, em animais de estimação ou em humanos, fazem com que haja a necessidade de se aprimorarem os métodos diagnósticos.

## 1.6 Epidemiologia

O gênero *Bartonella* está presente em todo o mundo, embora a doença não seja reportada em muitos países (56). Algumas espécies são endêmicas de determinadas áreas como a *B. bacilliformis* que é restrita à região dos Andes (Peru, Colômbia e Equador). Esta distribuição geográfica limitada de algumas espécies reflete a distribuição de seus hospedeiros e vetores. As espécies *B. quintana* e *B. henselae* estão distribuídas mundialmente porque possuem hospedeiros (humanos e gatos) e vetores (piolhos e pulgas) também com distribuição mundial (14, 56, 57).

Não existem dados suficientes para determinar a exata incidência ou prevalência da bacteremia causada por *Bartonella* spp. (56). Estima-se que, a cada ano, ocorram vinte e quatro mil casos de DAG nos Estados Unidos, o que resultaria em duas mil internações e que o custo estimado desta doença é de, aproximadamente, doze milhões de dólares (14, 58). A soroprevalência em humanos varia de 1,5 a 77,5%, sendo a menor taxa encontrada no Reino Unido e a maior na Peru (59). No Brasil, estudo realizado em 2001, com 437 indivíduos de 5 a 92 anos da cidade de Piau-MG, revelou soroprevalência de 13,7% e 12,8% para *B. henselae* e *B. quintana* respectivamente (60). Em trabalho realizado com doadores de sangue da região de Campinas-SP, observou-se mais de 2% positivos na PCR de cultura líquida (11/500) e soroprevalência de 27,2% (136/500) para *B. quintana* e 15,6% (78/500) para *B. henselae* (21). Outro trabalho, realizado com pacientes cardiopatas do Brasil e da Argentina e grupo controle brasileiro, mostrou positividade na PCR para *Bartonella* spp. de 40,5% (60/148) nos pacientes cardiopatas contra 1,8 % (1/56) do grupo controle (61) .

No homem, a *B. henselae* afeta, mais frequentemente, crianças e adultos jovens, mas muitos outros casos em adultos podem não ser diagnosticados. A exposição a gatos, geralmente jovens, é considerada regra sendo observada em 90% dos casos, enquanto que as arranhaduras são relacionadas a 60% das infecções (62). Mas, isto é

questionável. Estudo de soroprevalência realizado na Alemanha com 270 estudantes saudáveis não mostrou relação entre possuir gatos e ser positivo na IFA. Donos de gatos e indivíduos que nunca tiveram contato com gatos apresentaram 28,6% e 28,3% de positividade, respectivamente (63). A sazonalidade é diferente nos dois hemisférios: no sul, dezembro e janeiro são os meses mais frequentes, enquanto que, no norte, de setembro a fevereiro. (59) Esta variação sazonal pode estar relacionada com a aquisição de filhotes de gatos pelas famílias e o aumento das pulgas nestas épocas do ano (14).

### **1.7 A *Bartonella henselae* em gatos**

As taxas de bacteremia e de soroprevalência para a *B. henselae* são altas em gatos de regiões geográficas quentes e úmidas variando de 7-43% e 4-81%, respectivamente (13, 49). A transmissão entre os gatos ocorre principalmente por pulgas (*Ctenocephalides felis*) (13, 64). Os animais infectados naturalmente desenvolvem bacteremia recorrente, que podem persistir por mais de dois anos, e são tipicamente assintomáticos (13, 16, 24). Os gatos jovens, com menos de um ano, são mais susceptíveis à bacteremia embora a soroprevalência seja maior em gatos mais velhos (16, 22, 56). Gatos de rua geralmente são mais bacterêmicos que gatos de estimação (22).

Existem vários genótipos já caracterizados de *B. henselae*. Os dois mais conhecidos são a Houston-1 (tipo 1) e a Marseille (tipo II). A prevalência destes dois genótipos varia, consideravelmente, entre as populações de gatos de diferentes áreas. A *B. henselae* tipo Marseille é dominante nas populações do oeste dos Estados Unidos, oeste da Europa (França, Alemanha, Itália, Reino Unido) e na Austrália, enquanto que a tipo Houston-1 é dominante na Ásia (Japão e Filipinas). Entretanto, dentro de um dado país, a prevalência pode variar entre as populações de gatos. Em estudo realizado na França, o tipo Marseille foi o mais comum nos gatos de Nancy e de Paris, enquanto que o tipo Houston-1 foi o principal genótipo encontrado nos gatos de Lyon e Marseille (22). Há relatos de coinfeção entre as variantes de *B. henselae*, e mesmo entre *B. henselae* e *B.*

*clarridgeae* em felinos (65-67). A gravidade e a ocorrência de sinais clínicos em gatos variam de acordo com o tipo e a cepa de *Bartonella* que infecta o animal (16). Alguns estudos enfatizam o fato da *B. henselae* Houston-1 ser o tipo mais comumente identificado em casos de bartoneloses em humanos, mesmo em regiões onde o tipo II (Marseille) é predominante em gatos. Estes dados sugerem que as cepas do tipo Houston-I são mais virulentas para humanos (20, 22, 68, 69).

No Brasil existem poucos estudos para avaliar a prevalência de *Bartonella* spp. em gatos. Na tabela 1 há um resumo de todos os trabalhos publicados no país com os dados obtidos (70-73).

**Tabela 1. Epidemiologia brasileira de *Bartonella* spp. em gatos**

Ano do estudo	Estado	Origem	Espécie pesquisada	Prevalência Positivo / total (%)			Referência
				Cultura	IFA	PCR	
1996/1997	SP	D e ND	<i>B. henselae</i>	NT	32/200 (16)	NT	Loureiro & Hagiwara
2009	RS	ND	<i>Bartonella</i> spp.	NT	NT	8/47 (17)	Staggemeier <i>et al.</i>
2010	RJ	D	<i>B. henselae</i>	NT	9/37 (25)	36/37 (97)	Souza <i>et al.</i>
2010	RJ	D e ND	<i>B. henselae</i>	NT	19/40 (47)	17/40 (42)	Crissiuma <i>et al.</i>

D: Domiciliado  
ND: Não domiciliado

NT: Não Testado

Além dos poucos dados, nenhum estudo pesquisou bacteremia por meio de cultura. Os trabalhos com PCR realizaram os testes diretamente do DNA extraído do sangue e apresentam um número muito limitado de amostras.

Existem muitos estudos de prevalência da infecção por *Bartonella* spp. ao redor do mundo. Um estudo realizado na Itália utilizando PCR *nested* encontrou 83,5% dos gatos bacterêmicos (71/85). Na tabela 2, alguns trabalhos são relacionados (55, 74-84).

**Tabela 2. Epidemiologia de *Bartonella* spp. em gatos no mundo**

Ano	País	Origem	Bartonella pesquisada	Prevalência Positivo/total (%)			Referência
				Cultura	IFA	PCR	
1987/1990	Suíça	D e ND	<i>B. henselae</i>	NT	61/728 (8,3)	NT	Glaus <i>et al.</i>
1992/1994	Estados Unidos	D e ND	<i>B. henselae</i>	81/205 (39,5)	166/205 (81)	NT	Chomel <i>et al.</i>
1995	França	ND	<i>Bartonella</i> spp. <i>B. henselae</i> tipo I <i>B. henselae</i> tipo II <i>B. clarridgeiae</i>	50/94 (53) 17/94 (18) 18/94 (19) 15/94 (16)	NT	NT	Heller <i>et al.</i>
1995/1996	Indonésia	D e ND	<i>B. henselae</i> <i>B. clarridgeiae</i>	6/74 (8) 3/74 (4)	40/74 (54) NT	NT	Marston <i>et al.</i>
1997/1998	Estados Unidos	D	<i>B. henselae</i>	65/271 (24)	138/271 (51)	NT	Guptill <i>et al.</i>
1997	Filipinas	D e ND	<i>B. henselae</i> tipo I <i>B. clarridgeiae</i>	17/31 (55) 6/31 (19)	73/107 (68) 70/107 (65)	NT	Chomel <i>et al.</i>
1998	Dinamarca	D e ND	<i>B. henselae</i>	21/93 (22,6)	42/92 (45,6)	NT	Chomel <i>et al.</i>
2001/2003	Tailândia	ND	<i>B. henselae</i>	47/312 (15)	NT	NT	Inoue <i>et al.</i>
2002	França	D	<i>Bartonella</i> spp.	8/99 (8,1)	4/99 (4)	NT	Rolain <i>et al.</i>
2003/2006	Itália	D e ND	<i>B. henselae</i>	NT	NT	71/85 (83,5)	Pennisi <i>et al.</i>
2006	Estados Unidos	D	<i>B. henselae</i> <i>B. clarridgeiae</i>	52/298 (17) 4/298 (1)	19/298 (6,4)	NT	Sykes <i>et al.</i>
2008/2009	Taiwan	ND	<i>B. henselae</i>	21/103 (20,4)	NT	20/103 (19,4)*	Tsai <i>et al.</i>

D: Domiciliado  
 ND: Não domiciliado  
 NT: Não Testado \* Teste realizado diretamente do sangue

## ***2. Justificativa***

No Brasil, estudo epidemiológico para a *B. quintana* e para a *B. henselae*, em humanos saudáveis da região de Minas Gerais, evidenciou elevadas taxas de soroprevalência na população estudada (60). Em recente estudo, realizado com doadores de sangue da região de Campinas-SP, foi detectada a bacteremia em 2,2% (11/500) e soroprevalência de 15,6% e 27,2% para *B. henselae* e *B. quintana*, respectivamente (21).

Também no Brasil, nos estudos realizados em gatos, a soroprevalência para *B. henselae* variou de 25% a 47% (70, 72). Um dos trabalhos, realizado com 37 gatos domésticos do município de Vassouras-RJ, apresentou 97% dos gatos testados (36/37) positivos, quando realizada PCR simples, específica para *B. henselae* e *B. quintana* (73).

Deste modo, a *B. henselae* pode estar presente como agente zoonótico, de forma endêmica nos grupos de população que se expõem aos gatos. O risco é de especial importância nos pacientes imunodeficientes primários e secundários (principalmente imunodeficiência pela aids e pacientes pós-transplante), nos quais a história de contato com gatos é um antecedente importante diante de quadros infecciosos e/ou de febre de origem indeterminada (24, 85).

Diniz *et al.*, 2007, depositaram, sob o número de acesso DQ346666, a cepa *B. henselae* Brazil-1, sequenciada a partir de amostra de sangue de cão da região de Botucatu e que diferia das cepas até então presentes no *GenBank* (86). Sequência 100% homóloga foi encontrada em paciente de Minas Gerais atendido no Hospital das Clínicas da Unicamp (42). Estes dados sugerem haver, pelo menos, uma cepa brasileira da *B. henselae*.

Por meio do levantamento da prevalência da infecção por *B. henselae* nos gatos de Campinas seria possível avaliar o nível de exposição a estes agentes na cidade. A partir do isolamento de uma cepa regional seria possível desenvolver, em um futuro próximo, exames mais precisos para o diagnóstico desta infecção, uma vez que a grande diversidade genética presente no gênero pode gerar sorologias falso-negativas (16, 50).

## ***3. Hipótesis***

- Há alta prevalência de bacteremia por *B. henselae* nos gatos de Campinas.
- Há gatos infectados por *B. henselae* da cepa Brazil-1.
- A técnica PCR *nested* é mais sensível que a cultura e a PCR simples para detectar a bacteremia em felinos.

## ***4. Objetivos***

#### **4.1 Geral**

- Avaliar a prevalência de bacteremia por *Bartonella* spp. em gatos de Campinas, SP.

#### **4.2 Específicos**

- Isolar, por meio de cultura, uma cepa regional de *B. henselae*, a partir de amostras de sangue obtidas de gatos de Campinas.
- Avaliar a bacteremia por *B. henselae* por PCR *nested* do DNA extraído do sangue.
- Avaliar a bacteremia por *Bartonella* spp. por PCR de amplificação simples e dupla do DNA extraído de cultura líquida de enriquecimento e sólida.
- Comparar o DNA dos isolados e demais amostras obtidas na PCR de amplificação simples (gênero-específica) com a cepa já caracterizada Brazil-1 de *B. henselae*.
- Identificar o método mais sensível para detectar a bacteremia nos felinos.

## ***5. Materiais e métodos***

Amostras de sangue de 112 gatos de Campinas foram coletadas aleatoriamente no período de maio a setembro de 2009, durante procedimento cirúrgico de castração realizado pela veterinária Dra. Hanako Nancy Momma, voluntária da Associação Amigos dos Animais de Campinas, para onde os animais não domiciliados são encaminhados. Dados como estimativa da idade do gato, sexo e origem (domiciliado ou não domiciliado) foram registrados. Na figura 1 está o resumo, em forma de fluxograma, das análises realizadas em todas as amostras coletadas.

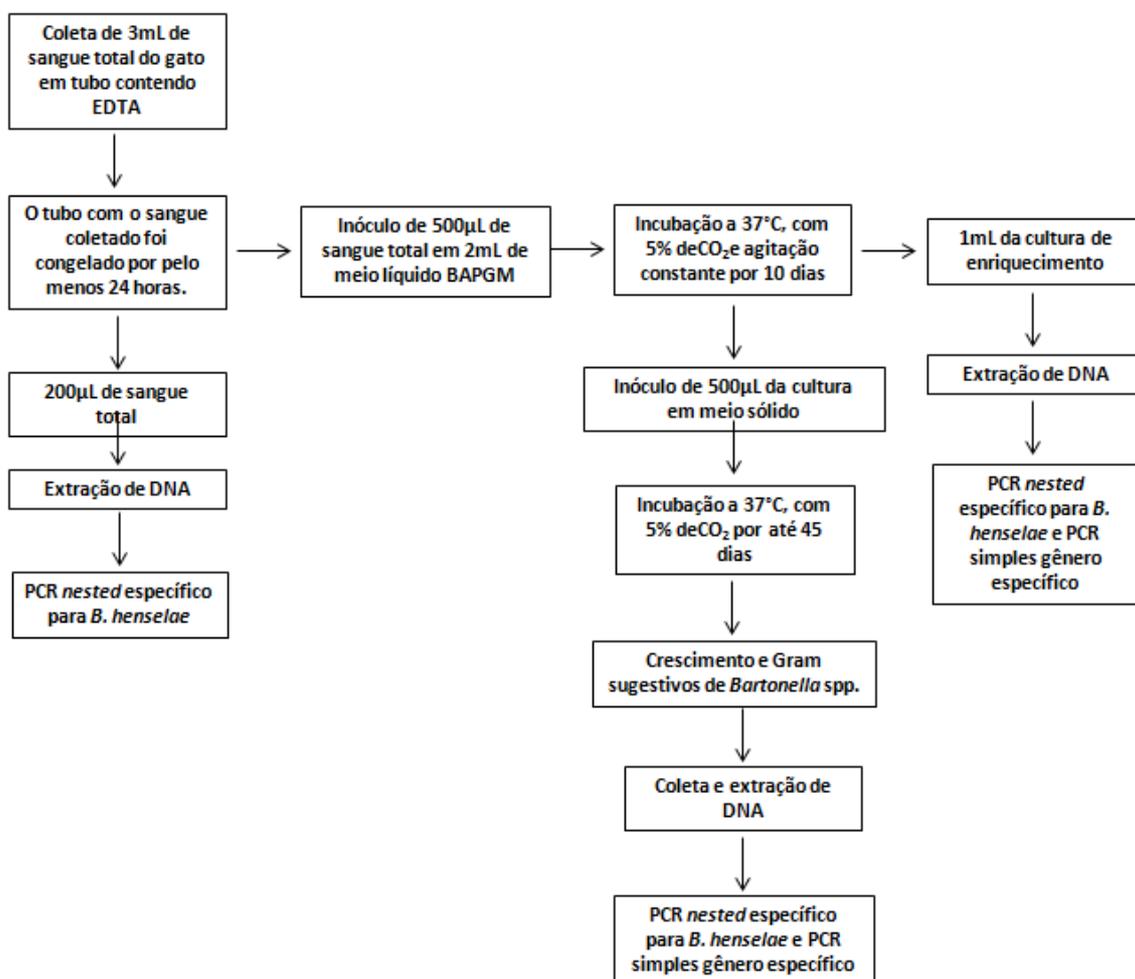


Figura 1. Fluxograma de manipulação das amostras

O projeto foi encaminhado à Comissão de Ética do Uso de Animais da Unicamp, de acordo com o protocolo número 2284-1, e foi aprovado por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### **5.1 Coleta do sangue**

A coleta de 3mL de sangue total da veia jugular foi realizada de forma asséptica durante a castração, sob anestesia, em tubo de 4mL, próprio para este fim, contendo EDTA como anticoagulante. Os gatos foram selecionados ao acaso.

### **5.2 Processamento do sangue**

Os tubos de EDTA contendo sangue foram congelados por pelo menos 24 horas, para a lise das hemácias, antes de serem encaminhadas à cultura ou extração, já que este método se mostrou o mais eficiente para a liberação das bactérias intracelulares (16).

### **5.3 Cultura líquida de enriquecimento**

A cultura líquida de enriquecimento foi realizada em meio líquido BAPGM.

Após o período de congelamento, 500µl do sangue total foi inoculado em 2mL de meio BAPGM. Esta etapa foi realizada em fluxo laminar, em ambiente estéril, evitando contaminações externas. Além disso, foram adicionados controles negativos de cultura a cada lote manipulado. Este controle consistia de uma alíquota do meio líquido utilizado nas amostras sanguíneas e que foi incubado nas mesmas condições e testado da mesma forma que as amostras.

Nesta etapa foram utilizadas garrafas de cultura de células de 60mL com tampa de filtro para permitir a aeração e o contato com o CO<sub>2</sub>.

As culturas foram mantidas em agitação constante em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 10 dias.

#### **5.4 Cultura sólida**

Após os 10 dias de incubação da cultura líquida, 500µL da suspensão da cultura líquida de enriquecimento foram semeados em meio sólido de Ducrey modificado, contendo 30% de sangue de carneiro. Este meio sólido foi feito em tubos de tampa de rosca para evitar o ressecamento, comum em placas de Petri, e permitir a entrada de CO<sub>2</sub>, uma vez que a tampa não era completamente rosqueada.

Os tubos de cultura foram mantidos a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, em atmosfera saturada de água, por até 45 dias. As avaliações para a verificação do crescimento foram realizadas semanalmente. Ao observar crescimento característico da bactéria estudada, uma colônia era coletada e corada pela coloração de Gram. Caso a morfologia fosse sugestiva do gênero (bactérias Gram-negativas e pequenas), o material era coletado para posterior análise.

Os protocolos do meio sólido de Ducrey modificado e da coloração de Gram encontram-se nos apêndices.

Antes da utilização do sangue de carneiro para a produção do meio de cultura, cada lote foi analisado para a presença de *Bartonella* spp. uma vez que já foi relatada a contaminação do sangue usado em laboratórios pela bactéria em estudo (87, 88). Desta forma, a possibilidade de uma cultura falso-positiva foi descartada.

## 5.5 Extração do DNA a partir do sangue total

A extração de DNA, a partir do sangue total, foi realizada com o *kit* comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen®), de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, foram adicionados 20µL “Qiagen Protease” no fundo de um microtubo com capacidade para 1,5mL e 200µL de sangue total. A este tubo também foram acrescentados 200µL de tampão de lise “AL” que foi agitado e incubado em banho-maria a 56°C, por dez minutos. Após uma breve centrifugação, para retirar as gotículas da parte interna da tampa (procedimento denominado “spin”) e evitar contaminação cruzada, adicionaram-se 200µL de etanol absoluto. Após uma breve agitação e novo *spin*, 600 µL da solução foram transferidos para a coluna do *kit* de extração, que foi centrifugada a 6.000x g por 1 minuto.

O filtrado foi desprezado e, em seguida, foram acrescentados 500µL da solução de lavagem “AW1”. A coluna foi novamente centrifugada a 6.000x g por 1 minuto e o filtrado desprezado. Após esta etapa, adicionou-se 500µL da solução de lavagem “AW2” e centrifugou-se a 20.000 x g por 3 minutos.

Finalmente, 200µL do tampão de eluição “AE” foram adicionados à coluna. Após a incubação por 5 minutos, à temperatura ambiente, e da centrifugação, por 1 minuto, a 6.000x g, o DNA eluído foi armazenado a -20°C até o momento de uso.

A cada extração realizada foram adicionados três controles:

- “branco de extração”: tubo onde todas as soluções da extração eram adicionadas, mas sem amostra inicial;
- “controle negativo”: amostra de sangue sabidamente negativa. Neste caso foram utilizadas alíquotas de sangue de carneiro previamente testadas e negativas;
- “controle positivo”: cepa padrão de *B. henselae* Houston (ATCC 49882) suspensa em sangue de carneiro.

## 5.6 Extração do DNA a partir da cultura líquida de enriquecimento

Após os 10 dias, 1mL da cultura líquida de enriquecimento foi aliqotado em tubos com capacidade para 1,5mL para a extração. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 5.000x g para concentrar as células na parte inferior do tubo. O sobrenadante foi desprezado. Aos *pellets* foram adicionados 160µL de tampão “ATL” e 20µL “Qiagen Protease” que, depois de homogeneizados, foram incubados em banho-maria a 56°C por pelo menos 3 horas.

Após uma breve centrifugação para retirar as gotículas da parte interna da tampa foram acrescidos 200µL de tampão de lise “AL”. Os tubos foram novamente homogeneizados e incubados em banho-maria a 70°C por 10 minutos. Depois de uma nova centrifugação, adicionaram-se 200µL de etanol absoluto. Após uma breve agitação e novo *spin*, 600µL da solução foram transferidos para a coluna do *kit* de extração, que foi centrifugada a 6.000x g por 1 minuto.

O filtrado foi desprezado e, em seguida, foram acrescidos 500µL da solução de lavagem “AW1”. A coluna foi novamente centrifugada a 6.000x g por 1 minuto e o filtrado desprezado. Após esta etapa, adicionou-se 500µL da solução de lavagem “AW2” e centrifugou-se a 20.000x g por 3 minutos.

Finalmente, 200µL do tampão de eluição “AE” foram adicionados à coluna. Após a incubação por 5 minutos, à temperatura ambiente, e da centrifugação por 1 minuto, a 6.000x g, o DNA eluído foi armazenado a -20°C até o momento de uso.

A cada extração realizada foram adicionados três controles:

- “branco de extração”: tubo onde todas as soluções da extração eram adicionadas, mas sem amostra inicial;
- “controle negativo”: meio líquido BAPGM sem inóculo e que foi incubado nas mesmas condições que as amostras;

- “controle positivo”: cepa padrão de *B. henselae* Houston (ATCC 49882) suspensa em meio líquido BAPGM.

## 5.7 Extração do DNA a partir de colônias

As colônias sugestivas de *Bartonella* spp. foram coletadas em tubos contendo 1mL meio BHI (Brain Heart Infusion) estéril. A extração foi realizada com o mesmo método das amostras da cultura líquida de enriquecimento.

A cada extração realizada, foram adicionados três controles:

- “branco de extração”: tubo onde todas as soluções da extração eram adicionadas, mas sem amostra inicial;
- “controle negativo”: meio BHI;
- “controle positivo”: cepa padrão de *B. henselae* Houston (ATCC 49882) suspensa em meio BHI.

## 5.8 Amplificação do DNA

Em todas as reações foram adicionados três controles: o negativo (amostra sabidamente negativa para aquela reação), o branco (apenas os reagentes de cada reação; ao invés do DNA, foi colocada a mesma água utilizada na preparação da reação) e um controle positivo (DNA extraído de cepa de *B. henselae*). Além destes controles, a cada reação foram testadas diluições de *B. henselae*, de modo a determinar a sensibilidade e o limite de detecção de cada reação. As diluições foram calculadas da seguinte maneira: a partir do número de pares de bases do genoma completo da *B. henselae* obtido através do *GenBank* foi possível calcular o peso molecular do seu genoma inteiro através de uma ferramenta matemática disponível no site [www.changbioscience.com/genetics/mw.html](http://www.changbioscience.com/genetics/mw.html). A cepa padrão de *B. henselae* foi extraída e quantificada por espectrofotometria (NanoDrop®). Através destes dois dados foi possível calcular o número de cópias por  $\mu\text{L}$

presente no DNA extraído da cepa padrão. Realizaram-se diluições seriadas que foram testadas em 10 reações de PCR. O menor número de cópias amplificado em todas as 10 reações foi utilizado como limite teórico (Figura 2).

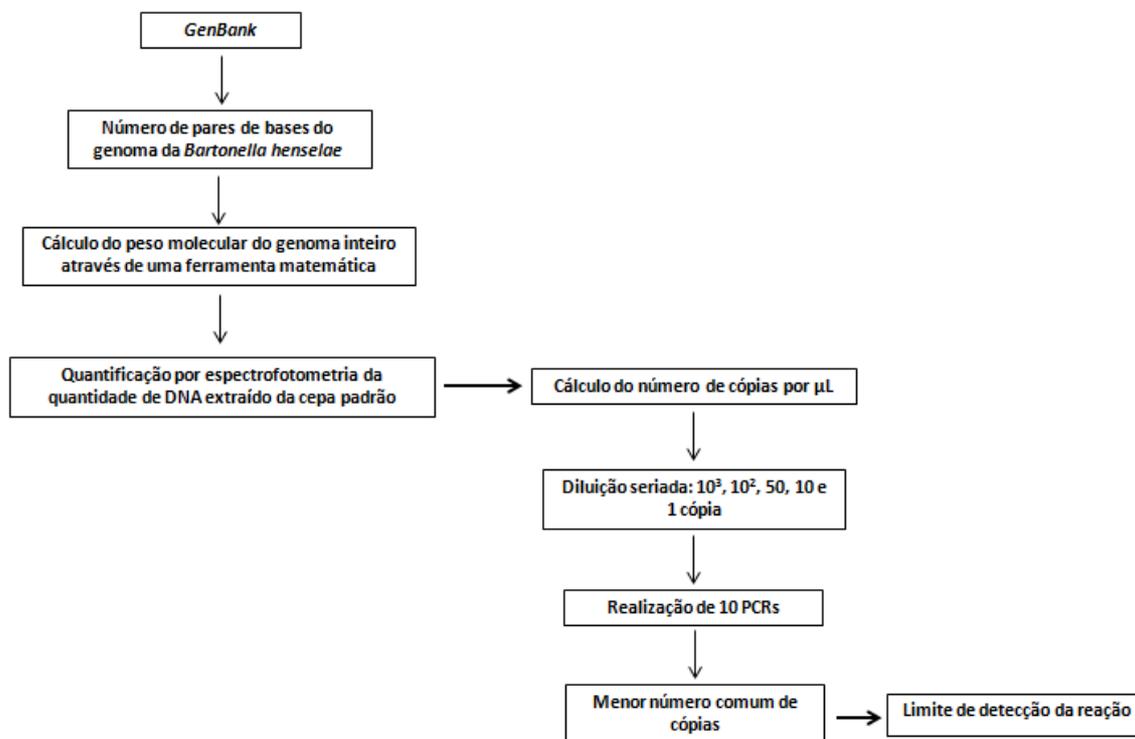


Figura 2. Fluxograma do cálculo do limite de detecção das PCRs

## 5.9 PCR *nested*

Todas as amostras que tiverem o DNA extraído foram testadas por PCR *nested* espécie-específica para a região alvo que codifica a proteína *FtsZ* que atua na divisão celular da bactéria. A primeira reação foi realizada com os *primers* BHF e BHR descritos por Kelly *et al.* (89), e na segunda reação foram utilizados os *primers* BHS e BHA descritos por Kawasato (90) cujas sequências então listadas na Tabela 3. Os *primers* da segunda

reação amplificam uma região interna do *amplicon* produzido da primeira, o que aumenta a sensibilidade da reação, como já descrito e documentado em outros trabalhos (16, 49, 55).

Na primeira reação foram utilizados microtubos de 0,2mL. Considerando o volume final da reação de 25µL, foram utilizados 2,5µL do DNA extraído; 200µM de dNTP; 0,4µM dos *primers*; 0,25uL da Taq DNA polimerase (LGC) 5U/µL; 2,5µl do Tampão [10x] (LGC); e 1,5mM do MgCl<sub>2</sub> (Cloreto de Magnésio) (LGC). A PCR foi realizada no termociclador GenePro da Bioer com o seguinte ciclo: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos divididos da seguinte forma: desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. A reação termina com 5 minutos de anelamento a 72°C. O fragmento amplificado nesta reação tem o tamanho de 354 pb. A segunda reação foi realizada utilizando os mesmos reagentes e concentrações da primeira, alterando apenas os *primers* e ao invés do DNA extraído, foi adicionado 1µL do produto da PCR proveniente da primeira reação. A PCR foi realizada no termociclador GenePro da Bioer com o seguinte ciclo: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos divididos da seguinte forma: desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. A reação termina com 5 minutos de anelamento a 72°C. O fragmento amplificado nesta reação tem o tamanho de 218 pb. O limite de detecção observado para esta PCR foi de dez cópias.

**Tabela 3. *Primers* usados na PCR *nested***

<b><i>Primers</i></b>	<b>Sequência 5' → 3'</b>
BHF	GCCGCAAAGTTCTTTTCATG
BHR	AGGTGAACGCGCTTGTATTTG
BHS	CAAACGGTTGGAGAGCAGT
BHA	CGCCTGTCATTCATCAAGA

## 5.10 PCR simples

As amostras de DNA extraído da cultura líquida e dos isolados obtidos da cultura sólida foram encaminhadas à PCR simples específica para amplificação da região ITS, ou a região intergênica 16S-23S do RNAr. Para os *primers* senso foi utilizada uma mistura de dois oligonucleotídeos com apenas uma base diferente. Isto foi feito para aumentar a sensibilidade, uma vez que nesta região há uma grande diversidade entre as espécies de *Bartonella*. Optou-se por utilizar uma mistura de dois *primers* ao invés de uma base degenerada que se pudesse ligar a 3 nucleotídeos diferentes para manter uma maior especificidade do *primer*. Estes *primers* foram desenhados pelo Prof. Dr. Pedro Paulo Vissoto de Paiva Diniz e cedidos para a realização deste projeto.

Não foi possível realizar a PCR simples para amostras de DNA extraídas diretamente do sangue de gatos. No começo do projeto, na padronização das reações, observou-se que havia a amplificação de várias bandas inespecíficas o que inviabilizou o teste diretamente do sangue. Ao realizar a cultura líquida, provavelmente houve a diluição do DNA do gato e assim o desaparecimento das bandas inespecíficas.

A reação foi realizada em microtubos de 0,2mL, considerando o volume final da reação de 25µL. Foram utilizados 5µL do DNA extraído; 200µM de dNTP; 0,4µM dos *primers*; 0,25uL da Taq DNA polimerase (LGC) 5U/µL; 2,5µl do tampão [10x] (LGC); e 2mM do MgCl<sub>2</sub> (Cloreto de Magnésio) (LGC). A PCR foi realizada no termociclador GenePro da Bioer com o seguinte ciclo: desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, seguido de 45 ciclos divididos da seguinte forma: desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 58°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 30 segundos. A reação termina com 5 minutos de anelamento a 72°C. O fragmento amplificado nesta reação tem o tamanho aproximado de 180 pb. As sequencias dos *primers* utilizados encontram-se na Tabela 4. O limite de detecção observado para esta PCR foi de cinquenta cópias.

**Tabela 4. Primers usados na PCR simples**

<b>Primers</b>	<b>Sequência 5' → 3'</b>
ITS 314-A-s	CGTTTCTCTTTCTTCMGATGATGATCCC
ITS 314-B-s	CGTTTCTCTTTCTTCRGATGATGATCCC
ITS 357as	GCGCTCTAACCAACTGAGC

### 5.11 PCR controle

As amostras que não apresentaram amplificação nas reações de diagnóstico foram encaminhadas a uma PCR para um gene constitutivo. A região escolhida foi um fragmento da GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), uma enzima relacionada com a glicólise e expressada por todas as células de mamíferos. A reação foi realizada em microtubos de 0,2mL, considerando o volume final da reação de 15µL. Foram utilizados 3µL do DNA extraído; 200µM de dNTP; 0,6µM dos *primers*; 0,3µL da Taq DNA polimerase (LGC); 5U/µL 1,5µL do tampão [10x] (LGC); e 2mM do MgCl<sub>2</sub> (Cloreto de Magnésio) (LGC). A PCR foi realizada no termociclador GenePro da Bioer com o seguinte ciclo: desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos divididos da seguinte forma: desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 57°C por 15 segundos e extensão a 72°C por 15 segundos. A reação termina com 2 minutos de anelamento a 72°C. O fragmento amplificado nesta reação tem o tamanho aproximado de 350 pb. As sequencias dos *primers* utilizados encontram-se na Tabela 5.

Esta reação teve como objetivo a verificação da qualidade do DNA extraído além da certificação da inexistência de inibidores de amplificação.

**Tabela 5. Primers usados na PCR controle**

<b>Primers</b>	<b>Sequência 5' → 3'</b>
GAPDH F	CCTTCATTGACCTCAACTACAT
GAPDH R	CCAAACTTGTCATGGATGACC

## **5.12 Detecção dos produtos de amplificação**

Os produtos amplificados foram analisados por meio de eletroforese horizontal em gel agarose a 1,5% preparado em tampão TAE (Tris – Ácido Acético Glacial e EDTA) [1X], corado com brometo de etídeo, a 100 V por 1 hora. Os amplificados foram visualizados e documentados em sistema de foto-documentação. As imagens foram arquivadas eletronicamente para posterior análise.

## **5.13 Sequenciamento**

Das 38 amostras positivas na PCR simples específica para *Bartonella* spp. provenientes de 33 diferentes animais, foi possível obter 22 com DNA de qualidade e com quantidade suficientes para serem sequenciados. Este procedimento foi realizado pela empresa Helixxa, tornando possível a comparação com a *B. henselae* cepa Brazil-1 já caracterizada. Destas 22 amostras de DNA, 6 eram de isolados e as demais da cultura líquida.

## **5.14 Medidas para minimizar os riscos de “contaminação” das amplificações**

O projeto foi desenvolvido nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Bartoneloses e no Cemib (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório) na Unicamp.

O laboratório possui toda a estrutura física necessária para a realização de diagnósticos moleculares de forma a diminuir os riscos de “contaminação”. Existem cinco áreas destinadas ao diagnóstico molecular. Para a PCR simples foram utilizadas quatro salas: uma para a extração, outra para o preparo da reação de PCR, a sala *Template* onde o DNA extraído é adicionado na reação de PCR e a sala pós-PCR, onde está localizado o termociclador e onde é realizada a eletroforese. Na PCR *nested*, o amplificado da primeira

reação era adicionado à segunda em uma quinta sala, utilizada apenas para este fim. Todo material descartável e equipamentos são específicos de cada sala e não são, em hipótese alguma, levados de um ambiente ao outro (aventais, luvas, micropipetas, ponteiras com barreira antiaerosol, estantes etc.). Em todos os testes são empregados uma série de controles negativos e há o controle de maneira bastante rigorosa no uso dos controles positivos. Além disso, todo material descartável é “DNAse e RNAse-free”, não há reaproveitamento de qualquer um deles, e os reagentes são divididos em alíquotas para evitar ciclos de congelamento e descongelamento.

### **5.15 Análise estatística**

Os resultados foram avaliados estatisticamente para obtenção da prevalência da infecção por *B. henselae* nos gatos estudados. A relação entre positivos nos três métodos (na PCR *nested* do DNA extraído diretamente do sangue, na PCR simples e na PCR *nested* da cultura líquida de enriquecimento), a idade do gato (maior ou menor de 1 ano) e a origem do animal (domiciliado ou não domiciliado) também foram testados. Como ferramenta de análise utilizou-se o programa Epi Info<sup>TM</sup>7. O risco das variáveis significantes foi avaliado por *Odds Ratio*. Foi também utilizado o teste de hipóteses para proporções e consideraram-se significantes valores de  $p < 0,05$ .

## ***6. Resultados***

Foram coletadas amostras de sangue de 112 gatos durante o procedimento de castração. Destes, 28 (25%) eram gatos de estimação (domiciliados) e os outros 84 (75%) provinham da rua (Cemitério, Lagoa do Taquaral e Bosque Nova Europa) ou estavam abandonados em frente a clínicas veterinárias e foram encaminhados à Associação dos Amigos dos Animais de Campinas (AAAC). Estes últimos foram denominados “não domiciliados” (Tabela 6).

**Tabela 6. Proporção da origem dos gatos do estudo**

<b>Origem do gato</b>	<b>Número de gatos</b>	<b>%</b>
<b>Domiciliado</b>	28	25
<b>Não domiciliado</b>	84	75
<b>Total</b>	112	100

Destes, 63,4% (71/112) tinham menos de um ano. A distribuição da faixa etária entre domiciliados e não domiciliados pode ser vista na tabela 7 e os resultados por faixa etária na tabela 15 à frente.

**Tabela 7. Proporção da faixa etária dos gatos do estudo**

	<b>Origem</b>					
	<b>Domiciliado</b>		<b>Não domiciliado</b>		<b>Total</b>	
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>&lt;1ano</b>	21	75	50	59,5	71	63,4
<b>≥ 1 ano</b>	6	21,4	29	34,5	35	31,3
<b>Não Informado</b>	1	3,6	5	6	6	5,4

Dentre as 86 amostras positivas na PCR *nested*, realizada do DNA extraído diretamente do sangue, 71 eram de gatos não domiciliados (Tabela 8).

**Tabela 8. Resultados da PCR *nested* do DNA extraído do sangue total**

	Origem					
	Domiciliado		Não domiciliado		Total	
	n	%	n	%	n	%
<b>Negativo</b>	13	46,4	13	15,5	26	23,2
<b>Positivo</b>	15	53,6	71	84,5	86	76,8

Após a cultura líquida de enriquecimento, as amostras de 45,5 % dos gatos (51 animais) foram positivas pela PCR *nested* e 31 (27,7%) pela PCR simples (Tabelas 9 e 10).

**Tabela 9. Resultados da PCR *nested* do DNA extraído da cultura líquida de enriquecimento**

	Origem					
	Domiciliado		Não domiciliado		Total	
	n	%	n	%	n	%
<b>Negativo</b>	10	35,7	51	39,3	61	54,5
<b>Positivo</b>	18	64,3	33	60,7	51	45,5

**Tabela 10. Resultados da PCR simples do DNA extraído da cultura líquida de enriquecimento**

	Origem					
	Domiciliado		Não domiciliado		Total	
	n	%	n	%	n	%
<b>Negativo</b>	17	60,7	64	76,2	81	72,3
<b>Positivo</b>	11	39,3	20	23,8	31	27,7

Foi possível isolar 16 colônias morfológicamente sugestivas de *Bartonella* sp.. Todas foram testadas pelas duas reações. Destas, sete foram positivas na PCR simples e 10 na PCR *nested*. Todas as amostras que foram positivas na cultura sólida já haviam sido positivas em, pelo menos, um dos testes anteriores (Tabela 11 e 12).

**Tabela 11. Resultado da PCR *nested* do DNA extraído dos isolados**

	Origem					
	Domiciliado		Não domiciliado		Total	
	n	%	n	%	n	%
<b>Negativo</b>	1	3,6	5	5,9	6	5,4
<b>Positivo</b>	3	10,7	7	8,3	10	8,9
<b>Sem Isolado</b>	24	85,7	72	85,8	96	85,7

**Tabela 12. Resultado da PCR simples do DNA extraído das colônias isoladas**

	Origem					
	Domiciliado		Não domiciliado		Total	
	n	%	n	%	n	%
<b>Negativo</b>	1	3,6	8	9,4	9	8
<b>Positivo</b>	3	10,7	4	4,8	7	6,25
<b>Sem Isolado</b>	24	85,7	72	85,8	96	85,7

Dos 16 isolados obtidos, 11 puderam ser confirmados como colônias de *Bartonella* spp., sete com PCR gênero-específica positiva e outras quatro apenas com PCR *nested* positiva.

Considerando os resultados das amplificações por amostras, e não por gatos, observa-se que foram realizadas, ao todo, 240 reações, das quais 185 foram positivas. O

maior número de reações positivas foi pela PCR *nested* específica para a *B. henselae*, como é possível notar na tabela abaixo (Tabela 13).

**Tabela 13. Amostras de DNA PCR positivas para *Bartonella* spp.**

Origem do DNA	Sangue	Cultura	
		Líquida de enriquecimento	Sólida
<b>Nº de Amostras</b>	112	112	16
<b>PCR <i>nested</i></b>	86	51	10
<b>PCR simples</b>	Não Testado	31	7

No total, considerando todas as amostras e reações, a bacteremia foi detectada em 101 gatos (90,2%). A visão geral de todos os resultados é apresentada na tabela 14.

Os onze gatos com resultados negativos, em todos os testes, tiveram as amostras testadas para o PCR controle que amplifica o gene constitutivo GAPDH. Todos amplificaram provando a qualidade do DNA extraído e a inexistência de inibidores de amplificação.

Das 38 amostras positivas na PCR simples, para a região ITS, provenientes de 33 gatos, 22 amostras de diferentes animais puderam ser sequenciadas. Destas, 16 apresentaram 100% de homologia quando comparadas à sequência nucleotídica de *B. henselae* cepa Brazil-1 da região ITS (número de acesso no *GenBank* DQ 346666.1) e também apresentaram grande homologia com a *B. henselae* cepa Houston-1 (número de acesso no *GenBank* BX 897699.1) variando de 96 a 100%.

Tabela 14. Resumo de todos os resultados positivos obtidos considerando a origem dos gatos

	Nº de gatos	Resultado positivo obtido em	Nº de amostras PCR positivas para <i>Bartonella</i> (%)				
			Sangue	Cultura de Líquida enriquecimento		Cultura Sólida	
			PCR <i>nested</i>	PCR <i>nested</i>	PCR simples	PCR <i>nested</i>	PCR simples
<b>Domiciliado</b>	28	21 (75)	15 (53,6)	18 (64)	11 (39,3)	3 (10,7)	3 (10,7)
<b>Não domiciliado</b>	84	80 (95)	71 (84,5)	33 (39)	20 (23,8)	7 (8,3)	4 (4,8)
<b>Total</b>	112	101 (90,2)	86 (77)	51 (45,5)	31 (27,7)	10 (9)	7 (6,25)

61

Tabela 15. Resumo de todos os resultados positivos obtidos considerando a faixa etária

	Nº de gatos	Resultado positivo obtido em pelo menos um dos testes (%)	Nº de amostras PCR positivas para <i>Bartonella</i> (%)				
			Sangue	Cultura de Líquida enriquecimento		Cultura Sólida	
			PCR <i>nested</i>	PCR <i>nested</i>	PCR simples	PCR <i>nested</i>	PCR simples
<b>&lt; 1 ano</b>	71	67 (94,4)	58 (81,7)	37 (52,1)	23 (32,4)	10	7
<b>≥ 1 ano</b>	35	30 (85,7)	25 (71,4)	10 (28,6)	7 (20)	-	-
<b>Não informado</b>	6	4 (66,7)	3 (50)	4 (66,7)	1 (16,7)	-	-
<b>Total</b>	112	101 (90,2)	86 (77)	51 (45,5)	31 (27,7)	10 (9)	7 (6,25)

## ***7. Discussão***

Existem muitos trabalhos de levantamento da soroprevalência de *Bartonella* spp. em gatos, mas poucos estudos avaliam bacteremia em curso e são mais raros aqueles que avaliam evolução temporal de bacteremia. No Brasil, os trabalhos publicados utilizaram uma amostragem pequena de animais. Considerando apenas os trabalhos que utilizaram PCR como método diagnóstico, a maior amostragem de animais foi de 47 gatos (71). Os três trabalhos que empregaram métodos moleculares testaram as amostras por PCR simples e não realizaram nenhum tipo de cultura (71-73).

Este estudo analisou 112 animais utilizando diversas técnicas metodológicas, como se faz necessário para o diagnóstico da infecção por *Bartonella* spp.: cultura líquida de enriquecimento, cultura sólida, PCR simples para o gênero *Bartonella* e PCR de dupla amplificação (*nested*) específica para *B. henselae*. Esta espécie é a mais associada a doenças em humanos e tem os gatos como seu hospedeiro e reservatório (2, 14, 15, 20).

Ao analisar os resultados obtidos a partir da origem dos gatos (domiciliado e não domiciliado) observa-se diferença significativa: 95% (80/84) dos gatos não domiciliados foram positivos em pelos menos um dos métodos diagnósticos. Já nos domiciliados foi 75% (21/28) ( $P < 0,01$ , Odds ratio: 6,7). Esta diferença pode estar associada ao fato dos gatos não domiciliados estarem mais sujeitos a infestação por pulgas e não se alimentarem tão bem quanto os domiciliados, fazendo com que o seu sistema imune não seja tão eficiente quanto o dos gatos de estimação.

Considerando os dados obtidos, apenas pela PCR *nested* realizada no DNA extraído diretamente do sangue, ou seja, sem cultura, 76,8% dos gatos testados foram positivos (86/112). Dos 26 gatos negativos, 15 apresentaram resultados positivos após a cultura líquida de enriquecimento, o que corresponde a 13,4% do total. A comparação estatística entre as três técnicas moleculares (PCR *nested* do DNA extraído do sangue, PCR *nested* e PCR simples do DNA extraído da cultura líquida de enriquecimento) indica que estes podem ser considerados diferentes entre si. O método que se mostrou

estatisticamente mais eficiente na detecção da bacteremia foi a PCR *nested* do DNA extraído do sangue, seguido pela PCR *nested* do DNA extraído após cultura líquida e, por fim, a PCR simples também do DNA extraído da cultura líquida de enriquecimento. Assim, no caso de diagnóstico de infecção por *B. henselae* rotineiro de gatos, o ideal seria analisar em primeiro lugar o sangue por PCR *nested* e, caso seja negativo, realizar as culturas para confirmação do resultado. Isso porque a cultura líquida de enriquecimento e sólida demandam muito tempo e os custos são elevados, se comparados aos da PCR de dupla amplificação.

A maior eficiência da PCR *nested* espécie específica, na detecção da bacteremia de *B. henselae* em gatos, pode ser explicada pelo fato de que este tipo de PCR é mais sensível que a PCR simples (16, 49, 55). Além da análise estatística, isto também foi observado nos testes aqui descritos já que a sensibilidade para a PCR *nested* foi de apenas 10 cópias, enquanto que na PCR simples eram necessárias 50 cópias para haver a amplificação. Estudo realizado por Pennisi *et al.* com 85 gatos também comprovou que o uso da dupla amplificação aumenta a sensibilidade de detecção da bacteremia causada pela *Bartonella* spp.. Nesse trabalho, foram testadas 3 amostras diferentes (sangue periférico, aspirado de linfonodo e *swab* bucal) de 85 gatos por PCR *nested* para região *Pap31*. No sangue periférico, 70,6% (60/85) foram positivas. No DNA extraído do aspirado do linfonodo, 72,9% (62/85) e do *swab* oral 60% (51/85). No total, 83,5% (71/85) das amostras foram positivas para *B. henselae* (55).

Contudo, por sua maior sensibilidade, o uso da PCR *nested*, quando comparada à PCR simples, aumenta também os riscos de contaminação. Neste estudo, todos os cuidados adotados e já descritos foram suficientes para evitarem contaminação. Isso foi comprovado pelos controles negativos e brancos, que permaneceram indetectáveis em todos os testes. Além destes controles, a grande diferença do número de positivos na PCR *nested* entre o DNA extraído do sangue total e o da cultura líquida de enriquecimento, confirma a impossibilidade dos amplificadores obtidos serem

contaminantes. Se assim fosse, haveria um grande número de positivos nos dois tipos de material, o que não foi observado (86 positivos no DNA extraído do sangue e 51 da cultura líquida de enriquecimento).

O menor número de positivos pela PCR *nested* realizada com o material extraído da cultura líquida de enriquecimento (51 amostras), quando comparado ao da realizada diretamente com o DNA extraído do sangue (86 amostras), pode indicar a amplificação de bactéria não cultivável. Isso porque existe o “efeito de diluição”, uma vez que a população de bactérias não aumentou e ainda foi diluída em um grande volume de meio de cultura, ficando, assim, abaixo do nível de detecção do teste (50). A tabela 15 hipotetiza a quantidade de cópias de DNA da bactéria necessária na amostra inicial de sangue e na cultura líquida, para atingir o limiar mínimo de detecção em cada PCR utilizada. Observando-a fica claro, inclusive, que mesmo todos os resultados negativos não afastam a possibilidade de uma bacteremia abaixo do limite de detecção das reações.

**Tabela 16. Limite teórico de detecção de cada método**

Cópias/mL na amostra inicial de sangue	Cultura Líquida de enriquecimento		Sangue
	PCR simples	PCR <i>nested</i>	PCR <i>nested</i>
abaixo de 4.000	-	-	-
de 4.000 a 9.999	-	-	+
de 10.000 a 24.999	-	+	+
acima de 25.000	+	+	+

"+": PCR positiva      "-": PCR negativa

Os números apresentados na tabela 16 correspondem à quantidade de cópias necessária para haver detecção por determinada reação (consequentemente, a quantidade de bactérias). Esse cálculo foi realizado a partir do limite de detecção de cada reação (10 cópias na PCR *nested* e 50 cópias na PCR simples), levando-se em consideração a quantidade de sangue utilizada para o diagnóstico, em cada método (200µL quando extraído diretamente do sangue e 500µL na cultura líquida de enriquecimento).

É importante lembrar a possibilidade de que a amostra inicial pudesse não apresentar a quantidade suficiente para ser detectada. Após a cultura, com o aumento da população, o limiar de detecção pode ter sido atingido. Isso aconteceu em 15 amostras (eram negativas na PCR *nested* do sangue, mas se tornaram detectáveis pelo mesmo método após a cultura líquida de enriquecimento). Em três destas 15 amostras, houve um grande aumento na quantidade de bactérias após a cultura, porque elas também foram positivas pela PCR simples que necessita de, pelo menos, 25.000 cópias para ser detectada.

O baixo número de isolados obtidos no trabalho (16, dos quais 11 comprovadamente colônias de *Bartonella* spp., das 101 amostras positivas) pode ser explicado pela característica fastidiosa e a exigência de meios extremamente enriquecidos para o isolamento de *Bartonella* spp.. Apesar de todo cuidado, a cultura prolongada (por até 45 dias) em meio enriquecido, propicia o crescimento de bactérias menos fastidiosas, que se disseminam por todo o substrato, impossibilitando o crescimento da *Bartonella* spp.. O ressecamento do meio de cultura que ocorre nestes casos, também dificulta o isolamento. Outro fator é a dificuldade em isolar a bactéria de animais assintomáticos, potencialmente menos virulentas, como é o caso do presente estudo. Apesar de toda esta dificuldade, dos 11 isolados obtidos no presente estudo que foram confirmados como colônias de *Bartonella* spp., três foram depositados na Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz, sendo os primeiros isolados brasileiros depositados em um banco de bactérias.

A diferença na prevalência de *Bartonella* spp. encontrada neste estudo, em relação à de outros realizados no Brasil, pode estar relacionada às diferenças nos métodos laboratoriais de diagnóstico. A cultura e a PCR *nested* aumentam a sensibilidade do teste e nenhum dos trabalhos empregou estes métodos. Outro fator a ser considerado é o fato de que 63,4% (71/112) dos gatos analisados tinham menos de um ano de idade. Estudos relatam que, enquanto a soroprevalência é mais alta em gatos mais velhos, a

bacteremia é maior em gatos mais novos (16, 49). De fato, estatisticamente, os gatos menores de um ano apresentaram maior probabilidade de serem bacterêmicos ( $p < 0,01$ ). Ao considerar apenas os resultados obtidos pela PCR simples a prevalência encontrada, que foi de 27,7%, é aproximada com a média de vários trabalhos publicados ao redor no mundo: 30,5% (cálculo realizado através dos dados publicado no artigo “Factors associated with the rapid emergence of zoonotic Bartonella infections”(20).

Dezesseis amostras, dentre as 22 sequenciadas, apresentaram 100% de homologia quando comparadas à sequência nucleotídica de *B. henselae* cepa Brazil-1 da região ITS, mas também apresentaram grande homologia com a *B. henselae* cepa Houston-1. Esta alta homologia com as duas cepas pode ser explicada pela grande similaridade das sequências na região analisada e também pelo tamanho pequeno do fragmento que, no sequenciamento, apresentava aproximadamente 110 pares de bases com boa qualidade. As outras cinco amostras apresentaram maior homologia com a *B. henselae* cepa Houston-1 variando de 96 a 100%. Não foi possível analisar todas as 38 amostras positivas porque várias apresentavam baixa concentração de DNA no produto amplificado. Dois trabalhos recentes de Maggi *et al.* relataram esta mesma dificuldade em sequenciar os amplificados de *Bartonella* spp. (46, 91). Novas análises serão necessárias para a precisa caracterização dos DNA obtidos, particularmente dos genes *RpoB* e *Pap31* que também apresentam diferenças entre a cepa Brazil-1 e Houston-1.

Embora a amostra obtida neste estudo não permita generalização para toda a população de gatos da cidade e tenha alta proporção de gatos não domiciliados e menores de um ano, comprovou-se a alta prevalência da infecção por *B. henselae* nos gatos da região de Campinas- SP, isto é, 90,2% (101/112) já que todos tiveram pelo menos uma PCR espécie-específica positiva. Por estes animais serem os principais reservatórios desta espécie de *Bartonella* e associados à transmissão de bartoneloses aos humanos, a alta prevalência indica um alto risco de exposição.

A prevalência da infecção por *Bartonella* spp. nos gatos e suas consequências para a saúde pública têm sido subestimadas. O espectro de doenças causadas por este gênero em humanos vem aumentando rapidamente (46). Estudo com 296 pacientes reumatológicos revelou a bacteremia em 41,1 %. Já em outro trabalho com 192 pacientes estudados, que apresentavam sintomas diversos como fadiga, dor nas juntas, dores musculares e artrite, entre outros, 23,9% eram bacterêmicos para a *Bartonella* spp. e todos relataram contato com animal (46, 91). Recente estudo mostrou que dois por cento dos doadores de sangue da região de Campinas foram diagnosticados como bacterêmicos e, na população testada, o contato com animais foi documentado como um fator de risco para a aquisição da infecção (21). Todos os doadores positivos eram bacterêmicos para a *B. henselae*, segundo o observado no sequenciamento e/ou na PCR espécie-específica.

Apesar disto, o tratamento de animais bacterêmicos assintomáticos não é indicado como medida preventiva, pois poderia induzir a uma resistência bacteriana (16, 17) e a erradicação da infecção não pode ser garantida, mesmo frente a um resultado negativo, considerando que a bacteremia é sabidamente cíclica nestes animais (6). Além disso, há a possibilidade de que a bacteremia tenha sido reduzida a níveis não detectáveis, abaixo da sensibilidade da técnica utilizada. A recomendação de vários órgãos americanos é que pacientes imunodeficientes, ao adquirirem um novo gato de estimação, devem: adotar gatos com mais de um ano de idade, com boa saúde e sem pulgas; evitar arranhões, e não permitir contato do gato com machucados (16).

Por fim, é importante ressaltar que a inexistência de um padrão ouro e a grande dificuldade em se detectar a bacteremia causada pela *Bartonella* spp., principalmente em hospedeiros imunocompetentes, reforçam a necessidade de se utilizar métodos diversos e complementares, visando aumentar a sensibilidade e a precisão do diagnóstico (46, 50, 92).

## ***8. Conclusão***

Houve uma alta prevalência de bacteremia causada por *B. henselae* nos gatos de Campinas-SP. A infecção é, aparentemente, causada, na maior parte, por *B. henselae* cepa Brazil-1.

Foi possível isolar colônias de *B. henselae* e três delas foram depositadas na Coleção de Bactérias do Instituto Adolfo Lutz, SP. Estes três isolados são 100% homólogos na região ITS à cepa Brazil-1, cuja sequência está depositada no *GenBank* (acesso DQ346666).

O uso de múltiplos testes para o diagnóstico de bartoneloses se faz necessário para diminuir as chances de resultados falsos negativos.

O teste de dupla amplificação (PCR *nested*), quando comparado com a cultura e a PCR simples, é o método mais sensível e rápido para detectar a bacteremia em felinos.

## ***9. Referências bibliográficas***

1. Schultz MG. A history of bartonellosis (Carrion's disease). *The American journal of tropical medicine and hygiene*. [Historical Article]. 1968 Jul;17(4):503-15.
2. Kaiser PO, Riess T, O'Rourke F, Linke D, Kempf VA. *Bartonella* spp.: throwing light on uncommon human infections. *International journal of medical microbiology : IJMM*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2011 Jan;301(1):7-15.
3. Rolain JM, Brouqui P, Koehler JE, Maguina C, Dolan MJ, Raoult D. Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. 2004 Jun;48(6):1921-33.
4. Lynch T, Iverson J, Kosoy M. Combining culture techniques for *Bartonella*: the best of both worlds. *Journal of clinical microbiology*. [Evaluation Studies Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Apr;49(4):1363-8.
5. Maggi RG, Harms CA, Hohn AA, Pabst DA, McLellan WA, Walton WJ, et al. *Bartonella henselae* in porpoise blood. *Emerging infectious diseases*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Dec;11(12):1894-8.
6. Pulliainen AT, Dehio C. Persistence of *Bartonella* spp. stealth pathogens: from subclinical infections to vasoproliferative tumor formation. *FEMS microbiology reviews* 2012 Jan 9.
7. Billeter SA, Levy MG, Chomel BB, Breitschwerdt EB. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Medical and veterinary entomology*. [Review]. 2008 Mar;22(1):1-15.
8. Kaewmongkol G, Kaewmongkol S, Owen H, Fleming PA, Adams PJ, Ryan U, et al. *Candidatus Bartonella antechini*: a novel *Bartonella* species detected in fleas and ticks from the yellow-footed antechinus (*Antechinus flavipes*), an Australian marsupial. *Veterinary microbiology* 2011 May 5;149(3-4):517-21.
9. Maggi RG, Kosoy M, Mintzer M, Breitschwerdt EB. Isolation of *Candidatus Bartonella melophagi* from human blood. *Emerging infectious diseases*. [Case Reports Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Jan;15(1):66-8.
10. Lin EY, Tsigrelis C, Baddour LM, Lepidi H, Rolain JM, Patel R, et al. *Candidatus Bartonella mayotimonensis* and endocarditis. *Emerging infectious diseases*. [Case Reports]. 2010 Mar;16(3):500-3.
11. Saisongkroh W, Wootta W, Sawanpanyalert P, Raoult D, Rolain JM. "*Candidatus Bartonella thailandensis*": a new genotype of *Bartonella* identified from rodents. *Veterinary microbiology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Oct 20;139(1-2):197-201.
12. Inoue K, Kabeya H, Shiratori H, Ueda K, Kosoy MY, Chomel BB, et al. *Bartonella japonica* sp. nov. and *Bartonella silvatica* sp. nov., isolated from *Apodemus* mice. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Apr;60(Pt 4):759-63.
13. Dehio C. Molecular and cellular basis of *bartonella* pathogenesis. *Annual review of microbiology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2004;58:365-90.
14. Anderson BE, Neuman MA. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clinical microbiology reviews*. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. 1997 Apr;10(2):203-19.
15. Harms A, Dehio C. Intruders below the radar: molecular pathogenesis of *Bartonella* spp. *Clinical microbiology reviews*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Jan;25(1):42-78.
16. Guptill L. *Bartonellosis*. *Veterinary microbiology*. [Review]. 2010 Jan 27;140(3-4):347-59.

17. Breitschwerdt EB, Maggi RG, Chomel BB, Lappin MR. Bartonellosis: an emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings. *Journal of veterinary emergency and critical care*. [Review]. 2010 Feb;20(1):8-30.
18. Schwartzman W. Bartonella (Rochalimaea) infections: beyond cat scratch. *Annual review of medicine*. [Review]. 1996;47:355-64.
19. Greub G, Raoult D. Bartonella: new explanations for old diseases. *Journal of medical microbiology*. [Review]. 2002 Nov;51(11):915-23.
20. Boulouis HJ, Chang CC, Henn JB, Kasten RW, Chomel BB. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic Bartonella infections. *Veterinary research*. [Review]. 2005 May-Jun;36(3):383-410.
21. Pitassi LHU; Scorpio DG; Drummond MR L, B; Barjas-Castro ML; Gilioli R; Colombo S; dos Santos FCP; Diniz, PPVP; Breitschwerdt EB; Nicholson, WL; Velho, PENF, editor. Bartonella spp. detected in blood donors from Campinas, Brazil. 7th International Conference on Bartonella as Animal and Human Pathogens; 2012; Raleigh, North Carolina, USA.
22. Chomel BB, Boulouis HJ, Maruyama S, Breitschwerdt EB. Bartonella spp. in pets and effect on human health. *Emerging infectious diseases*. [Review]. 2006 Mar;12(3):389-94.
23. Breitschwerdt EB. Feline bartonellosis and cat scratch disease. *Veterinary immunology and immunopathology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2008 May 15;123(1-2):167-71.
24. Breitschwerdt EB, Kordick DL. Bartonella infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. *Clinical microbiology reviews*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2000 Jul;13(3):428-38.
25. Avidor B, Graidy M, Efrat G, Leibowitz C, Shapira G, Schattner A, et al. Bartonella koehlerae, a new cat-associated agent of culture-negative human endocarditis. *Journal of clinical microbiology* 2004 Aug;42(8):3462-8.
26. Breitschwerdt EB, Maggi RG, Robert Mozayeni B, Hegarty BC, Bradley JM, Mascarelli PE. PCR amplification of Bartonella koehlerae from human blood and enrichment blood cultures. *Parasites & vectors* 2010;3:76.
27. Breitschwerdt EB, Mascarelli PE, Schweickert LA, Maggi RG, Hegarty BC, Bradley JM, et al. Hallucinations, sensory neuropathy, and peripheral visual deficits in a young woman infected with Bartonella koehlerae. *Journal of clinical microbiology*. [Case Reports Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Sep;49(9):3415-7.
28. Mosbacher ME, Klotz S, Klotz J, Pinnas JL. Bartonella henselae and the potential for arthropod vector-borne transmission. *Vector borne and zoonotic diseases*. [Review]. 2011 May;11(5):471-7.
29. Dehio C. Bartonella-host-cell interactions and vascular tumour formation. *Nature reviews Microbiology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2005 Aug;3(8):621-31.
30. Sanogo YO, Zeaiter Z, Caruso G, Merola F, Shpynov S, Brouqui P, et al. Bartonella henselae in Ixodes ricinus ticks (Acari: Ixodida) removed from humans, Belluno province, Italy. *Emerging infectious diseases*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2003 Mar;9(3):329-32.
31. Koehler JE, Sanchez MA, Garrido CS, Whitfeld MJ, Chen FM, Berger TG, et al. Molecular epidemiology of bartonella infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis. *The New England journal of medicine*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1997 Dec 25;337(26):1876-83.
32. Resto-Ruiz S, Burgess A, Anderson BE. The role of the host immune response in pathogenesis of Bartonella henselae. *DNA and cell biology*. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. 2003 Jun;22(6):431-40.

33. Mogollon-Pasapera E, Otvos L, Jr., Giordano A, Cassone M. Bartonella: emerging pathogen or emerging awareness? *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. [Review]. 2009 Jan;13(1):3-8.
34. Berghoff J, Viezens J, Guptill L, Fabbi M, Arvand M. Bartonella henselae exists as a mosaic of different genetic variants in the infected host. *Microbiology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 Jul;153(Pt 7):2045-51.
35. Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB, Kasten RW, Vayssier-Taussat M, Birtles RJ, et al. Ecological fitness and strategies of adaptation of Bartonella species to their hosts and vectors. *Veterinary research*. [Review]. 2009 Mar-Apr;40(2):29.
36. Abbott RC, Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, Kikuchi Y, Koehler JE, et al. Experimental and natural infection with Bartonella henselae in domestic cats. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1997 Jan;20(1):41-51.
37. Joosten LAB VdBW, Van der Meer JWM, Kullberg B, Netea MG, inventor Stichting Katholieke Univ; Joosten Leonardus Antonius Ber; Van Den Berg Wilhelmus Bernard; Van Der Meer Johannes Willem M; Kullberg Bart-Julian; Netea Mihai Gheorghe assignee. Use of Bartonella quintana derived lipopolysaccharide for the treatment of autoimmune, autoinflammatory or infectious diseases. patent EP20070002404. 2007.
38. Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LAB, Roelofs MF, Radstake TRDJ, Matera G, Popa C, et al. Inhibition of toll-like receptor 4 breaks the inflammatory loop in autoimmune destructive arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 2007 Sep;56(9):2957-67.
39. Tsai YL, Chang CC, Chuang ST, Chomel BB. Bartonella species and their ectoparasites: selective host adaptation or strain selection between the vector and the mammalian host? *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. [Review]. 2011 Jul;34(4):299-314.
40. Reis C, Cote M, Le Rhun D, Lecuelle B, Levin ML, Vayssier-Taussat M, et al. Vector competence of the tick Ixodes ricinus for transmission of Bartonella birtlesii. *PLoS neglected tropical diseases*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011;5(5):e1186.
41. Van Audenhove A, Verhoef G, Peetermans WE, Boogaerts M, Vandenberghe P. Autoimmune haemolytic anaemia triggered by Bartonella henselae infection: a case report. *British journal of haematology*. [Case Reports Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2001 Dec;115(4):924-5.
42. Velho PE, Pimentel V, Del Negro GM, Okay TS, Diniz PP, Breitschwerdt EB. Severe anemia, panseritis, and cryptogenic hepatitis in an HIV patient infected with Bartonella henselae. *Ultrastructural pathology*. [Case Reports]. 2007 Nov-Dec;31(6):373-7.
43. Scolfaro C, Mignone F, Gennari F, Alfarano A, Veltri A, Romagnoli R, et al. Possible donor-recipient bartonellosis transmission in a pediatric liver transplant. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*. [Case Reports]. 2008 Dec;10(6):431-3.
44. Velho PE. Blood transfusion as an alternative bartonellosis transmission in a pediatric liver transplant. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*. [Comment Letter]. 2009 Oct;11(5):474.
45. Breitschwerdt EB, Maggi RG, Farmer P, Mascarelli PE. Molecular evidence of perinatal transmission of Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii and Bartonella henselae to a child. *Journal of clinical microbiology*. [Case Reports Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Jun;48(6):2289-93.
46. Maggi RG, Mascarelli PE, Pultorak EL, Hegarty BC, Bradley JM, Mozayeni BR, et al. Bartonella spp. bacteremia in high-risk immunocompetent patients. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. [Case Reports Evaluation Studies Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. 2011 Dec;71(4):430-7.

47. Vermeulen MJ, Verbakel H, Notermans DW, Reimerink JH, Peeters MF. Evaluation of sensitivity, specificity and cross-reactivity in *Bartonella henselae* serology. *Journal of medical microbiology*. [Evaluation Studies Letter]. 2010 Jun;59(Pt 6):743-5.
48. Sander A, Berner R, Ruess M. Serodiagnosis of cat scratch disease: response to *Bartonella henselae* in children and a review of diagnostic methods. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 2001 Jun;20(6):392-401.
49. Guptill L. Feline bartonellosis. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice*. [Review]. 2010 Nov;40(6):1073-90.
50. Duncan AW, Maggi RG, Breitschwerdt EB. A combined approach for the enhanced detection and isolation of *Bartonella* species in dog blood samples: pre-enrichment liquid culture followed by PCR and subculture onto agar plates. *Journal of microbiological methods*. [Comparative Study]. 2007 May;69(2):273-81.
51. Maggi RG, Duncan AW, Breitschwerdt EB. Novel chemically modified liquid medium that will support the growth of seven bartonella species. *Journal of clinical microbiology*. [Evaluation Studies Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Jun;43(6):2651-5.
52. Diaz MH, Bai Y, Malania L, Winchell JM, Kosoy MY. Development of a Novel Genus-specific Real-time PCR Assay for Detection and Differentiation of *Bartonella* Species and Genotypes. *Journal of clinical microbiology* 2012 Feb 29.
53. Cadenas MB, Maggi RG, Diniz PP, Breitschwerdt KT, Sontakke S, Breithschwerdt EB. Identification of bacteria from clinical samples using *Bartonella* alpha-Proteobacteria growth medium. *Journal of microbiological methods*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 Nov;71(2):147-55.
54. Maggi RG, Breitschwerdt EB. Potential limitations of the 16S-23S rRNA intergenic region for molecular detection of *Bartonella* species. *Journal of clinical microbiology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Mar;43(3):1171-6.
55. Pennisi MG, La Camera E, Giacobbe L, Orlandella BM, Lentini V, Zummo S, et al. Molecular detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in clinical samples of pet cats from Southern Italy. *Research in veterinary science*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Jun;88(3):379-84.
56. Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB. Cat scratch disease and other zoonotic *Bartonella* infections. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. [Review]. 2004 Apr 15;224(8):1270-9.
57. Jacomo V, Kelly PJ, Raoult D. Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate). *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. [Review]. 2002 Jan;9(1):8-18.
58. Jackson LA, Perkins BA, Wenger JD. Cat scratch disease in the United States: an analysis of three national databases. *Am J Public Health* 1993 Dec;83(12):1707-11.
59. Lamas C, Curi A, Boia M, Lemos E. Human bartonellosis: seroepidemiological and clinical features with an emphasis on data from Brazil - a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2008 May;103(3):221-35.
60. da Costa PS, Brigatte ME, Greco DB. Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2005 Dec;100(8):853-9.

61. Correa FG, Pontes CL, Verzola RM, Mateos JC, Velho PE, Schijman AG, et al. Association of Bartonella spp bacteremia with Chagas cardiomyopathy, endocarditis and arrhythmias in patients from South America. *Braz J Med Biol Res* Jul;45(7):644-51.
62. Tompkins DC, Steigbigel RT. Rochalimaea's role in cat scratch disease and bacillary angiomatosis. *Annals of internal medicine* 1993 Mar 1;118(5):388-90.
63. Sander A, Posselt M, Oberle K, Bredt W. Seroprevalence of antibodies to Bartonella henselae in patients with cat scratch disease and in healthy controls: evaluation and comparison of two commercial serological tests. *Clinical and diagnostic laboratory immunology. [Comparative Study]*. 1998 Jul;5(4):486-90.
64. Gurfield AN, Boulouis HJ, Chomel BB, Kasten RW, Heller R, Bouillin C, et al. Epidemiology of Bartonella infection in domestic cats in France. *Veterinary microbiology. [Research Support, Non-U.S. Gov't]*. 2001 May 21;80(2):185-98.
65. Gurfield AN, Boulouis HJ, Chomel BB, Heller R, Kasten RW, Yamamoto K, et al. Coinfection with Bartonella clarridgeiae and Bartonella henselae and with different Bartonella henselae strains in domestic cats. *Journal of clinical microbiology. [Research Support, Non-U.S. Gov't]*. 1997 Aug;35(8):2120-3.
66. La Scola B, Liang Z, Zeaiter Z, Houpijian P, Grimont PA, Raoult D. Genotypic characteristics of two serotypes of Bartonella henselae. *Journal of clinical microbiology* 2002 Jun;40(6):2002-8.
67. Rolain JM, Franc M, Davoust B, Raoult D. Molecular detection of Bartonella quintana, B. koehlerae, B. henselae, B. clarridgeiae, Rickettsia felis, and Wolbachia pipientis in cat fleas, France. *Emerging infectious diseases* 2003 Mar;9(3):338-42.
68. Dillon B, Valenzuela J, Don R, Blanckenberg D, Wigney DI, Malik R, et al. Limited diversity among human isolates of Bartonella henselae. *Journal of clinical microbiology. [Research Support, Non-U.S. Gov't]*. 2002 Dec;40(12):4691-9.
69. Bergmans AM, Schellekens JF, van Embden JD, Schouls LM. Predominance of two Bartonella henselae variants among cat-scratch disease patients in the Netherlands. *Journal of clinical microbiology. [Comparative Study]*. 1996 Feb;34(2):254-60.
70. Loureiro VH, M. A survey of anti-bartonella henselae antibodies in domiciliated cats in the city of São Paulo, state of São Paulo and its importance in public health. *Brazilian Journal of Veterinary Science* 2007 jan./abr. 2007;14 39-42.
71. Staggemeier R, Venker CA, Klein DH, Petry M, Spilki FR, Cantarelli VV. Prevalence of Bartonella henselae and Bartonella clarridgeiae in cats in the south of Brazil: a molecular study. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. [Research Support, Non-U.S. Gov't]*. 2010 Nov;105(7):873-8.
72. Crissiuma A, Favacho A, Gershony L, Mendes-de-Almeida F, Gomes R, Mares-Guia A, et al. Prevalence of Bartonella species DNA and antibodies in cats (Felis catus) submitted to a spay/neuter program in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of feline medicine and surgery* 2011 Feb;13(2):149-51.
73. Souza AM AD, Guterres A, Gomes R, Favacho ARM, Moreira NS, Maia LMP, Rozental T, Filho RAT, Cerqueira AMF, Lemos ERS, Almosny NRP. Bartonellosis: molecular and serological analysis in cats from Rio de Janeiro – Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Science* 2010 jan./abr. 2010;17:7-11.
74. Rolain JM, Locatelli C, Chabanne L, Davoust B, Raoult D. Prevalence of Bartonella clarridgeiae and Bartonella henselae in domestic cats from France and detection of the organisms in erythrocytes by immunofluorescence. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 2004 Mar;11(2):423-5.

75. Heller R, Artois M, Xemar V, De Briel D, Gehin H, Jaulhac B, et al. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in stray cats. *Journal of clinical microbiology* 1997 Jun;35(6):1327-31.
76. Chomel BB, Carlos ET, Kasten RW, Yamamoto K, Chang CC, Carlos RS, et al. *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* infection in domestic cats from The Philippines. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 1999 Apr;60(4):593-7.
77. Chomel BB, Abbott RC, Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, Kass PH, Glaser CA, et al. *Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. *Journal of clinical microbiology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1995 Sep;33(9):2445-50.
78. Glaus T, Hofmann-Lehmann R, Greene C, Glaus B, Wolfensberger C, Lutz H. Seroprevalence of *Bartonella henselae* infection and correlation with disease status in cats in Switzerland. *Journal of clinical microbiology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1997 Nov;35(11):2883-5.
79. Marston EL, Finkel B, Regnery RL, Winoto IL, Graham RR, Wignal S, et al. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in an urban Indonesian cat population. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 1999 Jan;6(1):41-4.
80. Chomel BB, Boulouis HJ, Petersen H, Kasten RW, Yamamoto K, Chang CC, et al. Prevalence of *Bartonella* infection in domestic cats in Denmark. *Veterinary research*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2002 Mar-Apr;33(2):205-13.
81. Guptill L, Wu CC, HogenEsch H, Slater LN, Glickman N, Dunham A, et al. Prevalence, risk factors, and genetic diversity of *Bartonella henselae* infections in pet cats in four regions of the United States. *Journal of clinical microbiology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. 2004 Feb;42(2):652-9.
82. Tsai YL, Lin CC, Chomel BB, Chuang ST, Tsai KH, Wu WJ, et al. *Bartonella* infection in shelter cats and dogs and their ectoparasites. *Vector borne and zoonotic diseases*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Aug;11(8):1023-30.
83. Inoue K, Maruyama S, Kabeya H, Kawanami K, Yanai K, Jitchum S, et al. Prevalence of *Bartonella* infection in cats and dogs in a metropolitan area, Thailand. *Epidemiology and infection*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Nov;137(11):1568-73.
84. Sykes JE, Westropp JL, Kasten RW, Chomel BB. Association between *Bartonella* species infection and disease in pet cats as determined using serology and culture. *Journal of feline medicine and surgery*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Aug;12(8):631-6.
85. Mosepele M, Mazo D, Cohn J. *Bartonella* infection in immunocompromised hosts: immunology of vascular infection and vasoproliferation. *Clinical & developmental immunology* 2012;2012:612809.
86. Diniz PP, Maggi RG, Schwartz DS, Cadenas MB, Bradley JM, Hegarty B, et al. Canine bartonellosis: serological and molecular prevalence in Brazil and evidence of co-infection with *Bartonella henselae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*. *Veterinary research*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 Sep-Oct;38(5):697-710.
87. Bemis DA, Kania SA. Isolation of *Bartonella* sp. from sheep blood. *Emerging infectious diseases* 2007 Oct;13(10):1565-7.
88. Drummond MR, Pitassi LHU, Lania BG, dos Santos SRC, Gilioli R, Velho PENF. Detection of *Bartonella Henselae* in Defibrinated Sheep Blood Used for Culture Media Supplementation. *Brazilian Journal of Microbiology* 2011 Apr-Jun;42(2):430-2.

89. Kelly TM, Padmalayam I, Baumstark BR. Use of the cell division protein FtsZ as a means of differentiating among Bartonella species. Clinical and diagnostic laboratory immunology 1998 Nov;5(6):766-72.
90. Kawasato KH. Padronização de sistemas de dupla amplificação para a detecção de DNA de *Bartonella henselae* em casos suspeitos de Bartonelose humana [Dissertação]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2009.
91. Maggi RG, Mozayeni BR, Pultorak EL, Hegarty BC, Bradley JM, Correa M, et al. Bartonella spp. bacteremia and rheumatic symptoms in patients from Lyme disease-endemic region. Emerging infectious diseases 2012 May;18(5):783-91.
92. Drummond MR, Gilioli R, Velho PE. Bartonellosis diagnosis requires careful evaluation. The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases. [Letter]. 2010 May-Jun;14(3):217.

# ***Apêndices***

## **1. Meio sólido Ducrey modificado**

6g de Bordet Gengou Agar Base (substituindo o ágar batata)

1167 $\mu$ L Glicerina

117mL de Água destilada

Pesar a base, adicionar a água e a glicerina em um balão volumétrico. Autoclavar 121°C por 20 minutos a 1 atmosfera.

Esperar amornar e adicionar 50mL de sangue de ovino desfibrinado em ambiente estéril. Verter aproximadamente 7mL em tubos de 12x120mm estéreis e inclinar.

Deixar todos os tubos 24horas na estufa para a prova de esterilidade e após este tempo conservar em geladeira por até um mês.

## **2. Coloração de gram**

Coletar a colônia sugestiva com o auxílio de uma alça estéril e fazer esfregaço em lâmina. Fixar passando rapidamente pela chama do bico de bunsen.

Corar a lâmina da seguinte maneira:

1. Adicionar o corante cristal violeta ao esfregaço e deixar por 60 segundos.
2. Lavar com um filete de água destilada.
3. Cobrir com Lugol por 60 segundos.
4. Lavar com um filete de água destilada.
5. Descorar rapidamente, com um filete de álcool a 95%.
6. Lavar com um filete de água destilada.
7. Corar com fucsina por 60 segundos.
8. Lavar com água destilada, secar e observar ao microscópio.