



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

VERÔNICA DOMINGOS MIRANDA

DETECÇÃO DO DNA DE *Bartonella henselae* EM CÃES COM SUSPEITA CLÍNICA  
DE LEISHMANIOSE VISCERAL

CAMPINAS

2023

VERÔNICA DOMINGOS MIRANDA

DETECÇÃO DO DNA DE *Bartonella henselae* EM CÃES COM SUSPEITA CLÍNICA  
DE LEISHMANIOSE VISCERAL

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos  
exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências na área  
de Clínica Médica

ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO  
COORIENTADORA: DR<sup>a</sup>. MARINA ROVANI DRUMMOND

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA  
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA VERÔNICA  
DOMINGOS MIRANDA E ORIENTADA PELO PROF. DR.  
PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO E  
COORIENTADA PELA DR<sup>a</sup>. MARINA ROVANI DRUMMOND.

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M672d Miranda, Verônica Domingos, 1985-  
Detecção do DNA de *Bartonella henselae* em cães com suspeita clínica de leishmaniose visceral / Verônica Domingos Miranda. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho.  
Coorientador: Marina Rovani Drummond.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.  
Em regime interinstitucional com: Universidade Federal de Rondonópolis.

1. Bartonella. 2. Cães. 3. Leishmania (*Leishmania*) infantum. 4. Prevalência. I. Velho, Paulo Eduardo Neves Ferreira, 1966-. II. Drummond, Marina Rovani, 1985-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Informações Complementares**

**Título em outro idioma:** *Bartonella henselae* DNA detection in dogs with clinical suspicion of visceral leishmaniasis

**Palavras-chave em inglês:**

Bartonella

Dogs

Leishmania (*Leishmania*) infantum

Prevalence

**Área de concentração:** Clínica Médica

**Titulação:** Mestra em Ciências

**Banca examinadora:**

Marina Rovani Drummond [Coorientador]

Rodrigo Nogueira Angerami

Luiz Ricardo Gonçalves

**Data de defesa:** 29-05-2023

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

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0009-0001-7183-750>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1235175588023596>

# **COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO**

**VERÔNICA DOMINGOS MIRANDA**

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO

**COORIENTADORA:** Dr<sup>a</sup>. MARINA ROVANI DRUMMOND

## **MEMBROS TITULARES:**

**1. Dr<sup>a</sup>. MARINA ROVANI DRUMMOND**

**2. Prof. Dr. RODRIGO NOGUEIRA ANGERAMI**

**3. Prof. Dr. LUIZ RICARDO GONÇALVES**

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

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

**Data de Defesa: 29/05/2023**

Dedico este estudo à minha amada mãezinha (*in  
memorian*), Flora, minha inspiração de amor,  
força e dedicação.

A ela, todo meu amor e gratidão.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por todos os momentos em que eu pensei não conseguir, mas, Ele revigorou as minhas forças e me levou além.

À minha família que sempre me apoiou e compreendeu minha ausência, tanto em momentos de alegria como em momentos de dor.

Ao meu amado esposo, Fernando, por sempre apoiar minhas decisões.

Aos meus pais, Valdomiro e Flora, que nunca mediram esforços para que eu pudesse estudar.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Velho, pela orientação, paciência, compreensão e atenção dispensadas, pelo conhecimento compartilhado e pela oportunidade de qualificação profissional.

À Marina Rovani Drummond por ter me coorientado e me ensinado muito sobre análise molecular, sempre muito atenciosa e compreensiva. Aprendi muito com ela, não somente sobre as metodologias do projeto, mas também sobre a vida. Meus sinceros agradecimentos por todo o suporte durante esse mestrado.

À professora Dra. Denise Engelbrecht Zantut Wittmann, e aos professores Dr. Aristides José da Silva Júnior e Dr. Graciano Almeida Sudré por oportunizar este Mestrado Interinstitucional.

À toda equipe do laboratório Padib: Luciene, Carol, Osvaldo, Francine, Gabriel, Rafaela, Amanda, Allisson, Sayros, Dayane e Jackeline. Muito obrigada! Uns, pelo apoio durante a realização dos experimentos, outros, pelo conhecimento compartilhado!

Ao Henrique e à Rachel pelo conhecimento compartilhado e por sempre me socorrerem durante esta trajetória.

Aos que partilharam o mesmo percurso, os colegas de Mestrado, meus agradecimentos pelo apoio e companheirismo.

Aos colegas de trabalho pela importância, em minha vida profissional e acadêmica, durante essa jornada.

À toda a equipe do Centro de Controle de Zoonoses de Rondonópolis, pelo suporte necessário para o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço especialmente a Maria Sueli e a veterinária Mariana.

Agradeço a todos que me apoiaram e contribuíram, direta e indiretamente, para a realização desse estudo.

## RESUMO

O gênero *Bartonella* compreende numerosas espécies que são responsáveis por muitas doenças infecciosas emergentes e reemergentes. A *Bartonella henselae*, a espécie mais frequentemente associada a doenças em humanos, também infecta cães que podem ou não adoecer. Outra zoonose relacionada a cães é a leishmaniose visceral (LV), causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum*. A LV é endêmica no estado de Mato Grosso (MT), Brasil, e é uma doença emergente em Rondonópolis, cidade desse estado, apresentando um aumento do diagnóstico de casos tanto em humanos como em cães. Há alguns relatos de coinfeção de *Bartonella* spp. e *L. infantum* em outros países, mas poucos estudos nacionais relacionados à detecção da infecção por *Bartonella* spp. em cães utilizando métodos moleculares. Apenas um estudo sorológico brasileiro sobre a coinfeção destes agentes em cães foi encontrado. Assim, objetivou-se avaliar a ocorrência de infecção por *B. henselae* por cultura e reações moleculares espécie-específicas em cães de Rondonópolis, MT, com suspeita clínica de LV. Foi isolada uma colônia e o DNA de *B. henselae* foi detectado em 53,75% (43/80) dos cães com suspeita clínica de LV. Houve codetecção de DNA de *Leishmania* sp. em 28 (65,11%) destes 43 animais. Dos 80 cães com suspeita clínica de LV, 35 não apresentaram confirmação sorológica e, destes, em 17 (48,57%) detectou-se o DNA de *B. henselae*. Este estudo demonstrou pela primeira vez a detecção de *B. henselae* em cães neste município. Os resultados sugerem que novos estudos são necessários para se entender o papel da bactéria em cães com suspeita clínica com e sem confirmação diagnóstica para LV, uma vez que cerca de um em cada dois cães com suspeita da zoonose sem confirmação sorológica estavam infectados por *B. henselae* e o mesmo aconteceu nos cães com o diagnóstico de LV confirmado.

Palavras-chave: Bartonella, Cães, Leishmania (Leishmania) infantum, Prevalência

## ABSTRACT

The genus *Bartonella* comprises numerous species responsible for many emerging and reemerging infectious diseases. *Bartonella henselae*, the specie most often associated with diseases in humans, can also infect dogs (evolving or not to sickness). Another dog-related zoonosis is visceral leishmaniasis (VL), caused by *Leishmania (Leishmania) infantum*. VL is endemic in the state of Mato Grosso (MT), Brazil, and is an emerging disease in Rondonopolis, a city of this state, where is an increase of the diagnosis of cases in both humans and dogs. There are some reports about co-infection by *Bartonella* spp. and *L. infantum* in other countries, but few studies focused on detecting *Bartonella* sp. infection in dogs using molecular methods. We find just a Brazilian serological study about co-infection of these agents in dogs. This study sought to evaluate *B. henselae* infection by culture and species-specific molecular reactions in dogs with clinical suspicion of VL from Rondonopolis (MT, Brazil). A *B. henselae* colony was isolated and *B. henselae* DNA was detected in 53,75% (43/80) of the dogs with clinical suspicion of VL and the there was codetection by *L. infantum* in 28 (65,11%) of these 43 animals. Of the 80 animals with clinical suspicion of VL, 35 did not have serological confirmation and, of these, in 17 (48.57%) *B. henselae* DNA was detected. This study was the first to detect *B. henselae* in dogs in this city. Our results suggest that news studies are necessary to understand the role of bacteria in dogs with clinical suspicion with and without confirmed VL since about one in every two dogs with suspected zooparasitosis without serological confirmation were infected with *B. henselae* and the same happens dogs with VL diagnosis confirmation.

Keywords: Bartonella, Dogs, Leishmania (Leishmania) infantum, Prevalence.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mapa mostrando o estado de Mato Grosso na região Centro-Oeste do Brasil e a localização da cidade de Rondonópolis .....	21
Figura 2. Fluxograma da metodologia utilizada no estudo .....	28
Figura 3. Resultados das reações moleculares para detecção de DNA de <i>Bartonella henselae</i> .....	31
Figura 4. Cães com detecção do DNA de <i>Leishmania</i> sp. e de <i>Bartonella henselae</i> e aqueles com codetecção dos microrganismos .....	31

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Protocolo da reação de cadeia da polimerase (PCR) controle com a sequência dos <i>primers</i> .....	24
Quadro 2. Protocolo da reação em cadeia da polimerase (PCR) <i>nested</i> , primeira reação, com a sequência dos <i>primers</i> .....	24
Quadro 3. Protocolo da reação em cadeia da polimerase (PCR) <i>nested</i> , segunda reação, com a sequência dos <i>primers</i> .....	25
Quadro 4. Protocolo da reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional, baseado no gene <i>gltA</i> , com a sequência dos <i>primers</i> .....	25
Quadro 5. Protocolo da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real com a sequência dos <i>primers</i> .....	26
Quadro 6. Protocolo da reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional ( <i>kDNA</i> ) com a sequência dos <i>primers</i> .....	27
Quadro 7. Protocolo da reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional ( <i>hsp 70</i> ) com a sequência dos <i>primers</i> .....	27
Quadro 8. Resultados da sensibilidade de detecção de cada reação em cadeia da polimerase (PCR) para <i>Bartonella henselae</i> .....	29

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultado das reações em cadeia da polimerase para *Leishmania* sp. e *Bartonella henselae* ..... 32

Tabela 2. Resumo da detecção de DNA de *Bartonella henselae* em cães com suspeita clínica de leishmaniose visceral ..... 33

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	14
1.1 <i>Bartonella</i> spp. ....	14
1.2. Transmissão de <i>Bartonella</i> sp. ....	15
1.3. Diagnóstico de <i>Bartonella</i> sp. ....	16
1.4. <i>Bartonella</i> sp. em cães .....	16
1.5. <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> .....	17
1.5.1. Epidemiologia da leishmaniose visceral .....	18
1.5.2. Diagnóstico de leishmaniose visceral humana .....	18
1.5.3. Diagnóstico de leishmaniose visceral canina .....	19
1.6. Coinfecção de <i>Bartonella</i> spp. e <i>L. infantum</i> .....	19
2. Objetivos .....	20
2.1. Geral .....	20
2.2. Específicos .....	20
3. Metodologia.....	21
3.1. Extração do DNA a partir de sangue total .....	22
3.2. Cultura líquida .....	22
3.3. Cultura sólida .....	22
3.4. Extração do DNA a partir da cultura líquida e da sólida.....	23
3.5. Amplificação do DNA.....	23
3.5.1. PCR controle .....	23
3.5.2. PCR de dupla-amplificação ( <i>nested</i> ) .....	24
3.5.3. PCR convencional ( <i>gltA</i> ) .....	25
3.5.4. PCR em tempo real .....	26
3.5.5. PCR convencional ( <i>kDNA</i> ).....	26
3.5.6. PCR convencional ( <i>hsp70</i> ).....	27
3.6. Sequenciamento .....	28
3.7. Análise estatística .....	28
4. Resultados .....	29
5. Discussão.....	34

6. Conclusão .....	38
7. Referências.....	39
8. Anexo.....	47
8.1. Documento da Comissão de Ética no Uso de Animais da Unicamp.....	47

# 1. Introdução

## 1.1 *Bartonella* spp.

O gênero *Bartonella* compreende numerosas espécies que são responsáveis por muitas doenças infecciosas emergentes e reemergentes, potencialmente fatais. É composto por bactérias pequenas, gram-negativas, cocobacilares, fastidiosas, intracelulares facultativas, pertencentes ao subgrupo alpha-2 da classe Proteobacteria<sup>1; 2</sup>. Há pelo menos 47 espécies e subespécies descritas de *Bartonella* spp. sendo que 17 espécies estão envolvidas em doenças humanas, mas três espécies estão mais relacionadas ao maior número de expressões clínicas em humanos: *Bartonella bacilliformis*, *Bartonella quintana* e *Bartonella henselae*<sup>3; 4</sup>.

A *Bartonella bacilliformis* foi a primeira espécie de *Bartonella* descrita e foi identificada pelo microbiologista Alberto Barton, em 1905, que pesquisava o agente etiológico de uma doença endêmica nos Andes, sobretudo do Peru. A bactéria é transmitida, entre humanos, durante o repasto sanguíneo realizado por fêmeas infectadas do flebotomíneo da espécie *Lutzomyia verrucarum*. Essa doença possui duas fases: aguda, caracterizada por uma bacteremia intraeritrocitária imunossupressora que comumente cursa com anemia hemolítica grave e que pode ser fatal, a febre de Oroya; e a fase crônica em que há proliferação de células endoteliais, produzindo lesões cutâneas, a verruga peruana. A infecção causada por esta bactéria é conhecida por doença de Carrión porque Daniel Carrión, um estudante de medicina, em 1885, sacrificou sua vida para comprovar que a febre de Oroya e a verruga peruana tinham uma etiologia comum. Ele injetou em si mesmo sangue aspirado de uma lesão cutânea de verruga peruana e faleceu com febre de Oroya. O homem é o único reservatório descrito da *B. bacilliformis*<sup>5; 6</sup>.

Os humanos também são considerados reservatórios primários da *B. quintana*. A primeira manifestação clínica da infecção por este agente foi descrita na Primeira Guerra Mundial<sup>7</sup>. A *B. quintana* é a espécie causadora da febre das trincheiras e é transmitida pelo piolho de corpo humano (*Pediculus humanus corporis*). O surto de *Bartonella* sp. mais prolongado em todo o mundo, foi o de *B. quintana*, que afetou mais de 1.000.000 de pessoas durante essa guerra, principalmente soldados. Essa doença reemergiu na Segunda Grande Guerra e mais recentemente, no final do século passado, em populações vulneráveis como usuários de substâncias psicoativas e aquelas que vivem em situação de rua<sup>7; 8</sup>. Recente estudo, relatou a positividade de *B. quintana* em pesquisa realizada com pessoas sem moradia em São Paulo, Brasil<sup>9</sup>. A infecção caracteriza-se por febre com duração de cinco dias (o que originou o nome

“quintana”), dores de cabeça e dores nas pernas, pode causar também bacteremia crônica, endocardite infecciosa e angiomatose bacilar visceral ou cutânea<sup>7; 8; 10</sup>.

Outro agente que pode causar infecção em humanos é a *B. henselae*. Diane Hensel contribuiu muito para o isolamento dessa espécie (inicialmente denominada de *Rochalimaea henselae*) em amostra de sangue de um homem de 40 anos, febril e positivo para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), sendo, por isso, homenageada<sup>11; 12</sup>. O reservatório primário desse agente é o gato doméstico sendo considerado o principal responsável por transmitir a infecção aos humanos. Essa bactéria é causadora da doença da arranhadura do gato, transmitida ao homem pelo contato com gatos infectados. A transmissão entre gatos ocorre por meio de pulgas infectadas da espécie *Ctenocephalides felis*<sup>13</sup>. A *B. henselae* é a espécie desse gênero mais comumente identificada em humanos, cães e gatos<sup>14</sup>. Outras manifestações clínicas mais comuns que essa bactéria pode provocar no homem são febre recorrente e de origem indeterminada, bacteremia, endocardite, angiomatose bacilar, peliose bacilar, cefaleia, hepatoesplenomegalia, linfonodomegalia e manifestações oculares como neurorretinite e uveíte<sup>15; 16</sup>.

A diversidade das manifestações clínicas está relacionada com a virulência da cepa de *Bartonella* sp. em combinação com a resposta imune do hospedeiro<sup>17</sup>. A infecção por *Bartonella* spp. concomitante a outros microrganismos transmitidos por vetores podem aumentar a severidade da doença, segundo Diniz et al<sup>18</sup>.

## 1.2. Transmissão de *Bartonella* sp.

Devido a sua característica hemotrópica, várias espécies de *Bartonella* são transmitidas principalmente por artrópodes hematófagos. Flebotomíneos, piolhos do corpo, pulgas e carrapatos estão associados à transmissão de *Bartonella* sp. entre mamíferos<sup>13; 19; 20; 21</sup>.

A transmissão de *B. henselae* para humanos pode ocorrer por meio de arranhões causados por gatos infectados, possivelmente por expor a derme às fezes de pulgas desses animais, uma vez que a transmissão da infecção entre os gatos não acontece sem a presença desses vetores<sup>22</sup>. Transmissão por acidente percuntâneo já foi relatada em veterinários<sup>23; 24</sup>.

Outras formas de transmissão de *Bartonella* sp. como transfusão sanguínea e transfusão vertical já foram também descritas<sup>6; 14</sup>.

Alguns vetores estão associados à transmissão de determinadas espécies de *Bartonella*. Fêmeas de flebotomíneo infectadas, espécie *Lutzomyia verrucarum*, transmitem a *B. bacilliformis*<sup>5</sup>. Piolho de corpo humano, *Pediculus humanus corporis*,

transmitem *B. quintana* <sup>7</sup>. Porém, a espécie *B. henselae* pode ser transmitida por diferentes vetores, como pulgas (*Ctenocephalides felis*) <sup>13</sup> e carrapatos (*Ixodes ricinus*) <sup>25</sup>.

### 1.3. Diagnóstico de *Bartonella* sp.

As bartonelas são bactérias fastidiosas, ou seja, são muito exigentes para cultivo em laboratório, tem necessidade de um meio enriquecido com sangue, temperatura ótima de crescimento de 35° C e atmosfera com saturação de gás carbônico, além de vários dias de incubação. Porém, a oferta dessas condições não garante seu crescimento e isolamento <sup>26</sup>.

O uso de teste sorológico por imunofluorescência indireta (IFI) é muito realizado no diagnóstico de *Bartonella* sp. utilizando kits comerciais, porém pode apresentar resultados falsos-negativos e falsos-positivos por meio de reações cruzadas ou exigir duas amostras seriadas para o diagnóstico definitivo <sup>14</sup>.

As análises moleculares por PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) apresentam um resultado rápido e possibilita a identificação da espécie de bactéria que causou a infecção. O limitante desta técnica está na possibilidade de falsos negativos uma vez que a quantidade de DNA da bactéria disponível para a reação pode estar abaixo do limite de detecção do método. No caso de bactérias que provocam bacteremia cíclica e não constante, além de baixa bacteremia, esta limitação deve ser levada em consideração, como acontece com as *Bartonella* spp. <sup>27</sup>.

Não há um método padrão ouro para a detecção de *Bartonella* sp.. Um estudo realizado no Sudeste do Brasil, que combinou vários métodos moleculares a partir de amostras de DNA extraídas de sangue total, de cultura líquida e de sólida, documentou uma alta prevalência da infecção por *Bartonella* sp. em amostras de sangue de gatos, concluindo que essa combinação é importante para diminuir resultados falsos negativos <sup>28</sup>.

### 1.4. *Bartonella* sp. em cães

Os cães podem ser infectados por *B. henselae*, *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *Bartonella clarridgeiae*, *Bartonella washoensis*, *Bartonella elizabethae* e *B. quintana* <sup>19</sup>, sendo a *B. henselae* a espécie mais comumente relatada também na infecção de cães <sup>14</sup>.

Até o momento nenhum vetor foi relacionado à transmissão de *Bartonella* spp. especificamente em cães, mas carrapatos e pulgas (*Ctenocephalides felis*) são vetores descritos entre esses animais <sup>29; 30; 31</sup>.

As manifestações clínicas causadas por bartonelas em cães são muito semelhantes às observadas em humanos: febre, bacteremia, endocardite, linfonodomegalia, uveíte<sup>32; 33</sup>, portanto, o cão foi considerado sentinela e modelo comparativo para infecções por *Bartonella* sp. no homem, segundo Chomel et al<sup>34</sup>.

Muitos estudos sorológicos demonstraram a prevalência da detecção de *Bartonella* sp. em cães, no Brasil e no mundo<sup>20; 32; 35; 36</sup>. Já estudos com a prevalência determinada por métodos moleculares são poucos<sup>32; 37</sup>. Outros autores, realizaram a PCR, mas não obtiveram positividade nas amostras analisadas<sup>20; 38</sup>.

No Brasil, a prevalência sorológica para a detecção de antígenos de *Bartonella* spp. em cães varia de 3,5% (7/197) a 24,7% (27/109)<sup>18; 20</sup>. Já a prevalência da detecção molecular, nesses animais, foi de 1% (1/198) e 0,5% (1/198) para *B. henselae* e *B. v. berkhoffii*, respectivamente, em estudo realizado em Botucatu, São Paulo, Brasil<sup>18</sup>. Outro estudo, também realizado no estado de São Paulo, relatou a detecção do DNA de *B. clarridgeiae* em cão de Jaboticabal<sup>39</sup>.

### **1.5. *Leishmania (Leishmania) infantum***

Outros agentes zoonóticos podem ter nos cães seus reservatórios como os causadores da doença de Lyme, da ehrlichiose, da anaplasmose, da febre maculosa brasileira<sup>40; 41</sup>. Além destas, os cães são reservatórios de protozooses como a babesiose, a doença de Chagas, a leishmaniose tegumentar e a leishmaniose visceral<sup>42; 43; 44</sup>.

A *Leishmania (Leishmania) infantum* (Sinônimo: *L. chagasi*) é o agente da leishmaniose visceral (LV), doença negligenciada e que é endêmica no Brasil<sup>45</sup>. Em humanos a doença cursa com febre, anemia, emagrecimento e hepatoesplenomegalias<sup>46</sup>. A Organização Mundial de Saúde (OMS) relatou que a LV humana, se não tratada adequadamente, pode evoluir para óbito em 95% dos casos. Anualmente, estima-se que ocorra 50 a 90 mil casos novos de LV ao redor do mundo, mas apenas 25 a 45% são relatados à OMS. O Brasil, o leste da África e a Índia são os lugares onde ocorrem mais casos de LV humana<sup>47</sup>.

A infecção por esse protozoário é transmitida pelo repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos infectadas e, no Brasil, especialmente pelas espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. A doença possui um ciclo no qual o principal reservatório do parasita no meio urbano é o cão doméstico<sup>48; 49</sup>. A presença desses vetores e o reservatório canino são os principais responsáveis pela ocorrência da LV humana inclusive na região Centro-Oeste do país<sup>50</sup>.

Os sinais clínicos mais observados em cães infectados por *L. infantum* incluem lesões da pele e anexos como alopecia, descamação, hiperqueratose nasal, úlceras, hiperpigmentação e onicogribose, além de anorexia, linfonodomegalia e alterações oftálmicas<sup>51; 52</sup>.

### **1.5.1. Epidemiologia da leishmaniose visceral**

Vários municípios brasileiros já reportaram casos de LV, especialmente nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste<sup>53</sup>.

Na região Centro-Oeste, o município de Rondonópolis, Mato Grosso, Brasil, emergiu como um dos mais endêmicos para casos humanos de LV nos últimos anos<sup>48</sup>. Em estudo recente, o município apresentou uma soroprevalência de 19,2% (115/602) para LV canina em áreas da cidade onde já foram notificados casos de LV humana<sup>45</sup>.

No estado de São Paulo, uma região não endêmica para casos em humanos, a soroprevalência de LV canina foi de 5,6% (369/6578) em cães amostrados na cidade de Bauru<sup>54</sup>. Estudo realizado no município de Campinas, SP, apresentou soroprevalência de LV canina de 1,5% (9/590) e 1,2% (7/571) em 2013 e 2015, respectivamente, e havia animais silvestres e flebotomíneos infectados com *Leishmania* spp.. Uma vez que cães coabitam com animais silvestres na área estudada, a hipótese de ocorrer a infecção dos animais silvestres a partir de reservatórios caninos não pode ser afastada. Por outro lado, pode haver a participação de animais silvestres na transmissão da zoonose, além da dos cães<sup>19; 55</sup>. Para os autores do estudo, estas relações mostram a importância do conceito *One Health* (ou Saúde Única). Este conceito reconhece que a saúde das pessoas está intimamente ligada à saúde dos animais e do ambiente compartilhado, o que é corroborado por Breitschwerdt quando afirma que uma abordagem *One Health* para as bartoneloses deve melhorar a saúde animal e humana em todo o mundo<sup>19</sup>. A maioria das doenças infecciosas em humanos são zoonóticas e, por isto, a saúde das pessoas, dos animais domésticos e selvagens, das plantas e de todo o meio ambiente se relacionam e são intimamente interdependentes<sup>56</sup>.

### **1.5.2. Diagnóstico de leishmaniose visceral humana**

O Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral<sup>57</sup> orienta que o diagnóstico de LV humana pode ser realizado por meio de técnicas parasitárias e imunológicas. Este último diagnóstico é baseado na detecção de anticorpos anti *Leishmania* sp.. Duas técnicas são disponibilizadas pelo Sistema Único de Saúde, a

reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (*enzyme linked immuno sorbent assay*, Elisa). A primeira considera positivas amostras reagentes a partir da diluição de 1:80. No Elisa, o resultado pode ser expresso em unidades de absorvância a um raio de luz, em uma relação com diluições fixas (curva padrão) ou mais comumente, apenas como reagente ou não.

A visualização de formas amastigotas em material biológico caracteriza o diagnóstico parasitológico. O aspirado do baço tem uma sensibilidade de 90 a 95% para identificação do agente. Pelo risco da punção deste órgão, são mais realizados o aspirado da medula óssea, a biópsia hepática e a aspiração de linfonodos<sup>57</sup>.

Testes moleculares também são utilizados no diagnóstico de LV humana. Esses métodos consistem na detecção de DNA de *Leishmania* sp. em aspirado da medula óssea ou em amostra sanguínea, por PCR. Nas amostras sanguíneas a sensibilidade do exame é menor uma vez que a parasitemia não é constante<sup>57;58</sup>.

### **1.5.3. Diagnóstico de leishmaniose visceral canina**

Para o diagnóstico da LV canina, o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) do Ministério da Saúde recomenda dois métodos sorológicos. Na Nota Técnica Conjunta nº 01/2011<sup>59</sup> lê-se que deve ser feito o teste rápido imunocromatográfico de duplo percurso como triagem e o ensaio imunoenzimático, como exame confirmatório<sup>60</sup>.

### **1.6. Coinfecção de *Bartonella* spp. e *L. infantum***

Há poucos estudos relatando a coinfecção de *Bartonella* spp. e *L. infantum* em cães. Na Espanha, foi relatado que 12 de 50 cães com *L. infantum* também estavam infectados por *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, apresentado uma soroprevalência de coinfecção de 24%, desses, cinco cães eram saudáveis e sete cães com manifestações clínicas de leishmaniose<sup>61</sup>. Um estudo molecular realizado na Grécia relatou uma coinfecção de 21,1% (8/38) em cães com leishmaniose<sup>62</sup>. No Brasil, estudo retrospectivo utilizou 335 amostras de soro de cães com suspeita de doenças transmitidas por vetores, toxoplasmose e neosporose. Dessas, 28 amostras (8,3%) apresentaram anticorpos IgG para *Bartonella* sp.. Entre as 28 amostras positivas, três (10,7%) foram positivas para *L. infantum*<sup>63</sup>. Isso poderia representar um problema para os cães com LV, visto que infecções bacterianas secundárias são associadas a complicações em hospedeiros com a doença e as bactérias poderiam estar relacionadas à ocorrência de manifestações clínicas da LV ou seu pior prognóstico<sup>64</sup>.

## 2. Objetivos

### 2.1. Geral

- Avaliar a ocorrência de infecção por *Bartonella henselae* em cães de Rondonópolis, MT, com suspeita clínica de leishmaniose visceral.

### 2.2. Específicos

- Comparar a sensibilidade entre PCR convencional, PCR de dupla amplificação e PCR em tempo real para o diagnóstico da infecção por *B. henselae* em cães;
- Isolar, por meio de cultura, cepa regional de *B. henselae*, a partir de amostras de sangue obtidas dos cães
- Comparar a detecção do DNA de *Leishmania* sp. em cães sem e com diagnóstico sorológico para leishmaniose visceral;
- Avaliar a prevalência da infecção por *B. henselae* em cães com suspeita clínica de leishmaniose visceral, com ou sem confirmação sorológica da infecção.

### 3. Metodologia

O projeto teve a ciência e dispensa de autorização do Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), através do documento Informação CEUA nº 2/2021 (Anexo 1), uma vez que as amostras foram doadas pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da prefeitura do município de Rondonópolis, MT, Brasil (Figura 1), com a anuência formal da veterinária responsável.

Foram utilizadas amostras de sangue de cães com alopecia, descamação da pele, onicogribose e/ou úlceras cutâneas no focinho ou na ponta da orelha. Pela suspeita clínica de LV, esses cães foram submetidos à investigação diagnóstica para a infecção.

O teste rápido imunocromatográfico (TR DPP® - *Dual path platform*) foi realizado no Laboratório de Análises do Centro de Controle de Zoonoses de Rondonópolis, MT, sendo as amostras positivas encaminhadas ao Laboratório Central do Estado de Mato Grosso (Lacen-MT) para realização do Elisa (Ensaio imunoenzimático), como exame confirmatório para infecção por *Leishmania* sp.. Tanto o teste rápido e quanto o Elisa seguiram as instruções do fabricante (Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

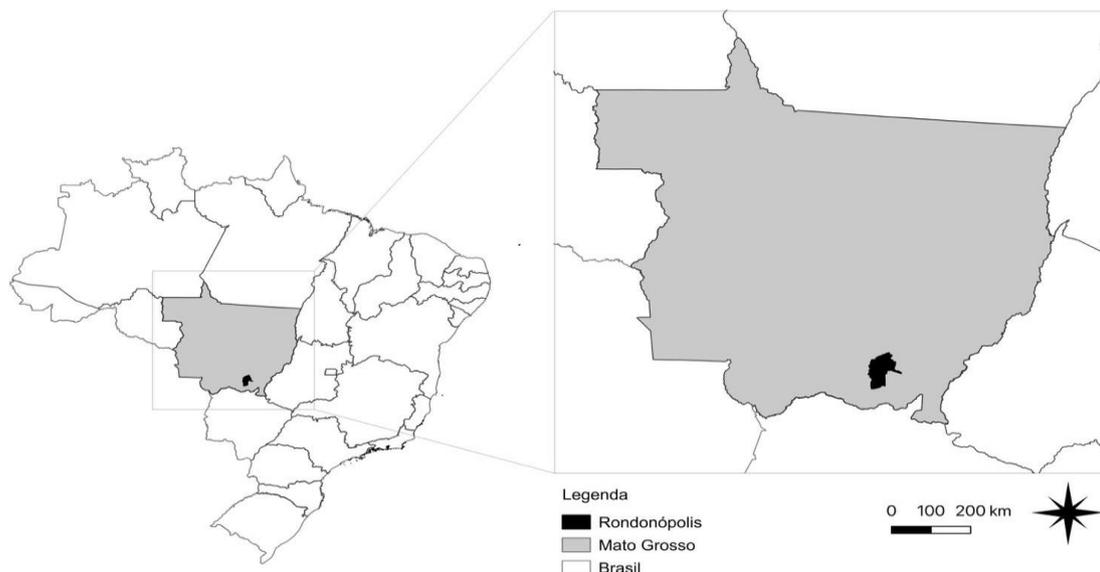


Figura 1. Mapa mostrando o estado de Mato Grosso na região Centro-Oeste do Brasil e a localização da cidade de Rondonópolis.

Cerca de 4 ml de sangue total de todos os cães com suspeita clínica de LV foram coletados assepticamente em tubos com EDTA (*ethylenediamine tetraacetic acid*) entre novembro de 2019 e março de 2020.

Os tubos contendo sangue com o EDTA foram congelados para lise das hemácias e conservados a -80°C no Laboratório de Citogenética na Universidade Federal de Rondonópolis (UFR) até serem enviados para o Laboratório de Pesquisa Aplicada em Dermatologia e Infecções por Bartonella – Padib, na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), por via aérea e sob refrigeração.

### **3.1. Extração do DNA a partir de sangue total**

A partir de amostras de sangue total, foi realizada a extração de DNA utilizando o E.Z.N.A.® Tissue DNA *kit* da Omega Bio Tek. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até a análise das amostras.

Para cada extração realizada foi adicionado um tubo controle chamado “branco de extração”, nesse tubo foram adicionadas todas as soluções da extração, exceto a amostra sanguínea.

### **3.2. Cultura líquida**

Utilizou-se meio de cultura líquido para crescimento de *Bartonella* spp., preparado conforme já descrito<sup>65</sup>. Após o período de congelamento, 1 ml de sangue foi inoculado em frasco de cultura de células contendo 2 ml de meio líquido enriquecido. Os frascos foram então mantidos em estufa a 35° C com 5% de CO<sub>2</sub>, em agitação contínua por 10 dias.

### **3.3. Cultura sólida**

Após os 10 dias de incubação da cultura líquida, 500 µL da suspensão da cultura líquida foi semeado em meio sólido contendo 30% de sangue de carneiro. O meio sólido foi produzido conforme já descrito por Drummond et al.<sup>28</sup>.

Os frascos de cultura foram mantidos a 35°C com 5% de CO<sub>2</sub>, em atmosfera saturada de água, por até 42 dias. As avaliações para a verificação do crescimento foram realizadas semanalmente. Ao observar crescimento característico da bactéria estudada, uma colônia foi coletada e corada pela coloração de Gram. Em caso de morfologia sugestiva do gênero (bactérias Gram-negativas e pequenas), o material foi coletado com auxílio de uma alça estéril e colocado no tampão de lise do E.Z.N.A.®

Tissue DNA *kit* da Omega Bio Tek e armazenado a -20°C para posterior extração de DNA.

### 3.4. Extração do DNA a partir da cultura líquida e da sólida

Após o período de incubação de 10 dias, 1 ml da cultura líquida foi coletado e, posteriormente, centrifugado 11.000x rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* submetido à extração de DNA.

A extração do DNA se deu na sequência utilizando o E.Z.N.A.® Tissue DNA *kit* da Omega Bio Tek. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até o momento de uso.

Foi adicionado um controle negativo que consiste no meio líquido incubado sem inóculo e submetido às mesmas condições que as amostras.

A extração da cultura sólida também foi realizada com o mesmo *kit* e de acordo com as orientações do fabricante.

Em todas as extrações foi adicionado também um controle (branco de extração) que consiste em um tubo em que somente são adicionadas as soluções da extração para garantir a ausência de contaminantes.

### 3.5. Amplificação do DNA

O DNA extraído foi testado por diferentes PCRs. Em todas as reações para as análises moleculares para pesquisa de *B. henselae* foram adicionados dois controles:

- negativo: tubo com todos os reagentes da reação e no lugar de DNA, foi adicionada a água utilizada na reação;
- positivos: a fim de determinar a sensibilidade e, portanto, o limite de detecção das reações, foram adicionadas diferentes diluições de DNA de *B. henselae*, conforme já descrito anteriormente <sup>28</sup>.

#### 3.5.1. PCR controle

Para assegurar a qualidade do DNA extraído e a inexistência de inibidores de amplificação, foi realizada uma PCR convencional das amostras extraídas de sangue e da cultura líquida a fim de amplificar um gene constitutivo, região da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) que codifica uma enzima expressa por células de todos os mamíferos <sup>66</sup>.

Para essa reação foi utilizada a enzima da Promega (GoTaq® Flexi DNA polymerase). O quadro abaixo apresenta detalhes dessa reação (Quadro 1).

PCR Controle ( <i>GAPDH</i> )		
GAPDH F: 5' – CCTTCATTGACCTCAACTACAT – 3'		
GAPDH R: 5' – CCAAACCTTGTCATGGATGACC – 3'		
Reagente	Volume (em $\mu\text{L}$ )	Ciclo
Água	11,32	
Tampão 5x incolor	5	95° C – 2'
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2	94° C – 15"
dNTP (10 $\mu\text{M}$ )	0,5	57° C – 15"
GADPH F (30 $\mu\text{M}$ )	0,5	72° C – 15"
GADPH R (30 $\mu\text{M}$ )	0,5	72° C – 2'
Taq (5U/ $\mu\text{L}$ )	0,18	4° C – $\infty$
<b>Total Mix:</b>	20	Tamanho esperado do fragmento: <b>350pb</b>
DNA	5	

**Quadro 1.** Protocolo da reação de cadeia da polimerase (PCR) controle com a sequência dos *primers*.

### 3.5.2. PCR de dupla-amplificação (*nested*)

O DNA extraído foi submetido à PCR *nested* espécie-específica para a região alvo que codifica o gene *ftsZ* que atua na divisão celular da *B. henselae*<sup>67</sup>.

Utilizou-se a enzima da Promega (GoTaq® Flexi DNA polymerase). Os quadros 2 e 3 apresentam detalhes dessa reação.

PCR <i>nested</i> ( <i>ftsZ</i> ) 1ª Reação – Para <i>Bartonella henselae</i>		
BH F: 5' – GCCGCAAAGTTCTTTTCATG – 3'		
BH R: 5' – AGGTGAACGCGCTTGATTTG – 3'		
Reagente	Volume (em $\mu\text{L}$ )	Ciclo
Água	12,875	
Tampão 5x incolor	5	95° C – 5'
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2	95° C – 1'
dNTP (10 $\mu\text{M}$ )	0,5	56° C – 1'
BH F (10 $\mu\text{M}$ )	1	72° C – 1'
BH R (10 $\mu\text{M}$ )	1	72° C – 5'
Taq (5U/ $\mu\text{L}$ )	0,125	4° C – $\infty$
<b>Total Mix:</b>	22,5	Tamanho esperado do fragmento: <b>354 pb</b>
DNA	2,5	

**Quadro 2.** Protocolo da reação em cadeia da polimerase (PCR) *nested*, primeira reação, com a sequência dos *primers*.

<b>PCR nested (<i>ftsZ</i>) 2ª Reação – Para <i>Bartonella henselae</i></b>		
BH S: 5' – CAAAACGGTTGGAGAGCGT – 3'		
BH A: 5' – CGCCTGTCATCTCATCAAGA – 3'		
Reagente	Volume (em µL)	Ciclo
Água	15,175	95° C – 5' 95° C – 1' 61° C – 1' 72° C – 1' 72° C – 5' 4° C – ∞ } 40 X
Tampão 5x incolor	5	
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2	
dNTP (10µM)	0,5	
BH S (10µM)	1	
BH A (10µM)	1	
Taq (5U/µL)	0,125	
<b>Total Mix:</b>	24,8	
DNA	0,2	

**Quadro 3.** Protocolo da reação em cadeia da polimerase (PCR) *nested*, segunda reação, com a sequência dos *primers*.

### 3.5.3. PCR convencional (*gltA*)

Todas as amostras foram testadas por PCR convencional para *Bartonella henselae* baseado na região *gltA*, do gene da citrato sintase (CS), também espécie-específica<sup>68</sup>.

Foi utilizada nessa reação a enzima Fast SYBR™ Green Master Mix. O quadro abaixo apresenta detalhes dessa reação (Quadro 4).

<b>PCR Convencional (<i>gltA</i>) – Para <i>Bartonella henselae</i></b>		
CS F: 5' – ATGGGTTTTGGTCATCGAGT – 3'		
CS R: 5' – AAATCGACATTAGGGTAAAGTTTTT – 3'		
Reagente	Volume (em µL)	Ciclo
Água	10,375	95° C – 5' 95° C – 30" 59° C – 1' 72° C – 30" 72° C – 5' 4° C – ∞ } 45 X
Tampão 5x incolor	5	
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2	
dNTP (10µM)	0,5	
CS F (10µM)	1	
CS R (10µM)	1	
Taq (5U/µL)	0,125	
<b>Total Mix:</b>	20	
DNA	5	

**Quadro 4.** Protocolo da reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional, baseado no gene *gltA*, com a sequência dos *primers*.

### 3.5.4. PCR em tempo real

O DNA extraído também foi submetido à PCR em tempo real qualitativo, cujos *primers* utilizados amplificam a região do gene da citrato sintase, *gltA*, também espécie-específica. Os *primers* utilizados são os mesmos da PCR convencional.

Essa reação foi realizada no sistema Sybr® Green utilizando a enzima Fast SYBR™ Green Master Mix (ThermoFisher Scientific). Detalhes da metodologia empregada já foram publicados previamente <sup>68</sup>. O quadro abaixo apresenta detalhes dessa reação (Quadro 5).

PCR em tempo real ( <i>gltA</i> ) – Para <i>Bartonella henselae</i>		
CS F: 5' – ATGGGTTTTGGTCATCGAGT – 3'		
CS R: 5' – AAATCGACATTAGGGTAAAGTTTTT – 3'		
Reagente	Volume (em µL)	Ciclo
Água	3	95°C – 20''
Master Mix	10	95°C – 3''
CS F (10µM)	1	60°C – 30''
CS R (10µM)	1	95°C – 15''
<b>Total Mix:</b>	15	60°C – 1'
DNA	5	85°C – 15''
Tamanho esperado do fragmento: <b>191pb</b>		4° C – ∞

**Quadro 5.** Protocolo da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real com a sequência dos *primers*.

### 3.5.5. PCR convencional (*kDNA*)

As amostras extraídas foram testadas por PCR convencional para *Leishmania* sp. previamente descrita <sup>69</sup>. Essa reação foi realizada utilizando a enzima da Promega (GoTaq® Flexi DNA polymerase). O quadro abaixo apresenta detalhes dessa reação (Quadro 6).

PCR Convencional ( <i>kDNA</i> )		
kDNA F: 5' – CCCTATTTACACCCAACCCC – 3'		
kDNA R: 5' – GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA – 3'		
Reagente	Volume (em $\mu\text{L}$ )	Ciclo
Água	9,75	94° C – 5' 94° C – 30" } 65° C – 30" } 35 X 72° C – 30" } 72° C – 5' 4° C – $\infty$
Tampão	5	
MgCl <sub>2</sub>	2	
dNTP	1	
kDNA F	1	
kDNA R	1	
Taq	0,25	
<b>Total Mix:</b>	20	
DNA	5	

**Quadro 6.** Protocolo da reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional (*kDNA*) com a sequência dos *primers*.

### 3.5.6. PCR convencional (*hsp 70*)

O DNA extraído também foi testado por PCR convencional para *Leishmania* spp., para o alvo *hsp 70*, conforme descrição prévia <sup>70</sup>. A enzima utilizada nessa reação foi do *kit* da Promega (GoTaq® Flexi DNA polymerase). Detalhes dessa PCR estão apresentados no quadro abaixo (Quadro 7).

PCR Convencional ( <i>hsp 70</i> )		
F 25: 5' – GGACGCCGGCAGATTCT – 3'		
R 1310: 5' – CCTGGTTGTTGTTTCAGCCACTC – 3'		
Reagente	Volume (em $\mu\text{L}$ )	Ciclo
Água	9,75	94° C – 3' 94° C – 30" } 60° C – 30" } 35 X 72° C – 1" } 72° C – 10' 4° C – $\infty$
Tampão	5	
MgCl <sub>2</sub>	2	
dNTP	1	
F 25	1	
R 1310	1	
Taq	0,25	
<b>Total Mix:</b>	20	
DNA	5	

**Quadro 7.** Protocolo da reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional (*hsp70*) com a sequência dos *primers*.

A figura 2, apresenta, de forma resumida, o fluxograma da metodologia realizada.

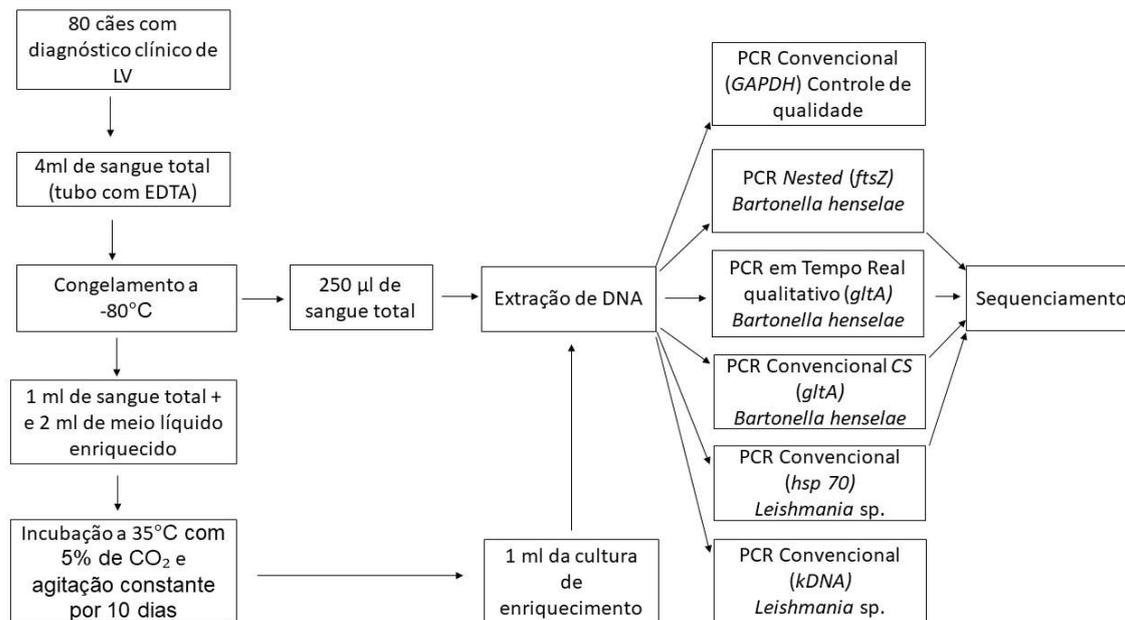


Figura 2. Fluxograma da metodologia utilizada no estudo.

### 3.6. Sequenciamento

Os amplificadores de boa qualidade e com quantidade suficiente, exceto os produtos da amplificação da PCR convencional para *kDNA*, por serem muito pequenos (120pb), foram encaminhados para o sequenciamento na empresa Genomic Engenharia Molecular e no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD) da Unicamp. Os cromatogramas foram analisados com o auxílio do *software* Chromas. Utilizando a ferramenta BLAST do National Center for Biotechnology Information (NCBI) foi possível comparar os resultados do sequenciamento com o banco de dados do GenBank®.

### 3.7. Análise estatística

Para a obtenção da prevalência da infecção por *B. henselae*, os resultados foram estatisticamente avaliados assim como a relação entre as diferentes PCR para determinação do método mais eficaz para o diagnóstico da bacteremia causada por esta bactéria em cães. Os resultados das PCRs para a detecção de DNA de *Leishmania* sp. em animais com suspeita de LV sem e com confirmação diagnóstica também foram comparados. Foi realizada a análise estatística descritiva e comparativa, utilizando teste exato de Fisher e teste qui-quadrado ( $p < 0,05$ ).

## 4. Resultados

No presente estudo, 80 amostras de sangue de cães com suspeita clínica de LV foram analisadas por meio de métodos moleculares para a infecção de *B. henselae* e com testes sorológicos e moleculares para *Leishmania* sp..

Todas as amostras extraídas e testadas para o gene constitutivo amplificaram na PCR controle (*GAPDH*), assegurando a qualidade e a presença de DNA amplificável na amostra extraída.

As sensibilidades obtidas pelas diversas PCRs realizadas para detectar DNA de *B. henselae* foram de 20 equivalentes genômicos (EG) para a PCR convencional, cinco EG de DNA na PCR de dupla amplificação (*nested*) e dez EG na PCR em tempo real conforme mostra o Quadro 8.

**Quadro 8.** Limite de detecção de cada reação em cadeia da polimerase (PCR) realizada

PCR	Região	Limite de detecção da reação
PCR controle de qualidade	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase ( <i>GAPDH</i> )	Não se aplica
PCR convencional	Gene <i>gltA</i> de <i>B. henselae</i>	20 EG
PCR <i>nested</i>	Gene <i>ftsZ</i> de <i>B. henselae</i>	5 EG
PCR em tempo real	Gene <i>gltA</i> de <i>B. henselae</i>	10 EG

EG: equivalente genômico

Os dados estão apresentados no diagrama de Venn para visualizar quantas amostras foram positivas em cada reação e se houve amostras positivas em mais de uma PCR para a bactéria.

Na figura 3A, são apresentados os resultados das PCRs realizadas para detecção de *B. henselae* a partir do DNA de amostras de sangue. A PCR convencional para a região citrato sintase (*gltA*) foi a mais eficiente, com o total de 25 amostras positivas. A PCR *nested* foi a segunda reação mais eficiente com seis amostras positivas. Houve diferença estatística na sensibilidade diagnóstica da PCR convencional em relação à PCR *nested* ( $p=0,000$ , teste qui-quadrado). A reação menos eficiente para a detecção de DNA foi a PCR em tempo real com o total de quatro amostras positivas ( $p=0,000$ , teste de Fisher).

Na figura 3B, estão representados os resultados das PCRs realizadas a partir do DNA extraído da cultura líquida para *Bartonella* spp.. A PCR mais eficiente nessas amostras foi a PCR *nested*, com o total de 21 amostras positivas. A PCR em tempo real foi a segunda mais eficiente com o total de cinco amostras positivas ( $p=0,000$ ,

teste qui-quadrado) e a PCR convencional (*gltA*) foi a reação menos eficiente para esse tipo de amostra apresentando o total de quatro amostras positivas ( $p=0,000$ , teste de Fisher).

O DNA de *B. henselae* foi detectado em 43 de 80 indivíduos (53,75%), conforme observado nas tabelas 1 e 2. Dos 43 indivíduos positivos, três foram detectados apenas por PCR em tempo real, 11 apenas por PCR *nested* e 13 apenas por PCR convencional. Dezesesseis foram positivos em duas reações de PCR, como pode ser observado na figura 3 C.

Embora nas amostras de sangue total a PCR convencional para o gene *gltA* tenha sido mais sensível e nas amostras de cultura líquida tenha sido a PCR *nested* para o gene *ftsZ*, não houve diferença estatística entre elas considerando os 43 animais diagnosticados com infecção por *B. henselae* por estas reações ( $p=0,641$ , teste qui-quadrado). A PCR em tempo real foi capaz de detectar isoladamente três dos 43 animais com a infecção bacteriana (Fig. 3C).

Comparando a PCR em tempo real com a reação convencional e com a *nested*, as duas últimas se mostraram muito mais sensíveis ( $p=0,000$  para ambas, teste exato de Fisher).

Não houve detecção do DNA de *B. henselae* em todas as reações de PCR de uma mesma amostra (Fig 3C).

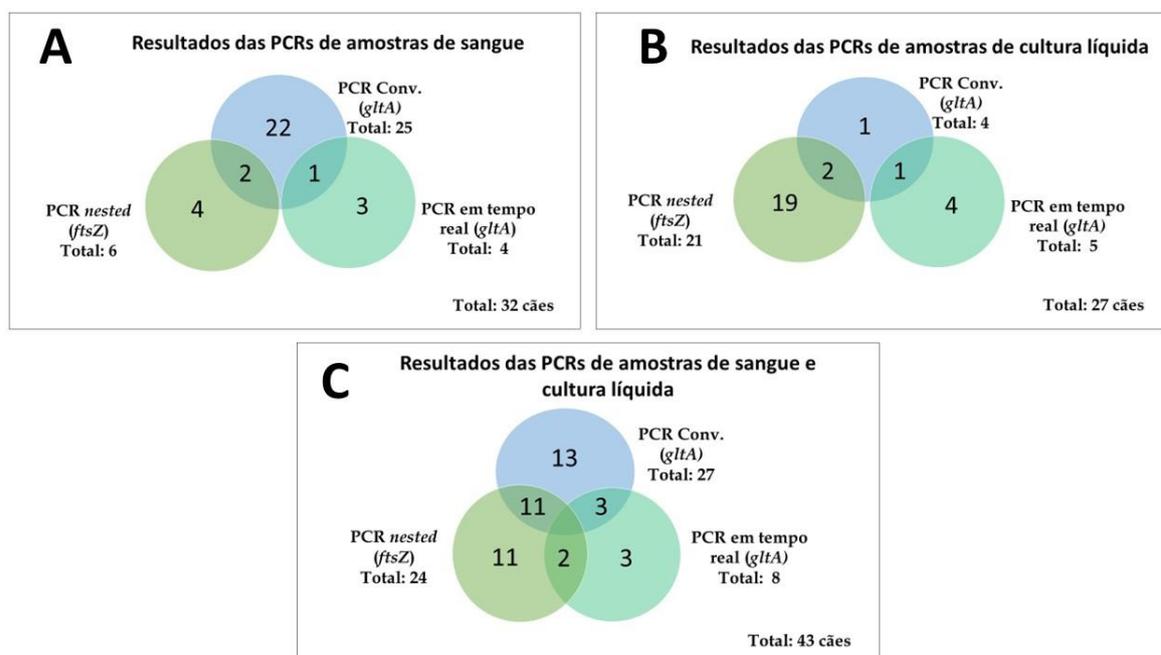


Figura 3. Resultados das reações moleculares para detecção de DNA de *Bartonella henselae*. A: resultados das reações de cadeia da polimerase (PCRs) positivas de DNA extraído de amostras de sangue; B: resultados das PCRs positivas de DNA extraído de cultura líquida; C: resultados das PCRs positivas de DNA extraído de amostras de sangue e de cultura líquida.

Foi possível isolar uma colônia sugestiva de *Bartonella* sp. que foi confirmada por reações moleculares (cão 71).

Na figura 4 estão representados os cães com codeteção de *B. henselae* e *Leishmania* sp.. De 43 amostras positivas para *B. henselae*, 28 (65,11%) foram positivas também para *Leishmania* sp.. Estes resultados podem ser também observados na tabela 1.

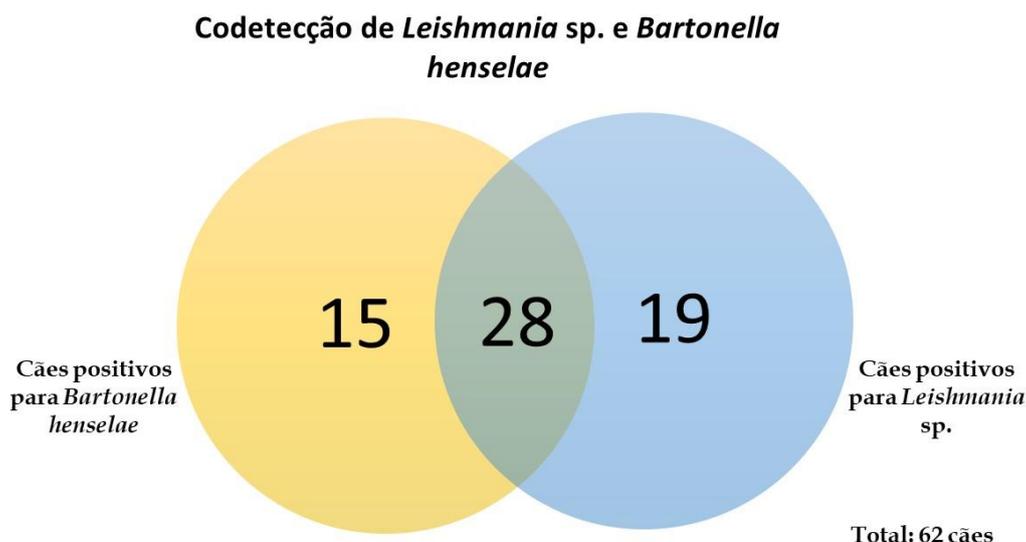


Figura 4. Cães com detecção do DNA de *Leishmania* sp. e de *Bartonella henselae* e aqueles com codeteção dos microrganismos.

Dos 80 cães analisados, 45 (56,25%) foram sororreagentes no teste rápido e no Elisa para *L. infantum*, portanto, com diagnóstico sorológico para LV. Nas amostras sanguíneas destes 45 animais, foi possível detectar o DNA de *B. henselae* em 26 (57,77%), conforme se observa nas tabelas 1 e 2. Dentre estas 26 amostras, em cinco (19,23%) também foi detectado o DNA de *Leishmania* sp.. O DNA de *Leishmania* sp. foi detectado em outros quatro dos 45 animais com diagnóstico clínico e sorológico de LV, totalizando a detecção molecular do parasita em nove (20%) destes cães (Tabela 1).

Nenhum dos 31 cães com teste rápido negativo (e Elisa, portanto, não realizado) teve detecção de DNA de *Leishmania* sp.. Destes 31 animais, 14 (45,16%) tiveram DNA de *B. henselae* detectado (Tabela 1).

Quatro cães apresentaram teste rápido positivo e não foram reagentes no Elisa, portanto sem diagnóstico sorológico confirmado para LV. Destes, dois apresentaram positividade para *Leishmania* sp. e *B. henselae* e um apenas para *B. henselae* nos testes moleculares. Esses dados estão apresentados na tabela 1.

Os resultados do total de cães com suspeita clínica de LV sem e com confirmação sorológica estão sumarizados na tabela 2. Não houve diferença estatística entre os dois grupos de animais ( $p=0,552$ ). Tanto os cães com confirmação sorológica de LV quanto os cães sem confirmação, apresentaram alta prevalência de detecção do DNA de *Bartonella* sp. por PCR.

Tabela 1: Resultado das reações em cadeia da polimerase para *Leishmania* sp. e *Bartonella henselae*

Condição sorológica	Agentes detectados nas PCR	Quantidade de cães	Identificação dos animais no estudo	Alvo cPCR <i>Leishmania</i> sp. sangue	Número de amostras PCR <i>Leishmania</i> sp.	Sequenciamento	Número de amostras sequenciamento <i>Leishmania</i> sp.	PCR <i>B. henselae</i> (tipo de amostras)	Número de amostras PCR <i>B. henselae</i>	Sequenciamento	Número de amostras sequenciamento <i>B. henselae</i>		
TR: - Elisa: NR	nenhum	dezessete	2, 3, 4, 9, 13, 14, 32, 34, 35, 38, 39, 44, 49, 51, 58, 65, 76	--	--	--	--	--	--	--	--		
	<i>Leishmania</i> sp.	zero	--	--	--	--	--	--	--	--	--		
	<i>B. henselae</i>	quatorze	8, 11, 12, 17, 23, 25, 31, 33, 45, 46, 60, 73, 75, 78	--	--	--	--	cPCRg (SG)	5	<i>B. henselae</i> NR NC	3 10 1		
								NT (SG)	1				
								NT (SG e CL)	1				
NT (CL)								3					
NT (CL) e cPCRg (SG)								2					
NT (CL) e cPCRg (CL)	1												
RT (SG)	1												
<i>Leishmania</i> sp. e <i>B. henselae</i>	zero	--	--	--	--	--	--	--	--	--			
TR: + Elisa: -	nenhum	um	64	--	--	--	--	--	--	--	--		
	<i>Leishmania</i> sp.	zero	--	--	--	--	--	--	--	--	--		
	<i>B. henselae</i>	um	28	--	--	--	--	NT (CL); cPCRg (SG)	1	NR	1		
	<i>Leishmania</i> sp. e <i>B. henselae</i>	dois	41; 66	Hsp 70	2	NR	2	RT (CL) + cPCRg (SG e CL)	1	NC	2		
RT (SG e CL)								1					
TR: + Elisa: +	nenhum	quinze	16, 18, 24, 26, 30, 36, 50, 57, 59, 61, 67, 68, 69, 79, 80	--	--	--	--	--	--	--	--		
	<i>Leishmania</i> sp.	quatro	53, 56, 72, 77	Hsp 70;	2	<i>L. infantum</i>	4	--	--	--	--		
				Hsp 70 e kDNA;	2								
	<i>B. henselae</i>	Vinte e um	1, 5, 7, 10, 19, 20, 21, 22, 27, 29, 40, 42, 47, 48, 52, 54, 55, 62, 63, 71, 74	--	--	--	--	--	--	<i>B. henselae</i> NR NC	5 10 6		
												cPCRg (SG)	5
												NT (CL)	5
												NT (CL e SG)	1
												NT (CL) + cPCRg (SG)	4
												NT (CL) + cPCRg (SG e CL)	1
												NT (CL) + RT (SG)	1
NT (SG) + CS (SG)												1	
NT (SG e CL) + cPCRg (SG)	1												
RT (CL) + cPCRg (SG)	1												
RT (SG) + cPCRg (SG)	1												
<i>Leishmania</i> sp. e <i>B. henselae</i>	cinco	6, 15, 37, 43, 70	Hsp 70 e kDNA	3	<i>L. infantum</i> NR	3	2	cPCRg (SG)	3	<i>B. henselae</i> NR	1 4		
			kDNA	1									
			RT (CL)	1									
Hsp 70	1	NT (SG) + RT (CL)	1										

Legenda: (+): reagente; (-): não reagente; NR: não realizado; NC: não conclusivo No: número; *B. henselae*: *Bartonella henselae*; *L. infantum*: *Leishmania infantum*; cPCR Hsp70: PCR convencional para o alvo Hsp70; cPCR kDNA: PCR convencional para o alvo kDNA; cPCRg: PCR convencional para o gene *gtIA*; NT: PCR *nested Bartonella henselae*-específico para o gene *ftsZ*; RT: PCR tempo real qualitativo *Bartonella henselae*-específico para gene *gtIA*; (--): não se aplica; SG: sangue; CL: cultura líquida

Tabela 2. Resumo da detecção de DNA de *Bartonella henselae* em cães com suspeita clínica de leishmaniose visceral

Suspeita clínica	Com detecção de DNA de <i>B. henselae</i> (%)	Total	Valor de p
Sem confirmação sorológica	17 (48,57)	35	
Com confirmação sorológica	26 (57,77)	45	
Sem e com confirmação sorológica	43 (53,75)	80	0,552

As nove amostras que amplificaram na reação específica para *B. henselae* e que foram confirmadas por sequenciamento apresentaram similaridade com sequências depositadas no GenBank® (código de acesso para a região *gltA* KT945243.1 e para a região *ftsZ* foi HG965802.1).

## 5. Discussão

Embora alguns autores considerem a necessidade de pelo menos duas PCRs visando dois genes diferentes para a detecção molecular de DNA de *Bartonella* sp.<sup>71</sup> ser considerada infecção, Spach e Hanson afirmaram, em uma revisão recente sobre as bartoneloses em humanos, que uma PCR que detecte o DNA de *Bartonella* sp. já seria o suficiente para o diagnóstico de infecção por esse agente, considerando a natureza fastidiosa dessas bactérias e a baixa bacteremia<sup>72</sup>. A mesma lógica poderia ser usada para outros hospedeiros conhecidos, como os cães.

Nesse estudo foi documentada por técnica molecular a codetecção e a possível coinfeção por *L. infantum* e *B. henselae* em cães com suspeita clínica de LV em Rondonópolis, MT.

Na perspectiva *One Health* tanto a infecção por *B. henselae* quanto por *L. infantum* são bastante relevantes por serem zoonoses transmitidas por vetores e potencialmente fatais. Ambas são doenças que afetam, não apenas, mas também populações pobres, com precárias condições sanitárias e que tem contato direto com animais e com ectoparasitas, embora as bartoneloses nem constem na lista da Organização Mundial de Saúde de doenças negligenciadas<sup>13; 53</sup>.

Cães e humanos com LV podem apresentar manifestações clínicas semelhantes às causadas por bactérias do gênero *Bartonella*, sobretudo à *B. henselae* – a principal espécie a causar doença em humanos e em *pets*<sup>14; 34</sup> – febre, anemia e hepatoesplenomegalia em humanos<sup>46; 73</sup> e linfonodomegalia e alterações oftalmológicas em cães<sup>51; 52</sup>. Cães são reservatórios de muitos patógenos para o homem, inclusive os dois patógenos desse estudo<sup>48; 74</sup>. Apesar disto, há poucos estudos sobre a infecção por esta bactéria concomitante à infecção por *L. infantum*<sup>61; 62; 63</sup>.

A concomitância de infecções acontece também na bartonelose peruana, causada pela *B. bacilliformis*, endêmica na região dos Andes. Nesta doença, a infecção pela bactéria cursa com imunodeficiência que leva a infecções oportunistas, muitas vezes fatais, por outros agentes, assim como acontece na LV<sup>5; 49</sup>.

O papel da coinfeção por *Bartonella* sp. e *Leishmania* sp. em cães precisa ser melhor investigado, visto que infecções bacterianas secundárias são associadas a complicações em hospedeiros com LV, humanos ou animais<sup>64</sup>. A coinfeção dos dois agentes poderia também estar relacionada à facilitação simbiótica, fenômeno que ocorre quando há interação com efeito benéfico entre um microorganismo e outro de espécie diferente. Esta possibilidade vem ganhando destaque na literatura científica.

Um grupo de pesquisadores do Instituto de Biologia da Unicamp recentemente revisou em um estudo sobre coinfeções bacterianas e *Leishmania* spp. que um mesmo hospedeiro pode estar coinfectado por diferentes microrganismos e estes manterem relação de antagonismo, neutra ou de facilitação.<sup>64</sup> A ausência de significância estatística entre a prevalência da detecção do DNA de *B. henselae* entre os cães sem e com confirmação sorológica do diagnóstico de LV (Tabela 2) fala a favor de não haver facilitação simbiótica e favorece uma relação neutra.

A codetecção de *Bartonella* sp. e *Leishmania* sp. pode acontecer inclusive no vetor, uma vez que uma nova linhagem de *Bartonella* sp. foi identificada no México em flebotomíneo da espécie *Pintomyia ovallesi*, ainda que a codetecção por estas bactérias com *Leishmania* sp. não tenha sido ocorrido em nenhum espécime de flebotomíneo avaliado nesse estudo de Lozano-Sardaneta e colaboradores<sup>75</sup>.

Um fator que dificulta o entendimento da coinfeção entre estes agentes é que o diagnóstico da infecção por *Bartonella* sp. é desafiador. O grupo de pesquisa da Unicamp tem se dedicado a demonstrar esta dificuldade diagnóstica tanto em estudos com animais como com humanos<sup>4; 14; 28; 76; 77; 78; 79</sup>. Idealmente, para o diagnóstico de bartoneloses, dever-se-ia usar uma plataforma de testes sorológicos, microbiológicos e moleculares, como previamente discutido em recente publicação de Drummond e colaboradores<sup>80</sup>.

No presente estudo, o DNA de *B. henselae* foi detectado em 26 amostras sanguíneas, porém não foram detectadas nas amostras de cultura líquida utilizando as mesmas reações. Isto pode ser explicado pelo efeito diluição no meio de cultura líquida e, possivelmente, por não ter havido o crescimento bacteriano. A bactéria foi detectada no sangue, mas após o inóculo em meio líquido a concentração de DNA ficou abaixo do nível de detecção<sup>81</sup>.

Sobre as diferentes PCRs utilizadas para o diagnóstico de *B. henselae*, chama a atenção o fato de que a PCR *nested*, apesar de ter apresentado uma maior sensibilidade analítica (diluição mínima de equivalente genômico de DNA de cepa padrão que amplificam em todas as reações) que foi de 5 EG, a PCR convencional (com sensibilidade analítica de 20 EG) foi quem apresentou maior sensibilidade diagnóstica quando a amostra testada foi o sangue. A sensibilidade diagnóstica da PCR convencional foi melhor inclusive do que da PCR em tempo real (sensibilidade analítica de 10 EG) nas amostras sanguíneas.

Há que se observar que nas amostras de sangue total a PCR convencional detectou o DNA de *B. henselae* num maior número de animais e que a PCR *nested* foi mais eficaz nas amostras de cultura líquida. Contudo, não houve diferença estatística

entre as duas PCRs quando comparadas todas as amostras, de sangue total e cultura líquida, como observado na figura 3.

Foi possível isolar colônia de *B. henselae* de um dos cães que foi confirmada por PCR. O isolamento de *Bartonella* spp. a partir de amostras de cães é um desafio, conforme já documentado por Breitschwerdt & Kordick<sup>82</sup>.

Considerando que cães são reservatórios da *B. henselae* e que em mais da metade dos animais com clínica de LV foi possível detectar o DNA da bactéria, os moradores de Rondonópolis, MT, estão potencialmente expostos a infecções por esse agente. Como os cães são os animais domiciliados que mais tem contato com pessoas, liderando o *ranking* de animal de estimação no Brasil<sup>83</sup>, há a necessidade de se conhecer a prevalência da infecção por *Bartonella* spp. também em humanos na mesma região para compreender sua distribuição e os fatores de riscos associados à infecção por estas bactérias. Também há que se investigar se os sintomas que levaram à suspeita clínica de LV nos cães sem confirmação sorológica para a protozoose poderiam ser causados pela *B. henselae* naqueles animais com detecção do DNA bacteriano nas amostras sanguíneas.

Além de servirem potencialmente como sentinelas para a infecção por *L. infantum* em humanos, os cães com hipótese clínica de LV e que não tenham confirmação diagnóstica laboratorial deveriam ser investigados para infecção por *B. henselae*, uma vez que em cães, e mesmo em humanos, as doenças causadas por estes agentes podem ter manifestações clínicas comuns<sup>46; 51; 52</sup>. Da mesma forma, a prevalência da detecção do DNA da bactéria em humanos com LV deve ser investigada a partir da possibilidade de os agentes causarem um quadro clínico similar e, na perspectiva *One Health*, dos achados de um mesmo hospedeiro estar coinfectado, como sugere o observado nos cães deste estudo: 28 de 80 (35,00%) animais com codetecção na pesquisa molecular e 26 dos 45 (57,77%) cães com diagnóstico sorológico de LV.

O diagnóstico de LV é mais bem estabelecido<sup>57; 84</sup>, porém o presente estudo demonstrou que o critério sorológico utilizado ainda permite resultados falsos negativos.

As amostras analisadas apresentaram uma taxa alta de infecção por *Bartonella* sp. em indivíduos com diagnóstico clínico e sorológico de LV e com detecção de *Leishmania* sp. quando comparada a estudos já realizados com os mesmos agentes infecciosos, sendo na Grécia uma prevalência de 21,1% (8/38) e na Espanha, 24% (12/50)<sup>61; 62</sup>. Isso pode ter ocorrido devido a utilização, no presente estudo, de uma plataforma de reações moleculares para amostras e alvos diferentes ao invés de uma única reação molecular de triagem como na Grécia e sorologia na Espanha.

A baixa bacteremia é comum na infecção por bartonelas em humanos e em cães<sup>27; 80</sup>. Esse fato pode ter como consequência resultados falso negativos em testes moleculares. Isso pode acontecer por causa da distribuição aleatória das bactérias nas diferentes alíquotas, fazendo que em determinada reação o número de cópias esteja perto ou abaixo do limite de detecção da reação<sup>81</sup>. Por isso, se faz necessária a combinação de várias técnicas<sup>28</sup>.

A coleta de sangue é menos invasiva quando comparado a aspirados do baço, da medula óssea e de linfonodos para a realização de testes sorológicos e moleculares no diagnóstico de LV canina. O sangue, porém, é considerado uma fonte pobre de DNA de *Leishmania* sp. devido ao fato do parasita preferir outros sítios como baço e medula óssea, sendo a parasitemia ocasional<sup>85</sup>.

Mesmo assim, 28 dos 43 (52,83%) animais infectados por *B. henselae* também estavam infectados por *Leishmania* sp. mostrando a alta prevalência da codetecção e possível coinfeção em cães com suspeita clínica de LV. Mais da metade dos cães com clínica para LV (56,25%) tiveram confirmação diagnóstica pelo TR e pelo Elisa. Dos animais com LV confirmada, mais da metade (57,77%) estavam coinfectados por *B. henselae*.

A pesquisa molecular para *Leishmania* sp. foi negativa em todos os animais com TR negativo, mostrando a alta sensibilidade do teste de triagem sorológica para LV.

Contudo, entre os poucos animais com TR positivo e Elisa não reagente, a detecção de DNA de *Leishmania* sp. foi estatisticamente comparável à detecção entre os cães com confirmação sorológica da LV por Elisa. Isto sugere que a pesquisa molecular para este parasita deva ser feita nos animais com discordância diagnóstica à sorologia. Este achado deve levar à reavaliação dos critérios diagnósticos de LV em cães pelas autoridades sanitárias do país.

## 6. Conclusão

Os resultados deste estudo apontam que, usando uma plataforma de testes moleculares, houve a detecção do DNA de *B. henselae* em mais da metade dos cães com clínica para leishmaniose visceral de Rondonópolis, MT, Brasil.

A reação com a detecção do DNA de *B. henselae* em maior número de animais foi a PCR convencional (*gltA*), mas não houve diferença estatística na sensibilidade em relação à *nested* PCR.

O teste rápido foi bastante sensível para excluir a detecção do DNA de *Leishmania* sp. nas amostras sanguíneas, mas houve detecção do DNA dos parasitas em duas das quatro amostras com sorodiscordância entre o teste rápido e o Elisa. Há necessidade de novos estudos para a definição pelas autoridades sanitárias do país dos critérios diagnósticos de LV em cães.

Os resultados também sugerem que novos estudos são necessários para se entender o papel da bactéria em cães com suspeita clínica com e sem confirmação diagnóstica para LV, uma vez que cerca de um em cada dois cães com suspeita de zoonose sem confirmação sorológica estavam infectados por *B. henselae* e o mesmo aconteceu nos cães com confirmação do diagnóstico.

## 7. Referências

- <sup>1</sup> LAMAS, C. et al. Human bartonellosis: seroepidemiological and clinical features with an emphasis on data from Brazil - a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 3, p. 221-35, 2008. ISSN 0074-0276.
- <sup>2</sup> ROLAIN, J. M. et al. Culture and antibiotic susceptibility of *Bartonella quintana* in human erythrocytes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 2, p. 614-9, 2003. ISSN 0066-4804.
- <sup>3</sup> OKARO, U. et al. *Bartonella* Species, an Emerging Cause of Blood-Culture-Negative Endocarditis. **Clin Microbiol Rev**, v. 30, n. 3, p. 709-746, 2017. ISSN 0893-8512.
- <sup>4</sup> LSD, S. et al. Prevalence of infection by *Bartonella* spp. in patients with psoriasis. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 96, n. 1, 2021. ISSN 1806-4841. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33281011> >.
- <sup>5</sup> MINNICK, M. F. et al. Oroya Fever and Verruga Peruana: Bartonelloses Unique to South America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e2919, 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002919> >.
- <sup>6</sup> PONS, M. J. et al. Carrion's Disease: More Than a Sand Fly-Vectored Illness. **PLoS Pathog**, v. 12, n. 10, p. e1005863, 2016. ISSN 1553-7366.
- <sup>7</sup> RUIZ, J. *Bartonella quintana*, past, present, and future of the scourge of World War I. **Apmis**, v. 126, n. 11, p. 831-837, 2018. ISSN 0903-4641.
- <sup>8</sup> FOUCAULT, C. et al. *Bartonella quintana* Bacteremia among Homeless People. **Clin Infect Dis**, v. 35, n. 6, p. 684-9, 2002. ISSN 1058-4838.
- <sup>9</sup> FACCINI-MARTÍNEZ Á, A. et al. *Bartonella* spp. and *Typhus* Group Rickettsiae among Persons Experiencing Homelessness, São Paulo, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 29, n. 2, p. 418-421, 2023. ISSN 1080-6040.
- <sup>10</sup> SHEPARD, Z. et al. *Bartonella quintana* Infection in People Experiencing Homelessness in the Denver Metropolitan Area. **J Infect Dis**, v. 226, n. Suppl 3, p. S315-s321, 2022. ISSN 0022-1899.
- <sup>11</sup> REGNERY, R. L. et al. Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. **J Clin Microbiol**, v. 30, n. 2, p. 265-74, 1992. ISSN 0095-1137.

- 12 WELCH, D. F. et al. *Rochalimaea henselae* sp. nov., a cause of septicemia, bacillary angiomatosis, and parenchymal bacillary peliosis. **J Clin Microbiol**, v. 30, n. 2, p. 275-80, 1992. ISSN 0095-1137.
- 13 LINS, K. A.; DRUMMOND, M. R.; VELHO, P. Cutaneous manifestations of bartonellosis. **An Bras Dermatol**, v. 94, n. 5, p. 594-602, 2019. ISSN 0365-0596.
- 14 PITASSI, L. H. U. et al. *Bartonella* spp. Bacteremia in Blood Donors from Campinas, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. e0003467, 2015. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003467> >.
- 15 KALOGEROPOULOS, D. et al. *Bartonella henselae*- and *quintana*-associated uveitis: a case series and approach of a potentially severe disease with a broad spectrum of ocular manifestations. **Int Ophthalmol**, v. 39, n. 11, p. 2505-2515, 2019. ISSN 0165-5701.
- 16 MAZUR-MELEWSKA, K. et al. Cat-scratch disease: a wide spectrum of clinical pictures. **Postepy Dermatol Alergol**, v. 32, n. 3, p. 216-20, 2015. ISSN 1642-395x.
- 17 MAGGI, R. G. et al. Infection with *Bartonella henselae* in a Danish family. **J Clin Microbiol**, v. 53, n. 5, p. 1556-61, 2015. ISSN 0095-1137.
- 18 DINIZ, P. P. V. P. et al. Canine bartonellosis: serological and molecular prevalence in Brazil and evidence of coinfection with *Bartonella henselae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*. **Veterinary research**, v. 38, n. 5, 2007. ISSN 0928-4249. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17583666> >.
- 19 BREITSCHWERDT, E. B. Bartonellosis, One Health and all creatures great and small. **Veterinary dermatology**, v. 28, n. 1, 2017. ISSN 1365-3164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28133871> >.
- 20 FONTALVO, M. C. et al. *Bartonella* species pathogenic for humans infect pets, free-ranging wild mammals and their ectoparasites in the Caatinga biome, Northeastern Brazil: a serological and molecular study. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, 2017. ISSN 1678-4391. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28249707> >.
- 21 DEL VALLE-MENDOZA, J. et al. Molecular identification of *Bartonella bacilliformis* in ticks collected from two species of wild mammals in Madre de Dios: Peru. **BMC Res Notes**, v. 11, n. 1, p. 405, 2018. ISSN 1756-0500.
- 22 CHOMEL, B. B. et al. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 8, p. 1952-6, 1996. ISSN 0095-1137.

- 23 LIN, J. W.; CHEN, C. M.; CHANG, C. C. Unknown fever and back pain caused by *Bartonella henselae* in a veterinarian after a needle puncture: a case report and literature review. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 11, n. 5, p. 589-91, May 2011. ISSN 1530-3667.
- 24 OLIVEIRA, A. M. et al. Suspected needle stick transmission of *Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffii* to a veterinarian. **J Vet Intern Med**, v. 24, n. 5, p. 1229-32, 2010. ISSN 0891-6640.
- 25 COTTÉ, V. et al. Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 7, p. 1074-80, 2008. ISSN 1080-6040.
- 26 DUNCAN, A. W.; MAGGI, R. G.; BREITSCHWERDT, E. B. 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. **J Microbiol Methods**, v. 69, n. 2, p. 273-81, 2007. ISSN 0167-7012.
- 27 BREITSCHWERDT, E. B. et al. Bartonellosis: an emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings. **J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)**, v. 20, n. 1, p. 8-30, Feb 2010. ISSN 1476-4431.
- 28 DRUMMOND, M. R. et al. Improvement of *Bartonella henselae* DNA Detection in Cat Blood Samples by Combining Molecular and Culture Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 5, 2018. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29540455> >.
- 29 PAPPALARDO, B. L. et al. Granulomatous disease associated with *Bartonella* infection in 2 dogs. **J Vet Intern Med**, v. 14, n. 1, p. 37-42, 2000. ISSN 0891-6640.
- 30 BILLETTER, S. A. et al. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. **Med Vet Entomol**, v. 22, n. 1, p. 1-15, 2008. ISSN 0269-283x.
- 31 LASHNITS, E. et al. *Bartonella* spp. seroepidemiology and associations with clinicopathologic findings in dogs in the United States. **J Vet Intern Med**, v. 36, n. 1, p. 116-125, 2022. ISSN 0891-6640.
- 32 DINIZ, P. P. V. P. 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**, v. 38, n. 5, 2007. ISSN 0928-4249. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17583666> >.
- 33 ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, A.; BREITSCHWERDT, E. B.; SOLANO-GALLEGU, L. *Bartonella* infections in cats and dogs including zoonotic aspects. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, 2018. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30514361> >.

- 34 CHOMEL, B. B. et al. *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. **Emerging infectious diseases**, v. 12, n. 3, 2006. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16704774> >.
- 35 SOLANO-GALLEGO, L. et al. *Bartonella henselae* IgG antibodies are prevalent in dogs from southeastern USA. **Vet Res**, v. 35, n. 5, p. 585-95, 2004. ISSN 0928-4249.
- 36 BRENNER, E. C. et al. *Bartonella* infection in urban and rural dogs from the tropics: Brazil, Colombia, Sri Lanka and Vietnam. **Epidemiology and infection**, v. 141, n. 1, 2013. ISSN 1469-4409. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22459880> >.
- 37 MÜLLER, A. et al. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* and *B. henselae* in dogs. **Epidemiology and infection**, v. 146, n. 9, 2018. ISSN 1469-4409. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29729679> >.
- 38 SILVA, B. T. G. D. et al. *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* infection, hematological changes and associated factors in domestic cats and dogs from an Atlantic rain forest area, Brazil. **Acta Trop**, v. 193, p. 163-168, 2019. ISSN 0001-706x.
- 39 ANDRÉ, M. R. et al. Aortic valve endocarditis due to *Bartonella clarridgeiae* in a dog in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 4, p. 661-670, 2019. ISSN 1984-2961. Disponível em: < <https://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612019078> >.
- 40 NEVES, L. C. et al. Detection of *Rickettsia* spp. in Animals and Ticks in Midwestern Brazil, Where Human Cases of Rickettsiosis Were Reported. **Animals (Basel)**, v. 13, n. 8, 2023. ISSN 2076-2615.
- 41 DE MACEDO, L. O. et al. Vector-borne pathogens of zoonotic concern in dogs from a Quilombola community in northeastern Brazil. **Parasitol Res**, v. 121, n. 11, p. 3305-3311, 2022. ISSN 0932-0113.
- 42 SOLANO-GALLEGO, L. et al. A review of canine babesiosis: the European perspective. **Parasit Vectors**, v. 9, n. 1, p. 336, Jun 11 2016. ISSN 1756-3305.
- 43 HAMER, S. A.; SAUNDERS, A. B. Veterinary Chagas Disease (American Trypanosomiasis) in the United States. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 52, n. 6, p. 1267-1281, Nov 2022. ISSN 0195-5616.
- 44 DANTAS-TORRES, F. et al. Canine Leishmaniasis Control in the Context of One Health. **Emerg Infect Dis**, v. 25, n. 12, p. 1-4, 2019. ISSN 1080-6040.
- 45 CARVALHO, A. G. et al. Factors associated with *Leishmania* spp. infection in domestic dogs from an emerging area of high endemicity for visceral leishmaniasis in Central-

- Western Brazil. **Research in veterinary science**, v. 125, 2019. ISSN 1532-2661. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31260840> >.
- 46 PEDROSA, C. M. S.; ROCHA, E. M. M. D. Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose visceral em menores de 15 anos procedentes de Alagoas, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 4, p. 300-304, 2004. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <https://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822004000400003> >.
- 47 WHO. leishmaniasis. 2023. Disponível em: < [www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis) >.
- 48 CARVALHO, A. G. et al. High seroprevalence and peripheral spatial distribution of visceral leishmaniasis among domestic dogs in an emerging urban focus in Central Brazil: a cross-sectional study. **Pathog Glob Health**, v. 112, n. 1, p. 29-36, 2018. ISSN 2047-7724.
- 49 DONATO, L. E. et al. Visceral leishmaniasis lethality in Brazil: an exploratory analysis of associated demographic and socioeconomic factors. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32935778> >.
- 50 ÁVILA, I. R. et al. Occurrence of human visceral leishmaniasis in the Central-West region of Brazil: A systematic review. **Acta Trop**, v. 237, p. 106707, Jan 2023. ISSN 0001-706x.
- 51 KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Vet Pathol**, v. 51, n. 2, p. 527-38, 2014. ISSN 0300-9858.
- 52 MELÉNDEZ-LAZO, A. et al. Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: Comparison of five different clinical classification systems. **Res Vet Sci**, v. 117, p. 18-27, 2018. ISSN 0034-5288.
- 53 LUZ, J. G. G. et al. Human visceral leishmaniasis in Central-Western Brazil: Spatial patterns and its correlation with socioeconomic aspects, environmental indices and canine infection. **Acta tropica**, v. 221, 2021. ISSN 1873-6254. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34029529> >.
- 54 MATSUMOTO, P. S. S. et al. Impact of the dog population and household environment for the maintenance of natural foci of *Leishmania infantum* transmission to human and animal hosts in endemic areas for visceral leishmaniasis in Sao Paulo state, Brazil. **PloS one**, v. 16, n. 8, 2021. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34464421> >.
- 55 DONALISIO, M. R. et al. Visceral leishmaniasis in an environmentally protected area in southeastern Brazil: Epidemiological and laboratory cross-sectional investigation of

- phlebotomine fauna, wild hosts and canine cases. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 7, p. e0005666, 2017. ISSN 1935-2727.
- 56 ATLAS, R. M. One Health: its origins and future. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 365, p. 1-13, 2013. ISSN 0070-217x.
- 57 Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 2014. Disponível em: < [https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmanios\\_e\\_visceral\\_1edicao.pdf](https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmanios_e_visceral_1edicao.pdf) >.
- 58 SUNDAR, S.; SINGH, O. P. Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Mol Diagn Ther**, v. 22, n. 4, p. 443-457, 2018. ISSN 1177-1062.
- 59 BRASIL. **Nota Técnica Conjunta nº 1/2011**. Brasília. Ministério da Saúde. 2011.
- 60 DONATO, L. E. et al. Vigilância e controle de reservatórios da leishmaniose visceral no Brasil: aspectos técnicos e jurídicos. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 11, n. 2, p. 18-23, 2013. ISSN 2596-1306. Disponível em: < <https://dx.doi.org/10.36440/recmvz.v11i2.16219> >.
- 61 ROURA, X. et al. Serological Evidence of Exposure to *Rickettsia*, *Bartonella*, and *Ehrlichia* Species in Healthy or *Leishmania infantum*-Infected Dogs from Barcelona, Spain. **Intern J Appl Res Vet Med** v. Vol. 3, n. No. 2, p. 129-137, 2005.
- 62 MYLONAKIS, M. E. et al. Molecular identification of *Bartonella* species in dogs with leishmaniosis (*Leishmania infantum*) with or without cytological evidence of arthritis. **Veterinary microbiology**, v. 174, n. 1-2, 2014. ISSN 1873-2542. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25258172> >.
- 63 GONÇALVES, L. R. et al. Serological evidence of exposure to *Bartonella* sp. in dogs with suspected vector-borne diseases, toxoplasmosis and neosporosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 31, n. 3, 2022. ISSN 1984-2961. Disponível em: < <https://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612022050> >.
- 64 GALLO-FRANCISCO, P. H.; BROCCHI, M.; GIORGIO, S. *Leishmania* and its relationships with bacteria. **Future microbiology**, v. 17, 2022. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35040703> >.
- 65 MAGGI, R. G.; DUNCAN, A. W.; BREITSCHWERDT, E. B. Novel chemically modified liquid medium that will support the growth of seven *Bartonella* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, 2005. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15956379> >.
- 66 BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian

- genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4172-4177, 2003. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <https://dx.doi.org/10.1128/jcm.41.9.4172-4177.2003> >.
- 67 KAWASATO, K. H. et al. Detection of *Bartonella henselae* DNA in clinical samples including peripheral blood of immune competent and immune compromised patients by three nested amplifications. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 55, n. 1, p. 1-6, 2013. ISSN 0036-4665.
- 68 DRUMMOND, M. R. et al. Cryptogenic hepatitis patients have a higher *Bartonella* sp.-DNA detection in blood and skin samples than patients with non-viral hepatitis of known cause. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 16, n. 7, p. e0010603, 2022. ISSN 1935-2727.
- 69 DE ANDRADE, H. M. et al. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Vet Parasitol**, v. 140, n. 3-4, p. 231-8, 2006. ISSN 0304-4017.
- 70 MONTALVO, A. M. et al. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, n. 7, p. 1453-61, 2012. ISSN 0934-9723.
- 71 EDOUARD, S. et al. *Bartonella*, a common cause of endocarditis: a report on 106 cases and review. **J Clin Microbiol**, v. 53, n. 3, p. 824-9, 2015. ISSN 0095-1137.
- 72 SPACH, D. H. et al. **Microbiologic diagnosis of *Bartonella* infections**. IN: GULICK, R. M.;M.D., et al. <https://www.uptodate.com/contents/microbiologic-diagnosis-of-bartonella-infections> 2022.
- 73 BARBOSA, I. R. Leishmaniose Visceral Humana no município de Natal-RN: análise clínico-epidemiológica e espacial. **Revista Ciência Plural**, v. 2, n. 1, p. 89-101, 2016. ISSN 2446-7286. Disponível em: < <https://dx.doi.org/10.21680/2446-7286.2016v2n1id8559> >.
- 74 KORDICK, D. L. et al. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* subsp. nov., Isolated from Dogs; *Bartonella vinsonii* subsp. *vinsonii*; and Emended Description of *Bartonella vinsonii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 3, p. 704-709, 1996. ISSN 0020-7713. Disponível em: < <https://dx.doi.org/10.1099/00207713-46-3-704> >.
- 75 LOZANO-SARDANETA, Y. N. et al. Molecular detection of *Wolbachia* and *Bartonella* as part of the microbiome of phlebotomine sand flies from Chiapas, Mexico. **Parasitol Res**, 2023. ISSN 0932-0113.
- 76 SILVA, M. N. et al. *Bartonella henselae* transmission by blood transfusion in mice. **Transfusion**, v. 56, n. 6 Pt 2, p. 1556-9, 2016. ISSN 0041-1132.

- 77 DRUMMOND, M. R. et al. Detection of *Bartonella henselae* in defibrinated sheep blood used for culture media supplementation. **Braz J Microbiol**, v. 42, n. 2, p. 430-2, 2011. ISSN 1517-8382.
- 78 \_\_\_\_\_. Cryptogenic hepatitis patients have a higher *Bartonella* sp.-DNA detection in blood and skin samples than patients with nonviral hepatitis of known cause. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 16, n. 7, p. e0010603, 2022. ISSN 1935-2727.
- 79 \_\_\_\_\_. Detection of *Bartonella henselae* DNA in the blood of patients with livedoid vasculopathy. **An Bras Dermatol**, 2023. ISSN 0365-0596.
- 80 DRUMMOND, M. et al. Comparison of molecular methods for *Bartonella henselae* detection in blood donors. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. In print,
- 81 WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Appl Environ Microbiol**, v. 63, n. 10, p. 3741-51, 1997. ISSN 0099-2240.
- 82 BREITSCHWERDT, E. B.; KORDICK, D. L. Bartonella infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 13, n. 3, p. 428-38, Jul 2000. ISSN 0893-8512. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10885985>>.
- 83 Censo Pet IPB: com alta recorde de 6% em um ano, gatos lideram crescimento de animais de estimação no Brasil. 2022. Disponível em: <<https://institutopetbrasil.com/fique-por-dentro/amor-pelos-animais-impulsiona-os-negocios-2-2/>>.
- 84 BRASIL. **Nota Técnica Conjunta nº 1/2011**. Brasília. Ministério da Saúde. 2011.
- 85 REALE, S. et al. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 9, p. 2931-5, 1999. ISSN 0095-1137.

## 8. Anexo

### 8.1. Documento da Comissão de Ética no Uso de Animais da Unicamp

INFORMAÇÃO CEUA nº 2/2021



CEUA/Unicamp

## INFORMAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP – CEUA/UNICAMP – esclarece que não há necessidade de submeter o projeto de pesquisa “Prevalência da infecção por Bartonella spp. em cães”, de responsabilidade dos pesquisadores Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho, Verônica Domingos Miranda, Marina Rovani Drummond e Luciene Silva dos Santos, para análise desta comissão.

Justifica-se por se tratar de pesquisa que envolve o uso de tecido animal (sangue de cães), com doação pelo Centro de Controle de Zoonoses do município de Rondonópolis/MT. O projeto terá como objetivo avaliar a prevalência da infecção por Bartonella spp. em cães. A correspondente declaração de doação de material biológico foi devidamente apresentada à CEUA, tendo sido assinada pela Médica Veterinária Mariana de Medeiros Torres (CRMV/MT 3217) em 15/05/2020, sob responsabilidade da recepção do material e experimentação pela Técnica em Análises Clínicas da Universidade Federal de Rondonópolis (MT) Verônica Domingos Miranda (SIAPE 2182916). Não haverá, assim, manipulação *in vivo* na UNICAMP para a execução do projeto.

Campinas, 12 de março de 2021.

---

Prof. Dr. Wagner José Fávaro  
Presidente da CEUA/UNICAMP

---

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO, COORDENADOR CEUA/UNICAMP**, em 12/03/2021, às 19:59 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

---



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:  
[sigad.unicamp.br/verifica](http://sigad.unicamp.br/verifica), informando o código verificador:  
**6AAD3A62 027E4DD8 9CD60591 0A8D9CAB**

