

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E
PARASITÁRIAS

VALTER DOS SANTOS CUENCA

INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE *Bartonella* spp. EM DOADORES DE SANGUE NO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO

CAMPO GRANDE, MS

2021

VALTER DOS SANTOS CUENCA

INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE *Bartonella* spp. EM DOADORES DE SANGUE NO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a orientação da Prof. Dra. Alexandra Rodrigues de Mendonça Favacho.

CAMPO GRANDE, MS
2021

VALTER DOS SANTOS CUENCA

INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE *Bartonella* spp. EM DOADORES DE SANGUE NO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a orientação da Prof. Dra. Alessandra Rodrigues de Mendonça Favacho.

A banca examinadora, após avaliação do trabalho, atribuiu ao candidato o conceito **aprovado**

Campo Grande, MS, 30 de setembro de 2021

BANCA EXAMINADORA

AVALIAÇÃO

Prof. Dra. Alessandra Rodrigues de Mendonça Favacho – **Presidente**

Aprovado

Prof. Dra. Ana Lúcia Oliveira – **Titular**

Aprovado

Prof. Dra. Silvia Naomi de Oliveira Uehara – **Titular**

Aprovado

Prof. Dra. Gláucia Elisete Barbosa Marcon – **Suplente**

Aprovado

DEDICATÓRIA

Aos meus pais (Bernardino e Natividade) que fizeram grandes esforços para proporcionarem a melhor educação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, ao grande pai celestial, por ter me concedido a vida. Dou-lhe graças a tudo que tenho conquistado;

Aos meus pais e irmãos pelo apoio que sempre precisei;

Ao meu filho Luís Felipe, que me dá forças para continuar tudo na vida;

À minha querida Evanir que sempre me apoiou em tudo que faço;

À minha querida Nídia (prima – madrinha) que sempre acreditou em mim e proporcionou o importante início do meu estudo;

À minha querida Diane (Lala), Dorly, tia Nina e tio Carmelo, que sempre mantiveram presentes e torcendo na minha vida;

À minha querida professora Dra. Alexsandra Favacho, que tem o dom de orientar, cativa a todos com suas orientações, tanto acadêmicas quanto para vida. Obrigado por ser tão especial e amiga. Você sempre fez mais que suas funções de orientadora. Obrigado por tudo;

Ao professor Dr. Eduardo Ferreira que foi meu orientador na Iniciação Científica. Isso foi fundamental para iniciar o Mestrado;

À minha querida professora Vânia Nunes, que sempre acreditou no meu potencial, pelos conselhos que deu durante toda jornada acadêmica, mas que levarei para vida inteira;

As minhas queridas amigas Camila Maria e Marana Soares, que quando estive internado, me ajudaram nas atividades de laboratório. Gratidão eterna;

Ao grande amigo Fábio Venâncio, sua ajuda na estatística foi de grande valia;

Aos doadores, que propuseram na doação do sangue, para que este trabalho fosse realizado;

Aos colaboradores e Grupo *Bartonella* do HEMORIO que se propuseram a ajudar no projeto de pesquisa;

Agradeço a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS; ao Programa de Pós-Graduação de Doenças Infecciosas e Parasitárias – PPGDIP; a Coordenação da Pós e equipe, que sempre prezaram no atendimento das nossas necessidades e por fim, a todos professores pelos ensinamentos;

À Fiocruz Mato Grosso do Sul por viabilizar o suporte financeiro por meio de auxílio ao projeto de pesquisa (PAPES VII);

À UNIDERP pela cedência da infraestrutura laboratorial. A toda equipe e alunos de iniciação científica do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada da Universidade Anhanguera-UNIDERP, que sempre me ajudaram e me apoiaram durante a realização deste trabalho. Em especial agradeço a Laís, aluna de Iniciação Científica, que foi meu braço direito para a conclusão deste projeto.

Aos colegas de turma, foram dois anos juntos, com muito companheirismo e cumplicidade. Espero que continuemos sempre em contato;

Aos professores meus sinceros agradecimentos pelos conhecimentos transmitidos, contribuindo com o meu crescimento pessoal e acadêmico;

Agradeço imensamente pelas contribuições das idéias e conhecimentos das Dra. Ana Lúcia Oliveira, Gláucia Marcon e Silvia Uehara;

À professora Dra. Ana Rita de Castro do Laboratório de Imunologia Clínica (LIC) – CCBS/UFMS, que proporcionou todo espaço necessário para o uso do laboratório, sempre gentil e prestativa; as técnicas Larissa e “Ritinha”, que auxiliaram no que foi necessário para os meus experimentos; a Tayane, por trabalharmos juntos em projetos e que sempre mostrou disponibilidade para ajudar;

A todos que diretamente e indiretamente fizeram parte deste momento importante da minha vida, o meu muitíssimo obrigado.

*"Ciência. Nessas palavras algumas explicações.
Muitos não tem ciência do que é a Ciência.
Ciência é transformação;
_____ é criação;
_____ é cuidado;
_____ é amor e abdicção;
_____ é vida;
_____ é liberdade;
_____ é o orgulho da nação;
_____ é paciência;
Ciência que alguns negam precisar, está em todo lugar;
Exemplos vou citar:
_____ é o analgésico para sua dor curar;
_____ é o computador! é o próprio pesquisador;
_____ é alimento;
_____ é vacina;
_____ é tudo que você olhar.
_____ não tem fronteiras muito menos donos.
E agora, tem ciência do que é Ciência?"*

Valter dos Santos Cuenca

RESUMO

Bartonella spp. são proteobactérias Gram-negativas fastidiosas de isolamento difícil que infectam eritrócitos e células endoteliais, e podem causar infecções assintomáticas à morbidade grave, inclusive condições potencialmente fatais em humanos. A transmissão acidental ao homem ocorre por inoculação da bactéria após contato traumático, mordedura ou arranhões de animais infectados, ou por vetores artrópodes hematófagos (flebotomíneos, pulgas, piolhos, moscas picadoras, carrapatos, e potencialmente os triatomíneos). Este estudo analisou a prevalência de *Bartonella* spp. em doadores de sangue do Hemocentro de Referência do estado do Rio de Janeiro, Brasil. Trata-se de um estudo transversal com dados primários. Foi coletado sangue periférico por amostragem de conveniência de doadores, no ano de 2018. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) do HEMORIO (Nº 409/16) e um questionário epidemiológico foi entregue aos doadores participantes. As amostras de soro foram analisadas para a presença de anticorpos IgG contra *Bartonella henselae*, utilizando o kit *Bartonella henselae* IFA IgG por reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Das 501 amostras de doadores de sangue, 12% (60/501) apresentaram anticorpos IgG anti-*B. henselae*, com cut-off igual ou superior a 64. Segundo análise socioepidemiológica entre os doadores sororreagentes, 18 (30%) eram do sexo feminino e 42 (70%) do sexo masculino; idade entre 18 e 65 anos (média de idade foi de 37,55 anos), todos residentes da região metropolitana do estado Rio de Janeiro, sendo a maioria do município do Rio de Janeiro (41/68,3%) e o contato com animais e vetores foi relatado, mas não houve variáveis significativas ($p \leq 0.05$) pelos testes Qui-quadrado ou exato de Fisher, quando avaliados: gênero, cor/raça, exposição com vetores, contato com animais e faixa etária. Pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional foram utilizados 3 iniciadores específicos direcionados aos genes da proteína citrato sintase (*gltA*), da proteína de choque térmico (*htrA*) e da subunidade beta da RNA polimerase (*rpoB*). A presença de DNA de *Bartonella* na corrente sanguínea foi detectada em 0,2% (01/501) dos doadores para o gene *gltA*. A sequência obtida apresentou 100% de semelhança a *Bartonella henselae*. Os resultados deste estudo indicam evidência sorológica significativa de *Bartonella henselae* em doadores de sangue no estado do Rio de Janeiro e faz-se necessário a adição da *Bartonella* spp. na lista de agentes de transmissão transfusional na triagem de rotina em doadores de sangue.

PALAVRAS CHAVES: *Bartonella* sp., doadores de sangue, doença da Arranhadura de Gato, prevalência.

ABSTRACT

Bartonella spp. are fastidious, difficult to isolate, Gram-negative proteobacteria. *Bartonella* spp. infect erythrocytes and endothelial cells, and can cause asymptomatic infections with severe morbidity, including potentially fatal conditions in humans. Accidental transmission to man occurs by inoculation of the bacteria after trauma, bites, or scratches from infected animals, or by hematophagous arthropod vectors (sand flies, fleas, lice, biting flies, ticks, and potentials triatomines). This study analyzed the prevalence of *Bartonella* spp. in blood donors from the reference blood center in the state of Rio de Janeiro, Brazil. This is a cross-sectional study with primary data. Peripheral blood was collected by donor convenience sampling in 2018. The study was approved by the Research Ethics Committee (CEP) of HEMORIO (No. 409/16), and an epidemiological questionnaire was given to participants donors. Serum sample was analyzed for the presence of IgG against *Bartonella henselae*, using the *Bartonella henselae* IFA IgG kit (Focus, USA) by Indirect Immunofluorescence Reaction (RIFI). Of the 501 blood donor samples, 12% (60/501) were positive for IgG anti *B. henselae*, with a cut-off titer of 64. Among seroreactive donors, 18 (30%) were female and 42 (70%) were male; aged between 18 and 65 years (mean age 37.48 years), all residents of the metropolitan region of the state of Rio de Janeiro, with the majority from the municipality of Rio de Janeiro (41 or 68.3%). There were no statistical significances ($p \leq 0.05$) in chi-square test, between being seropositive for *Bartonella* and gender, Ethnicity, exposure with vectors, contact with animals and age. The conventional polymerase chain reaction (PCR) technique with 3 specific primers, namely, the citrate synthase protein gene (*gltA*), the heat shock protein gene (*htrA*) and the gene encoding the beta subunit of RNA polymerase (*rpoB*). Were used to test the blood donors samples the presence of DNA *Bartonella* in the bloodstream was detected in 0.2% (01/501) of donors only in the *gltA* initiator. PCR the sequence obtained showed 100% similarity to *Bartonella henselae*. The results of the study indicate serological evidence of *Bartonella henselae* in blood donors in the state of Rio de Janeiro and it is necessary the inclusion of *Bartonella* spp. in the list of agents of transfusional transmission during routine screening of blood donors.

KEYWORDS: *Bartonella*, blood donors, Cat's scratch disease, prevalence.

LISTAS DE ABREVIACÕES SÍMBOLOS E SIGLAS

%	Percentual
A+	Amostra positiva
C-	Controle negativo
C+	Controle positivo
°C	Graus celsius
µL	Microlitro
AB	Angiomatose Bacilar
AIDS	Em inglês, <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> . Em português – tradução livre - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAPGM	Em inglês - <i>Bartonella alpha-Proteobacteria growth médium</i> . Em português – tradução livre, meio de crescimento para <i>Bartonella</i> - Alphaproteobacteria
CCBS	Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
CEP	Comissão de ética para pesquisa
CO-	Monóxido de carbono
COVID-19	Em inglês, <i>Coronavirus Disease- 19</i> . Em português - Tradução livre, Doença do Coronavírus - 19
DAG	Doença da Arranhadura do Gato
DC	Doença de Carrion
DNA	Em inglês: <i>deoxyribonucleic acid</i> . ADN. Em português – tradução livre - ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxinucleosídeo trifosfatado
EDTA	Em inglês, <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> . Em português – tradução livre - ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Em inglês: ELISA, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> . Em português – tradução livre, ensaio enzimático ligado a enzima
FO	Febre de Orroya
FT	Febre das Trincheiras

GENBANK	Banco de dados de sequências de nucleotídeos publicamente disponíveis e suas traduções de proteínas
gltA	Gene da proteína citrato sintase
HEMORIO	Hemorrede do Estado do Rio de Janeiro-RJ
HIV	Em inglês: <i>human immunodeficiency virus</i> . Em português – tradução livre, vírus da imunodeficiência humana
HTLV	Em inglês: <i>Human T-cell Lymphotropic Vírus</i> . Em português – tradução livre, Vírus Linfotrópico de Células T Humanas
htrA	Gene da proteína de choque térmico
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
LIC	Laboratório de Imunologia Clínica
Min.	Minuto
MIX	Mistura
N ou N°	Número
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pb	Pares de base
PBS	Em inglês: <i>phosphate buffered saline</i> . Em português – tradução livre - Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PM	Peso Molecular
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RJ	Rio de Janeiro
RNA	Em inglês: <i>ribonucleic acid</i> . Em português – tradução livre - ácido ribonucleico
rpoB	Gene que codifica a subunidade beta da RNA
S	Segundo
SINAN	Sistema de Informações de Agravos de Notificação
spp.	Espécies
SYBR® Safe	Corante de cianina usado em Eletroforese na biologia molecular

TBE	Tris/Ácido Bórico/EDTA
TCLE	Termo de compromisso livre e esclarecido
TLR4	Receptor do tipo Toll 4 que detecta lipolissacarídeo (LPS)
TLR5	Receptor do tipo Toll-like 5 que reconhece a flagelina bacteriana a partir da invasão de bactérias móveis
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
VP	Verruga Peruana

LISTAS DE FIGURAS

	páginas
Figura 1. Classificação taxonômica das Proteobactérias.	18
Figura 2. Visão holística da estratégia comum de infecção por <i>Bartonella</i> na transmissão de um vetor artrópode.	23
Figura 3. Imagem comparativa entre os resultados das técnicas de PCR após a utilização prévia ou não do meio de crescimento para <i>Bartonella</i> - Alphaproteobacteria (BAPGM).	28
Figura 4. Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI (A) reativa e (B) Não reativa para <i>Bartonella henselae</i> (Laboratório de Análises Clínica (LAC - UFMS), aumento de 400x).	40
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1.2% corado com SYBR® Safe para protocolo de PCR convencional baseada no gene <i>gltA</i> . As bandas correspondem à amplificação de aproximadamente 380 - 400pb do referido gene de amostras de DNA extraídas de amostra de sangue. Legenda: Controle negativo (C-), Controle positivo (C+), Peso molecular 100pb (PM), amostra positiva de sangue (A+).	44

LISTAS DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Titulação de anticorpos anti- <i>Bartonella henselae</i> pelo teste imunofluorescência indireta nas amostras de dos doadores de sangue, distribuído por gênero e contato com animais e vetores, no Rio de Janeiro – RJ, 2021. (N=60)	41
Tabela 2. Perfil entre doadores de sangue sororreagentes , com exposição prévia a <i>Bartonella</i> spp. detectada por sorologia, em comparação a contato com animais e vetores. Rio de janeiro, RJ 2021 – (N=60)	41
Tabela 3. Análise de fatores de risco entre doadores de sangue que tiveram contato com <i>Bartonella</i> detectada por sorologia, em comparação com não infectados. Rio de janeiro, RJ 2021 – (N=501)	42

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Espécies ou subespécies de <i>Bartonella</i> , seus hospedeiros reservatórios e as doenças causadas.	19
Quadro 2. Protocolos de PCR convencional utilizados para detecção molecular de <i>Bartonella</i> spp.	37

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTAS DE ABREVIACÕES, SÍMBOLOS E SIGLAS	IX
LISTAS DE FIGURAS	XII
LISTAS DE TABELAS	XIII
LISTA DE QUADROS	XIV
1 INTRODUÇÃO	17
2 CONTEXTUALIZAÇÃO	18
2.1 Considerações gerais – <i>Bartonella</i> spp.	18
2.2 Transmissão	21
2.3 Epidemiologia	24
2.4 Bartoneloses	25
2.5 Diagnósticos	27
2.6 Medicina transfusional	29
2.7 Doadores de sangue	30
2.8 <i>Bartonella</i> em doadores de sangue	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivo específico	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Tipo de estudo e local	33
4.2 Aspectos éticos	33
4.3 Seleção das amostras	33
4.4 Teste sorológico	34
4.4.1 Modo de preparo da reação de imunofluorescência indireta (RIFI)	34
4.5 Testes moleculares	35
4.5.1 Extração de DNA	35
4.5.2 PCR convencional para o gene endógeno da proteína de ligação aos retinóides inter-fotorreceptores (IRBP)	36

4.5.3 PCR convencional para <i>Bartonella</i> sp	36
4.5.4 Eletroforese	38
4.6 Sequenciamento	39
4.7 Análise estatística	39
5 RESULTADOS	40
5.1 Teste Sorológico	40
5.2 Testes Moleculares	44
5.2.1 Análise da PCR convencional para o IRBP	44
5.2.2 Análise da PCR convencional para <i>Bartonella</i> spp.	44
5.2.3 Análise do sequenciamento	45
6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÕES	49
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
9 ANEXOS	65
Anexo I - Parecer de ética em pesquisa do HEMORIO.	65
Anexo II – Ficha do SINAN <i>rickettsioses</i>	67

1 INTRODUÇÃO

Bartonella é uma bactéria estudada em todos os continentes. Embora seja endêmica em algumas regiões da América Latina, tem sido negligenciada na maioria dos países. Em alguns países, como Colômbia, Peru e Equador, principalmente nos vales andinos, onde a prevalência é mais de 80%, tem chamado atenção em decorrência de sua importância como problema de saúde pública. Várias espécies dessa bactéria têm sido associadas às doenças emergentes e re-emergentes, que causam infecções agudas e crônicas, e que podem ser sintomáticas, ou mais preocupante, assintomáticas (KOSEK *et al.*, 2000; LIU, EREMEEVA e LI, 2012; BREITSCHWERDT, 2017).

Bartoneloses são doenças causadas por *Bartonella*, seja ela de qualquer espécie. No entanto, são zoonoses com crescente número de casos confirmados, cuja importância na saúde pública se caracteriza, apesar da baixa letalidade, pela elevada prevalência em determinadas regiões. As bartoneloses humanas mais conhecidas são a doença de Carrión (DC), febre das trincheiras (FT), doença da arranhadura do gato (DAG) e angiomatose bacilar (AB). Apresentam grande diversidade de manifestações clínicas como febre, fadiga, insônia, linfadenopatia, esplenomegalia, endocardite, neurorretinites entre outras. Nos pacientes imunossuprimidos e imunodeprimidos, essas manifestações podem agravar (LIU, EREMEEVA e LI, 2012; MADA *et al.*, 2021).

O conceito de Saúde Única (do inglês – *One Health*) abrange os estudos inerentes entre humanos, animais e o ambiente, tendo participações interdisciplinares para que políticas públicas gerem consciência global sobre o assunto. Nesse cenário, trabalhos sobre *Bartonella* demonstram novas descobertas de vetores, espécies e subespécies desta bactéria e sua relação com animais, humanos e o ambiente (BREITSCHWERDT, 2017; MACKENZIE & JEGGO, 2019).

O surgimento de uma ampla variedade de hospedeiros e vetores dessas bactérias, é refletido por um aumento constante no número de artigos publicados no mundo sobre *Bartonella* nas últimas 2 décadas, em comparação aos períodos anteriores. No Brasil há poucos trabalhos de prevalência de infecção por *Bartonella* sp. em humanos assintomáticos. Assim, *Bartonella* em doadores de sangue chama atenção, principalmente, para o indivíduo com a imunidade comprometida e que pode vir precisar da transfusão de sangue.

2 CONTEXTUALIZAÇÃO

2.1 Considerações gerais – *Bartonella* spp.

Bactérias do gênero *Bartonella* pertencem à Classe *Alfa-Proteobacteria*, Ordem *Rhizobiales* e Família *Bartonellaceae* (Figura 1). O gênero foi proposto há 116 anos quando em 1905 Alberto Barton identificou o agente etiológico da doença de Carrión, observando esfregaços sanguíneos de pacientes com a febre de Oroya. Posteriormente, essa bactéria foi nomeada como *Bartonella bacilliformis* em sua homenagem (KUYKENDALL, 2006; MINNICK *et al.*, 2014). Noguchi (1926) demonstrou a transmissão mecânica de *B. bacilliformis* por *Dermacentor andersoni* entre primatas (*Macaca mulatta*). Mas, somente em 1994 foram publicados mais estudos sobre esta bactéria e assim, nesses 27 anos houve um rápido aumento do número de espécies, e com certeza, irão expandir ainda mais este gênero de bactérias (BREITSCHWERDT, 2017; NÚÑEZ *et al.*, 2017).

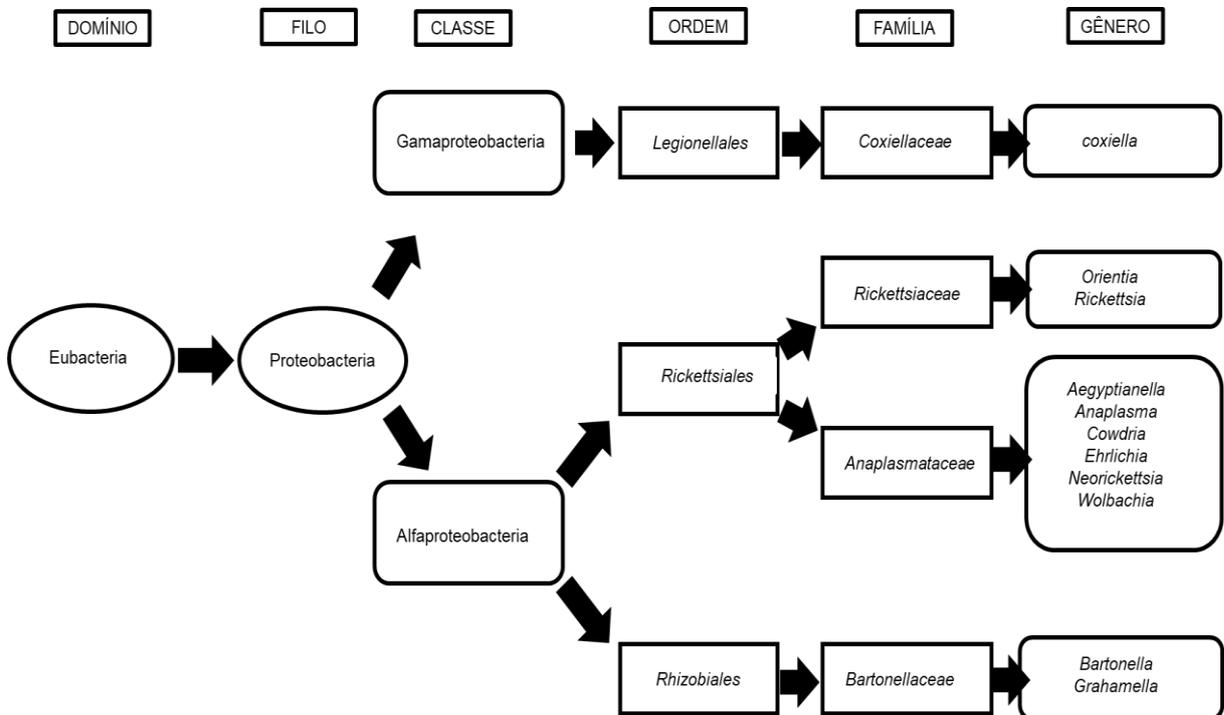


Figura 1. Classificação taxonômica das Proteobactérias. Fonte: adaptado de Lemos, 2018.

Bartonella são microrganismos Gram-negativos (cocos ou bacilos), facultativamente intracelular, classificada dentro do grupo da classe da Alpha-Proteobactérias, da família *Bartonellaceae*, e tem relação filogenéticas com a ordem *Rickettsiales*. Elas apresentam homologia, similaridade e evolução com os membros do gênero *Brucella* spp., *Afipia* spp., *Agrobacterium tumefaciens*, *Bradyrhizobium* spp. e *Bosea* spp. (BRENNER *et al.*, 1993; BIRTLES *et al.*, 1995; DUNCAN *et al.*, 2007; LEMOS, 2018). São microrganismos anaeróbios e considerados fastidiosos pelo fato de precisar de ambiente equilibrado para o seu crescimento *in vitro*, pois necessita de temperatura de 37°C com 5% de gás carbônico, ágar enriquecido com sangue (5% - 10%), ou em meio de solução de soro fetal bovino ou cultura de tecido (BRENNER *et al.*, 1993; MAGGI; DUNCAN; BREITSCHWERDT, 2005; PITASSI *et al.*, 2015; BREITSCHWERDT, 2017).

Desde 1993 com o avanço e aperfeiçoamento das pesquisas moleculares foram descobertas mais espécies de *Bartonella*, e no momento, são 53 espécies e subespécies, destas, são 36 confirmadas e 17 *Candidatus* (BREITSCHWERDT, 2017). Destas, 20 são consideradas as principais patogênicas ao homem (Quadro 1) que causam as principais doenças relacionadas diretamente a bactéria, como doença da arranhadura de gato (DAG), febre das trincheiras (FT), doença de Carrión (DC) e angiomatose bacilar (AB). Vale destacar que elas causam também outras manifestações clínicas, sendo, neurorretinite, meningite, cefaléia, uveíte, endocardite, bacteremia, febre, fadiga, ansiedade, peliose hepática, mialgia, entre outras (WILLIAMS; DITTMAR, 2020; MULLINS *et al.*, 2017; DENG *et al.*, 2012; RAOULT, 2007).

Quadro 1. Espécies ou subespécies de *Bartonella*, seus hospedeiros reservatórios e as doenças causadas.

Espécie de <i>Bartonella</i>	Vetores	Doenças
<i>B. alsatica</i>	Pulgas, carrapatos	Febre, linfadenite e endocardite
<i>B. ancashii</i>	Pulgas, flebotomíneos	Febre Oroya, peruana verruga
<i>B. bacilliformis</i>	Pulgas, flebotomíneos	Febre Oroya, peruana verruga
<i>B. bovis (weissii)</i>	Moscas, carrapatos	Endocardite, febre
<i>B. clarridgeiae</i>	Pulgas, carrapatos	Assintomático, endocardite
<i>B. doshiae</i>	Pulgas	fadiga, artralgia e visão embaçada
<i>B. elizabethae</i>	Pulgas	Febre, endocardite
<i>B. grahamii</i>	Pulgas	Doença da arranhadura do gato, linfadenopatia, pápula avermelhada, abscesso
<i>B. henselae</i>	Pulgas, carrapatos	Doença da arranhadura do gato, endocardite, angiomatose bacilar, peliose hepática, bacteremia

<i>B. koehlerae</i>	Pulgas	Ansiedade, fortes dores de cabeça, espasmos musculares, diminuição da visão periférica e alucinações
<i>B. mayotimonensis</i>	Moscas de morcego, pulgas	Endocardite
<i>B. melophagi</i>	Moscas de ovelha	Tosse seca, fadiga, dores musculares e arrepios graves
<i>B. quintana</i> *	Piolho humano, pulgas	Angiomatose bacilar, febre de trincheira, bacteremia
<i>B. rochalimae</i>	Flebotomíneos	Bacteremia, febre e esplenomegalia
<i>B. schoenbuchensis</i>	Moscas de cervo, moscas, carrapatos	febre, fadiga e dores musculares
<i>B. tamiae</i>	Pulgas	Febre, dor de cabeça, mialgia, erupção maculopapular, erupção cutânea petéquias nos braços e pernas, anormalidades na função hepática
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i>	Pulgas, carrapatos	Fadiga, dor de cabeça e mialgias
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	Carrapatos	Endocardite, artrite, doença neurológica e hemangioendotelioma epitelióide
<i>B. volans</i>	Pulgas	Sintomas incertos
<i>B. washoensis</i>	Pulgas, carrapatos	Meningite

Fonte: adaptação de Breitschwerdt, 2017; * Espécie de *Bartonella* que o homem é reservatório e vetor

No Brasil, existem poucos estudos sobre a ocorrência de infecções por *Bartonella* em seres humanos. Estudos de Souza *et al.*, (2010) e Crissiuma *et al.*, (2011), demonstraram elevada prevalência de infecção, com taxas que podem variar de 20 a 95%. Em 2014, Favacho e colaboradores confirmaram o primeiro caso de DAG por análise molecular no Rio de Janeiro em um paciente HIV positivo. O estudo de Pitassi e colaboradores em Campinas, São Paulo - SP, demonstrou bacteremia em indivíduos assintomáticos. No entanto, apesar da variedade de manifestações clínicas, pode ocorrer bacteremia assintomática, como ocorre em doadores infectados por *B. henselae* (SANOGO *et al.*, 2003; PITASSI *et al.*, 2015).

O surgimento de espécies de *Bartonella* em uma ampla variedade de hospedeiros em diferentes cenários ambientes (urbano e rural) é cada vez mais complexo e dinâmico do ponto de vista ecológico e epidemiológico, do que foi apreciado há décadas passadas. Dentre as espécies e subespécies descritas, várias estão implicadas em infecções humanas, causando

diferentes manifestações clínicas. As espécies clinicamente mais frequentemente estudadas são *Bartonella henselae*, *B. quintana*, *B. bacilliformis* e *B. clarridgeiae*.

Bartonella henselae é considerada uma das espécies do gênero mais estudada. Diferentemente das espécies *B. bacilliformis* e *B. quintana*, em que os seres humanos são os únicos ou principal hospedeiro a *B. henselae* têm como principais reservatórios gatos domésticos, e assim, tendo relevante importância médica como causa de infecções zoonóticas. A identificação do agente etiológico ocorreu apenas em 1993 (DOLAN *et al.*, 1993), porém, Debré em 1950 já havia descrito sobre esta doença na França. (CHOMEL *et al.*, 2010; CHOMEL; KASTEN, 2010; KAISER *et al.*, 2011).

A *Bartonella quintana* foi responsável por grandes epidemias na Europa durante a Primeira e Segunda Guerras Mundiais. Ela causa uma doença conhecida como Febre das Trincheiras, em que acometia soldados. Foi estudada e isolada por J. W. Vinson em (1960). Atualmente, a infecção por essa bactéria em humanos tem sido relatada em todos os continentes, principalmente, em moradores de rua e alcoólatras. (MAURIN; RAOULT, 1996; KAISER *et al.*, 2011).

Bartonella bacilliformis tem sido identificada na América do Sul, em países como, Peru, Equador e Colômbia há séculos. Nestes países a infecção por *B. bacilliformis* é caracterizada por uma síndrome denominada (Doença de Carrión) que acontece em dois períodos ou também chamado de curso difásicos, que podem ser independentes uma da outra. (MINNICK *et al.*, 2014; GOMES, C.; RUIZ, J., 2017).

Bartonella clarridgeiae foi descoberta em 1995 num estudo para determinar a prevalência da infecção por *Bartonella* na população de veteranos de guerra em Houston, Texas, EUA (CLARRIDGE, *et al.*, 1995). Estudos demonstraram a associação desta bactéria, principalmente, em gatos e cães (KORDICK *et al.*, 1997; MARGILETH, BAEHREN, 1998; SANDER *et al.*, 2000; CHOMEL, *et al.*, 2001; GILLESPIE *et al.*, 2003; ROBINSON, HILLMAN, LANGTON, 2009; SYKES *et al.*, 2010). Mas, em 2019 no estudo de Logan e colaboradores, demonstraram evidência clara que essa espécie está associada, em humanos, à endocardite (LOGAN, *et al.*, 2019).

2.2 Transmissão

As espécies de *Bartonella* foram isoladas de uma variedade de espécies de animais, como canídeos, roedores, ruminantes, felídeos e aves. Elas são transmitidas principalmente por contato direto (arranhões e mordidas de animais) ou por diferentes artrópodes, como

flebotomíneos, pulgas, piolhos, moscas picadoras, carrapatos, potencialmente por triatomíneos. Foi estabelecida há muito tempo, uma gama em constante expansão de novos reservatórios de animais, incluindo mamíferos marinhos, herbívoros terrestres como camelos, e carnívoros selvagens, incluindo leões, ursos e raposas (MAGGI *et al.* 2008; CORREA *et al.*, 2012; DENG *et al.*, 2012; EREQAT *et al.* 2016; BAI *et al.* 2016; LAROCHE *et al.*, 2017; MULLINS *et al.*, 2017; VIEIRA, *et al.*, 2018).

A transmissão vetorial ocorre de duas maneiras principais; uma maneira ocorre a inoculação de fezes de artrópodes contaminadas por *Bartonella* por meio de arranhões ou mordidas de animais ou por contaminação ocorrida por picadas de artrópodes, e posteriormente o hospedeiro coça o local do ferimento e acaba se contaminando. Essa é a maneira de transmissão entre reservatórios primários e hospedeiros acidentais, incluindo gatos, cães e os humanos. Outra maneira é através de picadas de vetores, como confirmado para os flebotomíneos *Lutzomyia verrucarum*, que transmitem a *B. bacilliformis* entre os humanos (MOSBACHER *et al.*, 2011; DENG *et al.*, 2012; BATTISTI, LAWYER e MINNICK, 2015).

É importante salientar que o modo não vetorial de transmissão também é possível, como a transmissão por picada de agulha, que ocorreu em veterinários ou por transfusão de sangue, conforme documentado experimentalmente em gatos e cães (KORDICK; BREITSCHWERDT, 1997; OLIVEIRA *et al.* 2010; WARDROP *et al.* 2016).

Em experimentos *in vitro* os carrapatos *Ixodes ricinus* foram capazes de infectar o sangue de mamíferos com *B. henselae*. Além disso, a presença desta bactéria através de métodos moleculares foi bem documentada em carrapatos na Europa e em outros continentes. Os carrapatos também foram clinicamente implicados na transmissão da infecção em cães e humanos. Curiosamente, na regurgitação de pulgas de gato (*Ctenocephalides felis*), foi encontrado *B. henselae*. Isto foi demonstrado experimentalmente, portanto estudos adicionais são necessários para confirmar a transmissão da picada de pulga para animais ou humanos (LUCEY *et al.*, 1992; PODSIADLY *et al.*, 2007; COTTÉ *et al.*, 2008; BREITSCHWERDT *et al.*, 2008; BOUHSIRA *et al.*, 2013; MAGGI *et al.*, 2013; PENNISI *et al.*, 2015; MULLER *et al.*, 2016; GOLLY *et al.*, 2017).

Até agora, pelo menos 53 espécies ou subespécies de *Bartonella* foram encontradas (MULLINS *et al.*, 2017; BREITSCHWERDT, 2017). Cada espécie pode estabelecer uma bacteremia intra-eritrocítica prolongada em seu hospedeiro reservatório, mas normalmente não com prejuízos óbvios (VAYSSIER-TAUSSAT *et al.*, 2009; DENG *et al.*, 2012).

Na transmissão é importante salientar a estratégia de infecção intra-eritrocitária crônica por *Bartonella* spp., que acontece em múltiplas fases dividida em quatro etapas após a transmissão por um vetor artrópode (Figura 2).

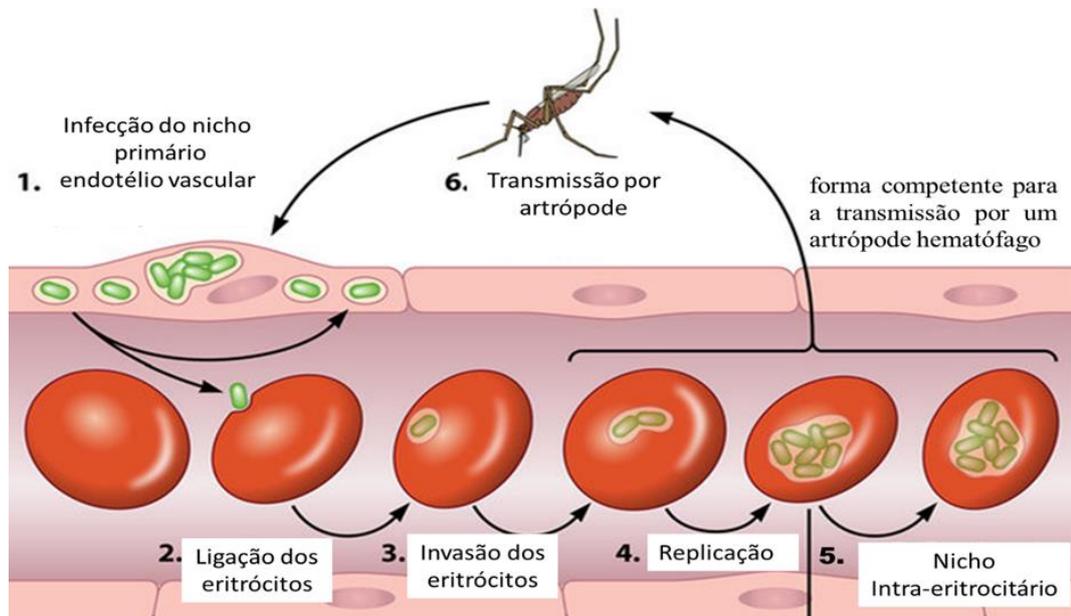


Figura 2. Visão da estratégia comum de infecção por *Bartonella* na transmissão de um vetor artrópode. Fonte: adaptado de GOMES, C.; RUIZ, J., 2017

Uma vez transmitido ao hospedeiro por inoculação as fezes contaminadas de artrópodes (pulgas, ácaros e piolhos) ou potencialmente por uma picada (carrapato), a bactéria penetra na barreira dermal, na maioria das vezes em conjunto com um arranhão ou através de um abrasão pré-existente. Subsequentemente, antes da infecção dos eritrócitos, em mamíferos, a *Bartonella* permanece no nicho dermal (primário), embora necessite mais estudos, as células do endotélio vascular são sugeridas como nicho dermal, durante a primeira etapa do curso de infecção. Diferente de outros microrganismos ela fica indetectável por aproximadamente 4 dias e no 5º dia, após a inoculação, elas circulam na corrente sanguínea, importante salientar que nesse período ocorre a formação do biofilme e outro fator importante na resposta imunológica é que, algumas espécies escapam do reconhecimento de TLR4 e TLR5 pelas estruturas incomuns de lipossacarídeos e flagelinas. Na segunda etapa ocorre a adesão da bactéria nos eritrócitos. Os flagelos presentes em algumas espécies como na *B. Bacilliformis* permitem alta motilidade na corrente sanguínea. Na terceira etapa, a invasão dos eritrócitos através de deforminas e hemolisinas e a quarta etapa seguida da replicação e persistência nos eritrócitos nos quais usam genes de proteínas como estratégias para conseguirem nutrientes (sequestro do heme) e lidarem

com estressores (flutuações na osmolaridade, alterações no pH, entre outros) (HARMS e DEHIO, 2012; GOMES, C.; RUIZ, J., 2017; DENG *et al.*, 2018).

2.3 Epidemiologia

As doenças infecciosas atraem pesquisadores no descobrimento de vestígios de microrganismos do passado, e não é diferente com a *Bartonella*. Foram realizadas pesquisas moleculares com a polpa do dente molar de um indivíduo de cerca de 4.000 anos que habitaram Peyraoutes na região Sudeste da França e descobriram DNA de *Bartonella quintana*. Também na França, na Comuna Bondy foram descobertos 11 esqueletos em três cemitérios, datados entre os séculos XI e XV. E utilizando a técnica de biologia molecular, da polpa dos dentes, foram detectados três indivíduos com *Bartonella quintana* (DRANCOURT *et al.*, 2005; TRAN *et al.*, 2011; CHESLOCK; EMBERS, 2019; MAI *et al.*, 2020).

Foram detectadas *B. henselae* através de PCR (Reação em cadeia da polimerase) em três gatos do século XIII, XIV e XVI, que estavam enterrados em cemitérios da França, Paris - Louvre medieval; Montbéliard e Amiens, sucessivamente (LA *et al.*, 2004). Em Narbur, Bélgica, em 1996 foi descoberto *Bartonella quintana*, *B. henselae* e *B. tribocorum* em coprólito datado do século XIV, que estavam em barril (RAOULT *et al.*, 2004; APPELT *et al.*, 2014). Em 2001, foram encontrados, em uma vala em Vilnius, Lituânia, restos mortais dos soldados do Exército de Napoleão Bonaparte de 1912. Utilizando biologia molecular foram detectados *B. quintana* em três fragmentos de piolho de corpo, e na polpa dentária de sete soldados (RAOULT *et al.*, 2006; CHESLOCK; EMBERS, 2019).

A área de distribuição da *B. bacilliformis* é limitada aos Vales Andinos no sul do Equador, na Colômbia e especialmente no Peru, localizados entre 700 e 2.500 metros acima do nível do mar. Em 1900, o médico Alberto Barton, estudando pacientes afetados pela febre de Oroya foi o primeiro que descobriu o gênero *Bartonella*. Depois em 1915, foram descoberto o agente da doença, a *Bartonella bacilliformis*, logo em 1926 foram estudadas suas etiologias, já em 1928, Battistini mostrou que os flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia* eram os vetores dessas bactérias. A infestação desses artrópodes ocorre durante o repasto sanguíneo realizada no único reservatório humanos, portadores saudáveis, apresentando bacteremia assintomática ou sintomática. (NOGUCHI, 1926; ALEXANDER, 1995; ZORRILLA *et al.*, 2021).

Na atualidade, depois de 1993, houve aumento significativo de novas espécies, pois antes eram conhecidos apenas o gênero *B. bacilliformis*. Logo, em 1994 com a evolução das

técnicas e ferramentas de biologia moleculares. Assim, os achados aumentaram significativamente havendo reclassificação dos gêneros e descobertas de novas espécies e subespécies, levando em consideração também os candidatos. Desde essa data, o número de espécies do gênero *Bartonella* cresceu significativamente por duas razões: a reclassificação no gênero *Bartonella* de bactérias anteriormente descritas em um outro gênero bacteriano (*Rickettsia*, *Rochalimaea*, *Grahamella*) e a descoberta mais recente de novas espécies bacterianas na fauna doméstica e selvagem (ANDERSON et al., 1994; MILLER; BREITSCHWERDT; MAGGI, 2019; ZORRILLA et al., 2021).

A ampla distribuição geográfica, a grande diversidade de reservatórios e a variedade de vetores possíveis exigem mais estudos sobre a epidemiologia de *Bartonella* spp. Em todo o mundo, a maioria das doenças causadas por *Bartonella* spp. não são reportáveis e, portanto, os dados sobre sua incidência são limitados. Os poucos estudos existentes sugerem que a frequência de infecções pode ser alta, e já ocorreu na América do Norte, em que 22.000 casos de doença por arranhões em gatos apareceram em 1 ano nos EUA, e 10% deles necessitaram de hospitalização (JACKSON, PERKINS e WENGER, 1993; MCCORMICK et al., 2020).

Estudo com animais, no Brasil, demonstraram evidências moleculares significativas da presença de *Bartonella* spp. em amostras de felinos. No estado do Rio Grande do Sul, foram encontrados 17%; no Rio de Janeiro 97,3% e no Maranhão 4,5% (STAGGEMEIER et al, 2010; SOUZA et al, 2010; BRAGA et al, 2012). Também obtiveram achados sorológicos de 47,5% a 56,6% no Rio de Janeiro (CRISSIUMA et al, 2011; KITADA et al, 2013). É importante ressaltar que no Brasil, somente em 2014 a bartonelose passou a ser considerada uma doença de notificação compulsória pelo Ministério da Saúde e mais estudos têm sido realizados demonstrando elevadas prevalências de infecção em amostras humanas e de gatos.

2.4 Bartoneloses

Bartoneloses são as doenças causadas por *Bartonella* spp. e compreendem uma série de manifestações, como linfadenopatias, doenças por arranhões de gatos e febre das trincheiras, Doença de Carrión, endocardite, vasculite, uveíte, angiomatose bacilar e peliose bacilar. Mas também, pode dar origem a muitos sintomas inespecíficos e atípicos como queixas músculo-esqueléticas, neurorretinite, síndrome oculoglandular de Parinaud, encefalopatia, hepatoesplenomegalia, glomerulonefrite, febre prolongada e endocardite infecciosa com cultura negativa em pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos (FAVACHO et al., 2014; CHESLOCK; EMBERS, 2019). A endocardite também está associada a pessoas sem teto

e que fazem uso de álcool (alcoolismo crônico). Doença neurológica atípica causada por *Bartonella* pode incluir meningite asséptica, disfunção transitória dos nervos cranianos e/ou periféricos, afasia, transtornos do humor, psicoses, e outras variedade de transtornos psiquiátricos (MADA *et al.*, 2021).

São várias as manifestações clínicas associadas à bartonelose e depende principalmente da virulência da *Bartonella* spp. ou cepa, o nível de adaptação evolutiva do hospedeiro da bactéria e a resposta imune do hospedeiro, que é um determinante crítico da expressão da doença. Em alguns pacientes, e especialmente em indivíduos imunocomprometidos, a doença pode ser fatal. A consequência a longo prazo da infecção subclínica crônica por *Bartonella* spp. em humanos imunocompetentes é atualmente desconhecida (FOUCH, COVENTRY, 2007; BREITSCHWERDT *et al.*, 2010; FAVACHO *et al.*, 2014).

A DAG está relacionada à *Bartonella henselae* que causa infecção sistêmica e autolimitante e menos comum por *B. clarridgeiae*, sendo mais duradoura quando acometida por esta espécie. Esta doença é causada pela arranhadura ou mordida do gato, e entre 3 a 10 dias, após a inoculação, pode ocorrer pápulas, linfadenopatia regional e esplenomegalia. Entre os sintomas, mal-estar, artralgia, cefaleia e febre em um terço dos indivíduos. Entre 7 a 20 dias a doença se torna leve a moderada, com sintomas de febre, calafrios e mal estar, seguido de anorexia, cefaléia, náuseas e êmese. Contudo, nos gatos, a bacteremia se apresenta assintomática (LOGAN *et al.*, 2019; ABREU-YANES *et al.*, 2020).

Doença de Carrión é causada pela *B. bacilliformis*, conhecida em seu estágio inicial ou primeira fase, como febre de Oroya (FO), caracterizada pela colonização de todo o sistema circulatório, levando à infecção de aproximadamente 61% de todos os eritrócitos circulantes. Essa carga bacteriana geralmente leva a anemia hemolítica severa, febre, cefaleia, icterícia e hepatomegalia. Semanas ou meses seguintes inicia a segunda fase conhecida como Verruga Peruana em que a *B. bacilliformis* invade as células endoteliais e desencadeia a proliferação celular e a angiogênese, levando a formação de bolhas na pele cheia de sangue. O estágio crônico dura cerca de um mês a um ano. Embora a doença de Carrión possa apresentar-se como uma doença grave, há muitos casos documentados com sintomas relativamente mais leves configurando sistema imunológico, predisposição de cada hospedeiro, virulência e inóculo, determinando assim a gravidade de cada caso (GARCIA-QUINTANILLA *et al.* 2019; HICKS; MINNICK, 2020).

Febre das Trincheiras, também conhecida como febre dos cinco dias, foi relatada pela primeira vez na Europa em soldados. É causada por *B. quintana* é transmitida por piolhos

corporais (*Pediculus humanus humanus*) e ocorre, exclusivamente, em humanos. Ficou conhecida na Europa no período da Primeira Guerra Mundial por provocar febre, dores nas pernas e cabeça em mais de um milhão de soldados. As péssimas condições do local da guerra, nas trincheiras, especificamente, como a falta de higiene foram congruentes para a proliferação de vetores artrópodes, como os piolhos. Atualmente, é comumente observada entre os desabrigados, aqueles infestados com sarnas e/ou piolhos e pessoas que vivem em condições insalubres e de aglomeração, onde o risco de contato com indivíduos portadores de *B. quintana* é aumentado (MILLER; BREITSCHWERDT; MAGGI, 2019; ZORRILLA *et al.*, 2021).

Angiomatose bacilar é uma manifestação menos comum da infecção por *B. henselae* ou *B. quintana* caracterizada por lesões cutâneas, massas subcutâneas e lesões ósseas em pacientes com AIDS e transplantados (FAVACHO *et al.*, 2014). O contato do gato é um fator de risco conhecido e está associado a *B. henselae*. É uma doença vascular proliferativa devido à estimulação angiogênica das *Bartonellas*, que geralmente envolve a pele, mas pode envolver outros órgãos e locais, como os ossos, medula óssea e cérebro. O diagnóstico clínico pode ser confundido com outras doenças como o sarcoma de Kaposi, granuloma piogênico, tumores subcutâneos e hemangioma. As lesões cutâneas são muito semelhantes às relatadas pela verruga peruana, a forma crônica da doença de Carrión. São definidas como Peliose bacilar quando as lesões envolvem o fígado, baço ou nódulos linfáticos (VELHO *et al.*, 2003; AKRAM *et al.*, 2021).

2.5 Diagnóstico

O diagnóstico para bartonelose é difícil e permanece desafiador. Embora as *Bartonellas* possam ser cultivadas em meios enriquecidos, a sensibilidade é tipicamente baixa. Atualmente não há técnica diagnóstica em que o resultado negativo garanta a ausência de infecção. As técnicas mais frequentemente utilizadas para a detecção de infecções agudas e crônicas são técnicas especializadas de cultura microbiológica, reação em cadeia da polimerase (PCR), imunohistoquímica (IHQ) e sorologia (BREITSCHWERDT *et al.*, 2010; VERMEULEN *et al.*, 2010).

Os testes sorológicos são normalmente usados em laboratórios microbiológicos por causa da sua simplicidade. Os testes sorológicos usados para detectar anticorpos incluem IFI, ELISA e Western immunoblot. Eles devem ser usados para confirmar infecção anterior ou em curso, e por isso são utilizados em estudos para estimar a soroprevalência em humanos e animais (GLAUS *et al.* 1997; MAGGI, DUNCAN e BREITSCHWERDT, 2005; LASHNITS,

et al. 2018; MILLER; BREITSCHWERDT; MAGGI, 2019). No entanto, apresentam limitações como reações cruzadas entre *Bartonella* spp. e ainda entre outros gêneros, como *Chlamydia* e *Coxiella*, o que pode limitar a interpretação dos resultados dependendo do cenário em que o paciente e/ou animal se encontra.

Resultados melhores podem ser alcançados através de uma combinação de métodos moleculares e de cultura, como PCR e sequenciamento de DNA (figura 3), mas isso não é implementado rotineiramente e existe uma necessidade crescente de ferramentas de diagnóstico mais eficazes (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017; MAGGI, DUNCAN & BREITSCHWERDT, 2005)

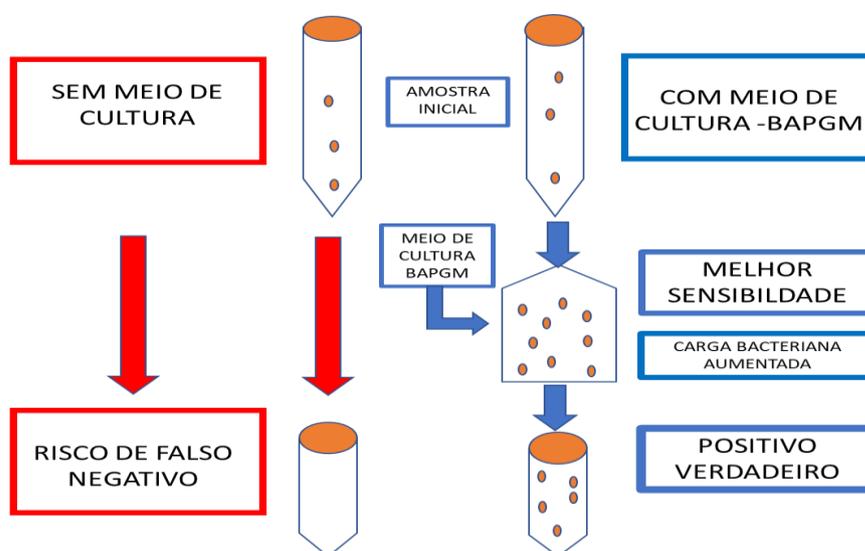


Figura 3. Imagem comparativa entre os resultados das técnicas de PCR após a utilização prévia ou não do meio de crescimento para *Bartonella* - Alphaproteobacteria (BAPGM). Fonte: adaptado de PITASSI, *et al.*, 2015; Miller; Breitschwerdt; Maggi, 2019.

A introdução de cultura por meio de crescimento líquido de *Bartonella* alfa-Proteobacteria (BAPGM – do inglês - *Bartonella* alpha-Proteobacteria growth medium), facilitou o isolamento bem-sucedido de *B. henselae* e várias outras *Bartonella* spp. de amostras de sangue de cães, cavalos, humanos e animais selvagens e tem sido usado esse meio de cultura e enriquecimento para aumentar o crescimento de *Bartonella*. O BAPGM, antes do teste de PCR, tem sido usado para aumentar a sensibilidade para diagnóstico de infecção, facilitando assim o diagnóstico de bartonelose em gatos, cães e humanos (PITASSI *et al.* 2015).

A plataforma combina a cultura de enriquecimento de uma amostra clínica no meio de crescimento líquido por um mínimo de 7 dias, seguido por um ensaio de PCR altamente sensível projetado para amplificar todas as espécies de *Bartonella* spp. (PITASSI *et al.*, 2015). *Bartonella* spp. podem ser cultivadas com sucesso com placas de ágar contendo 5% de sangue

desfibrinado de coelho ou carneiro, que são mantidas a 35°C em uma câmara de alta umidade com 5% de concentração de CO². O isolamento da placa de ágar requer tempos de incubação prolongados: as colônias bacterianas podem ser visíveis entre 10 a 56 dias após a inoculação da placa de ágar (BREITSCHWERDT et al., 2008)

A amostra mais utilizada para detecção de *Bartonella* por PCR é o sangue periférico. No entanto, a detecção e caracterização também podem ser realizadas após a extração de DNA do líquido cefalorraquidiano, fluido articular, culturas bacterianas, swabs orais, linfonodos ou outras amostras de tecido ou aspirados, dependendo de cada caso clínico individual. Para evitar a desnaturação do DNA por fixação com formalina, é aconselhável armazenar tecidos congelados para testes futuros ou usar amostras frescas ou congeladas para amplificação do DNA de *Bartonella*. Uma vez que a PCR é positiva para o gênero *Bartonella*, a espécie pode ser determinada usando iniciadores específicos da espécie ou, de forma otimizada, por sequenciamento de DNA (VELHO, 2009; BREITSCHWERDT et al., 2020).

2.6 Medicina Transfusional

As práticas de hemoterapias da Medicina Transfusional são regulamentadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e atualmente, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 34 de 11 junho de 2014 e Portaria Ministerial N° 158 de 04 de fevereiro de 2016, que formalizaram e normatizaram os procedimentos, desde a coleta, processamento e transfusão. A Medicina Transfusional também foi referenciada, na Constituição Federal de 1988, Artigo 199, Parágrafo 4° (BRASIL, 1988; 2014 e 2016; HAMERSCHLAK, JUNQUEIRA e ROSENBLIT, 2005).

O Ministério da Saúde orienta e determina que, para cada doação efetivada, sejam realizados testes sorológicos para os seguintes patógenos: *Treponema pallidum* e *Trypanosoma cruzi*, vírus da imunodeficiência humana – HIV 1 e 2, vírus linfotrópico de células T humanas – HTLV 1 e 2, vírus da hepatite B e C. No entanto, doenças como Dengue, Zika, Chikungunya, Herpes causada pela (Herpes Simplex Vírus), Parvovirose, Babesiose, Doença de Creutzfeldt–Jakob e doença causada pelo coronavírus - COVID-19 e rickettsioses, não são diagnosticadas sorologicamente nos hemocentros. Embora sejam conhecidas, estas doenças são negligenciadas quanto ao seu potencial de transmissão a imunocomprometidos e transplantados. No entanto, muitas dessas doenças são citadas apenas em formulários, usados na triagem clínica, e podem ser “detectadas” dependendo apenas do bom senso do doador (BRASIL, 2014; 2016).

Apesar de toda triagem laboratorial, ela não garante total segurança quanto à possibilidade de transmissão dos patógenos pelo chamado risco residual infeccioso, também conhecido como janela imunológica, ou o intervalo entre o momento em que o indivíduo se torna infectado e aquele em que o teste detecta a infecção. E levando-se em consideração que na bartonelose existe o nicho primário, ou seja, apresentando essa janela imunológica, torna-se risco evidente, principalmente, para transplantados e pessoas imunocomprometidas pelo motivo da não detecção e acarretando demora no diagnóstico. E assim, podendo agravar o quadro clínico do indivíduo.

2.7 Doadores de sangue

De acordo com a Organização Mundial da Saúde - OMS, é recomendado que 5% da população sejam doadores de sangue de forma regular (OMS, 2021). Porém, o Brasil, estima-se que apenas de 2% a 2,5% da população seja doador de sangue (BRASIL, 2016). No Rio de Janeiro o índice de doadores em relação a população foi 1,54% em 2020 e de acordo com a coleta de dados sociodemográficos, a maioria vive nas áreas urbanas, tem idade entre 18 e 65 anos e variadas profissões como autônomos, militares, vendedores, empresários entre outros (HEMORIO, 2021).

Os doadores do estado do Rio de Janeiro utilizam o serviço do HEMORIO que atua desde 1944, e é conhecido por oferecer o serviço de hemoterapia para tratamento de doenças hematológicas. Além de atuar na pesquisa e ensino, é composto por 90 serviços públicos e contratado pelo SUS: 01 Hemocentro Coordenador, 03 Hemocentros Regionais, 20 Núcleos de Hemoterapia, 03 Unidade de Coleta e Transfusão e 63 Agências Transfusionais (HEMORIO, 2021).

De acordo com o protocolo de tratamento de hematologia e hemoterapia do HEMORIO, os requisitos básicos para os doadores são: estar em boas condições de saúde; ter entre 16 e 69 anos (desde que a primeira doação tenha sido feita até 60 anos) e se menores de 18 anos devem ter autorização, pesar no mínimo 50kg, estar descansado e ter dormido pelo menos 6 horas nas últimas 24 horas e alimentar-se bem. Alguns cuidados para evitar a contaminação por microrganismos devem ser meticulosamente avaliados. Algumas doenças são impeditivas temporariamente, tais como, Malária, Febre Amarela, Coronavírus. Situações impeditivas temporárias como vacina, ser profissionais de saúde e lidar com pessoas com COVID-19, devem aguardar os dias recomendados para que a doação de sangue seja possível. Existem também os impedimentos definitivos como, HIV, hepatites B e C, doenças de Chagas, HTLV,

e uso de drogas ilícitas. Os critérios de doação de sangue seguem as normas de agências transfusionais e particularidades de cada local (HEMORIO, 2021).

2.8 *Bartonella* em doadores de sangue

Existem poucos os estudos de *Bartonella* em doadores de sangue. A seguir, serão apresentados importantes estudos sorológicos e moleculares em humanos, que revelam expressivas porcentagens de contato com *Bartonella* spp.

Na Grécia, em um estudo com 481 doadores de sangue a soroprevalência IgG foi de 21,6% (104/481), no mesmo estudo testaram para IgM, os 104 doadores positivos IgG e detectaram 17% (35/104) (MINADAKIS *et al.*, 2008). Na Croácia, o estudo analisou a soroprevalência de crianças (46) e doadores de sangue (54), e o resultado sorológicos foram respectivamente 41,3% (19/46) e 57,4% para *B. henselae* (31/54) (PANDAK *et al.*, 2009). Na Turquia, foram coletadas 800 amostras de sangue de doadores voluntários com objetivo de investigar a soroprevalência de *B. henselae* e averiguar os fatores de risco relacionados. No entanto, a soroprevalência foi de 6% (48/800) (YILMAZ *et al.*, 2009).

Na Itália, foi avaliado a soroprevalência da infecção por *B. henselae* em crianças 243 e juntamente com 122 doadores de sangue saudáveis, entre as crianças, 25,1% (61/243) tinham anticorpos IgG para *B. henselae*; e nos doadores de sangue, 11,4% (14/122) tinham anticorpos IgG para *B. henselae*; (MANSUETO *et al.*, 2012). Na Polônia, estudo sorológicos com 65 doadores de sangue e 40 pacientes com sintomas musculoesqueléticas demonstraram soroprevalência IgG em doadores de sangue em 35,4% (23/65) e, em pacientes com sintomas musculoesqueléticas 30% (12/40) (ŁYSAKOWSKA *et al.*, 2019).

Na china, um estudo com 351 doadores de sangue, apresentou 14,81% (52/351) de soropositividade IgG para *B. henselae* (SUN *et al.*, 2010). Na Coreia um estudo com 300 doadores de sangue obteve 15% (45/300) de soroprevalência IgG para *B. henselae* (KWON *et al.*, 2017)

Na América Latina, estudos com doadores de sangue, ainda são poucos. No Chile, um estudo no banco de sangue do hospital de San José com 140 amostras de doadores aleatórios, obtiveram 19/140 (13,6%) de amostras positivas pelo método molecular. Destas amostras, 18 foram identificadas sendo *B. henselae* (NÚÑEZ *et al.*, 2017).

No Brasil, um estudo em Campinas -SP, com 500 doadores de sangue detectou 16/500 (3,2%) doadores com infecção na corrente sanguínea, tendo a presença de *B. henselae* em 15/16 (3%) dos doadores e *B. clarridgeae* em 1/16 (0,2%) dos doadores positivos. Este estudo

também pontuou a correlação entre o contato com gatos e picada por carrapatos. A detecção foi através do uso do meio de cultura de crescimento (BAPGM), método molecular de PCR, e sequenciamento (DINIZ *et al.*, 2016). Outro estudo pelo mesmo grupo em Campinas com 500 doadores de sangue em um banco de sangue encontraram soroprevalência IgG de 16% e 32% de *B. henselae* e *B. quintana* respectivamente. Destes, 16 apresentaram infecção por *Bartonella* spp. significa que 1 a cada 30 doadores apresentavam DNA da bactéria, ou seja, apresenta infecção pela *Bartonella* spp. na corrente sanguínea (PITASSI *et al.*, 2015). No Rio de Janeiro, Lamas e colaboradores obtiveram prevalência de *Bartonella* spp. pelo método de sorologia IgG, em 38,4 % em população com HIV positivo e no grupo controle com amostras do banco de sangue, 43/125 (34%) (LAMAS *et al.*, 2010).

Diante do exposto, e considerando que o elevado nível de segurança do fornecimento de sangue é o resultado de estudos contínuos e melhorias na triagem dos doadores e dos testes empregado nos bancos de sangue, é necessária uma vigilância contínua não somente de agentes patogênicos conhecidos, mas também de outros agentes infecciosos, como no caso de *Bartonella*. Esta possibilidade faz da infecção por estas proteobactérias um relevante problema em saúde pública e exige avaliação dos riscos e do impacto da transmissão de *Bartonella* spp. por meio de transfusões, especialmente para os pacientes imunodeficientes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar as espécies de *Bartonella* associadas à infecção em doadores de sangue e avaliar o potencial risco da transmissão por transfusão sanguínea da *Bartonella* spp.

3.2 Objetivo específico

- Detectar, através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), anticorpos anti-*Bartonella* spp. em amostra de doadores de sangue procedente do hemocentro do estado do Rio de Janeiro;
- Detectar, através da técnica de PCR, o DNA de *Bartonella* spp. em amostras de sangue de doadores procedentes do hemocentro do estado do Rio de Janeiro;
- Analisar as sequências genéticas obtidas nesse estudo, comparando-as com as sequências disponíveis no GenBank.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo e local

Pesquisa do tipo transversal e descritiva, utilizando dados primários. Desenvolvido no Laboratório de Imunologia Clínica (LIC) – CCBS/UFMS, que dispõe da infraestrutura e dos equipamentos necessários para a realização das técnicas utilizadas no projeto.

4.2 Aspectos éticos

Quanto os aspectos éticos, o projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de ética para pesquisa (CEP) do HEMORIO (Nº 409/16). Os voluntários doadores de sangue registrados neste estudo concordaram e assinaram com o Termo de Consentimento livre e esclarecido (TCLE). Os doadores foram selecionados por amostragem de conveniência, com critérios de inclusão e exclusão seguindo as Normas Técnicas do Ministério da Saúde (Portaria GM-MS, 2016).

4.3 Seleção das amostras

Durante uma semana do mês de agosto do ano de 2018 foram coletadas 501 amostras de doadores de sangue voluntários aparentemente saudáveis. O cálculo amostral foi realizado através da plataforma gratuita e on-line no site: <http://estatistica.bauru.usp.br/calculoamostral/>. Os candidatos a doação de sangue (voluntários participantes) responderam a um questionário epidemiológico (ficha epidemiológica para Rickettsioses – SINAN – em anexo) preenchido pelo pesquisador com as seguintes informações, sendo, sexo, idade, cor e exposição animal (gatos, cães ou outros animais), também foi avaliado através do questionário, se tiveram mordidas de cães, gatos ou outros animais e picadas de carrapatos. Em seguida as amostras de sangue foram colhidas através de punção venosa no momento da doação de sangue, por profissionais capacitados do próprio HEMORIO, em tubo EDTA (do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid* ou ácido etilenodiamino tetra-acético) de 10 mL de sangue para técnica de biologia molecular. Foi coletado também, em tubo com ativador de coágulo para separar o soro para análise sorológica de *Bartonella* spp.. Alíquotas de cada amostras, sangue EDTA e soro dos doadores, foram armazenadas em freezer a -20°C e posteriormente submetidas à testes sorológicos e PCR convencional.

4.4 Teste sorológico

Para a realização dos testes sorológicos, foi desenvolvido e validado o protocolo de metodologia POP-TEC-01-Fiocruz-MS. A análise sorológica foi realizada no LAC, utilizando o kit comercial (*Bartonella henselae* 120-test IgG IFA kit - Fuller Laboratories Fullerton, CA USA. REF. BHG-120 LOTE: BHG-120-180104, validade: 2019-03). A detecção de anticorpos da classe IgG para anti-*B. henselae* foi realizada por reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

4.4.1 Modo de preparo da reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Foram utilizadas microplacas de poliestireno esterilizadas com 96 poços. Quanto ao modo de preparo, foram utilizados 3 poços para cada amostra de paciente e a preparação ficaram assim, colocado em um poço (01) 150 ul PBS + 10 ul do soro do paciente, diluição (1:16), desta solução anterior, foram adicionados para outro poço (02) 100 ul da amostra (1:16) e adicionado 100ul PBS, ficando a diluição em (1:32); e no poço (03) adicionado 100 ul da diluição anterior (1:32) e 100ul PBS ficando a diluição em (1:64).

Nas lâminas, foram adicionadas em um poço o controle negativo e no outro o controle positivo (15µl), sempre usando critérios para evitar contaminação, como por exemplo, colocar primeiro o controle negativo. Em seguida foram adicionados nos demais poços da lâmina 15 µl de soro de cada doador. Após esta etapa as lâminas foram colocadas em câmara úmida (placa de Petri com gazes umedecidas com água). Os poços da lâmina foram lavados com um fluxo suave de PBS com a pipeta Pasteur por três (3) vezes e mergulhamos as lâminas em uma jarra de Coplin com tampa contendo PBS suficiente para cobrir as lâminas e esperamos por 10 minutos. Secamos as lâminas suavemente em papel absorvente, mas sem permitir que o poço seque completamente.

Nesta etapa, para cada poço da lâmina foram adicionados 15 ul de conjugado e, em seguida colocado a lâmina na câmara úmida. Novamente incubamos as lâminas por 30 minutos a 37°C. Neste momento, a câmara úmida foi envelopada com papel alumínio pelo fato do conjugado ser fotossensível. A seguir as lâminas foram lavadas novamente e montadas, com meio de montagem e lamínulas, para a leitura microscópica. As lâminas foram armazenadas em geladeira com temperatura à +2 a +8 °C, em câmaras úmidas cobertas com papel alumínio, e no outro dia foi realizada a leitura no microscópio fluorescente.

4.5 Testes moleculares

4.5.1 Extração de DNA

Para a extração do DNA foi utilizado o kit comercial QIAamp® DNA Mini kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA). A extração do DNA de sangue total- EDTA foi realizada da seguinte maneira, foram adicionados 200ul do sangue total, 20 ul da QIAgen Protease, e 200ul do Buffer AL (Tampão lise), misturado (por vortex) por 15 segundos e incubado à 56°C por 1 hora. Depois de rápida centrifugação dos tubos de 1,5 ml para remover as gotas da tampa, adicionado 200µl de etanol absoluto à amostra, e misturado novamente (por vortex) por 15 segundos. Mais uma vez centrifugado rapidamente os tubos para remover as gotas das tampas.

A mistura foi aplicada cuidadosamente na coluna (inserida em um tubo coletor de 2 ml) sem molhar a borda, fechada a tampa, e centrifugada a 8000 rpm por 1 minuto. Colocada a coluna em um tubo coletor limpo, e descartado o tubo contendo o filtrado. Quando o lisado não passava completamente pela coluna após a centrifugação, centrifugávamos novamente até que a coluna ficasse vazia. Adicionado 500 µl do Buffer AW1 (lavagem), fechado as tampas dos tubos e centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto. Depois, colocado a coluna em um tubo coletor contendo o filtrado. Em seguida, a coluna foi aberta cuidadosamente e adicionado 500 ul de Buffer AW2 (lavagem). Fechado a tampa e centrifugado a 14000 rpm por 3 minutos e para eliminar a chance de carreamento do Buffer AW2, colocado a coluna em um novo tubo de 2 ml (não o tubo coletor do Kit, e sim em um tubo comum com a tampa cortada) e descartado o tubo coletor com o filtrado.

O tubo novo com a coluna, foi centrifugado a 14.000 rpm por 1 minuto, a coluna foi inserida a coluna em um tubo novo (epENDORF de 1,5 ml) e o tubo coletor contendo o filtrado foi descartado. Em seguida, foi destampado cuidadosamente a coluna e adicionado 50 ul do Buffer AE (eluição). As amostras foram incubadas a temperatura ambiente (15-20°C) por 5 minutos, e centrifugadas a 8.000 rpm por 1 minuto. Posteriormente, foi repetido o procedimento e 50 µ de AE (eluição) foi adicionado as amostras e incubada a temperatura ambiente (15 a 20°C) por 5 minutos, e centrifugadas a 8.000 rpm por 1 minuto. As amostras foram colocadas numa caixa de armazenamento identificadas e estocadas em freezer à temperatura de -20°C. O DNA extraído de células HEp2 infectadas com *Bartonella henselae* e água destilada estéril foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente. Os reagentes e as amostras foram manuseados com luvas descartáveis, microtubos livres de DNA / RNase e pontas de pipetagem em armários de segurança equipados com lâmpadas ultravioleta. As técnicas

moleculares foram realizadas em duas salas separadas, no laboratório de imunologia da UFMS, para evitar a contaminação do DNA. Um fluxo de trabalho unidirecional foi estritamente imposto entre as áreas pré-PCR (manuseio da amostra, configuração da PCR e extração de DNA) e áreas pós-PCR (amplificação do DNA, análise do gel e purificação do amplicon).

4.5.2 PCR convencional para o gene endógeno da proteína de ligação aos retinóides inter-fotorreceptores (IRBP)

Para verificar a presença de inibidores nas amostras de DNA, foi realizada a técnica de PCR convencional para o gene endógeno da proteína de ligação aos retinóides inter-fotorreceptores (IRBP). A reação de PCR foi realizada segundo a padronização de Ferreira *et al.* (2010). Para tal, foram utilizados 5 µl de DNA, água livre de nucleases, tampão de PCR, 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de mistura de desoxinucleotídeos, 0,7 U Taq DNA Polimerase e 15 pmol de cada oligonucleotídeo iniciadores: IRBP_{fwd}: (5'-TCCAACACCACCACTGAGATCTGGAC-3') e IRBP_{prev}: (5'-GTGAGGAAGAAATCGGACTGGCC-3'), tendo como alvo um fragmento de 227 pb. A reação para a amplificação do gene IRBP seguiu as seguintes condições no termociclador (SimpliAmp™ Thermal Cycler – ThermoFisher Scientific): desnaturação inicial a temperatura de 95 °C por 4 min, seguida de 35 ciclos compostos por desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 57 °C por 30 s, e extensão a 72 °C por 1 min e finalmente uma etapa de extensão a 72 °C por 5 min. Água livre de nucleases foi usada como controle negativo e para o controle positivo foi utilizado DNA de amostra de mamífero (morcego *Cynomops planirostris*) previamente testada e positiva na PCR IRBP, cedida pelo Prof Eduardo de Castro Ferreira do Laboratório de Biologia Molecular e Aplicada da Universidade Anhanguera-Uniderp, Mato Grosso do Sul.

4.5.3 PCR convencional para *Bartonella* sp

Para detecção de DNA do gênero *Bartonella*, foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR), em três alvos de amplificação, ou seja, (3 PCR), (Quadro 2) conforme descrito abaixo. Primeiramente foi utilizado os iniciadores específicos CAT1 [5'-GATTCAATTGGTTTGAA (G / A) GAG GCT-3 '] e CAT2 [5'-TCACATCACCAGG (A / G) CGTATTC- 3 '] visando o gene de choque térmico *htrA*, de acordo com trabalho feito por Anderson, *et al.*, (1994). A amplificação foi realizada por pré-desnaturação, 1 ciclo por 5 minutos a 95 ° C, seguido por 35 ciclos de desnaturação, 94 ° C por 30s, anelamento 52 ° C por

45s e extensão de 72 ° C por 45s, amplificação foi completada por um adicional ciclo de 72°C por 7 minutos, em um (termociclador com gradiente, modelo: veriti 96-well thermal cycler, 0.2ml - applied biosystems). Logo, utilizamos o gene da citrato sintase (*gltA*) que foi direcionado com os iniciadores BhCS781p (5'-GGGGACCAGCTCATGGTGG-3') e Bhcs1137n (5'-AATGCAAAAAGAACAGTAAACA-3'), Este descrito por Norman, *et al.*, (1995).

Quadro 2. Protocolos de PCR convencional utilizados para detecção molecular de *Bartonella* spp.

Primers	Sequências	Tamanho do fragmento	Condições do ciclo	Referência
<i>(gltA)</i> citrato sintase	BhCS.781p (5'-GGGaCCaGCTCAtG GtGG-3')	380 - 400pb	95°C por 5 min. 35 ciclos de: 94°C por 30 seg., 56°C por 45 seg., 72°C por 45 seg. e 72°C por 7min.	NORMAN <i>et al.</i> , 1995. Adaptado
	BhCS.1137n (5'-AaTGCAAAAAGaAC AGTaAACA-3')			
<i>(htrA)</i> gene de choque térmico	CAT1 (5'-GATTCAATTGGTTT GA(G/A)GAG GCT- 3')	414pb	95°C por 5 min. 35 ciclos de: 94°C por 30 seg., 52°C por 45 seg., 72°C por 45 seg. e 72°C por 7min.	ANDERSON, <i>et al.</i> (1994). Adaptado
	CAT2 (5'-TCACATCACCAGG (A/G)CGTATTC- 3')			
<i>(rpoB)</i> subunidade β da RNA polimerase	1400F (CGCATTGGCTTACTTCGTA TG)	825pb	95°C por 5 min. 35 ciclos de: 95°C por 30 seg., 53°C por 30 seg., 72°C por 1 min. e 72°C por 7min.	RENESTO <i>et al.</i> , 2001.
	2300R (GTAGACTGATTAGAACGC TG)			

A amplificação foi realizada por pré-desnaturação, 1 ciclo por 5 min a 94 ° C, seguido por 35 ciclos de desnaturação, 95 ° C por 30s, anelamento 56 ° C por 45s e extensão de 72 ° C por 45s, a amplificação foi completada por um adicional ciclo de 72°C por 7 minutos, em um (termociclador com gradiente, modelo: veriti 96-well thermal cycler, 0.2ml - applied biosystems). E utilizamos o gene que codifica a subunidade beta da RNA polimerase (*rpoB*),

direcionado com os iniciadores 1400F (5'-GCATTGGCTTACTTCGTATG-3') e 2300R (5'-GTAGACTGATTAGAACGCTG-3') conforme descrito por Renesto, et al., (2001). A amplificação foi realizada por pré-desnaturação, 1 ciclo por 5 min a 95 ° C, seguido por 35 ciclos de desnaturação, 95 ° C por 30s, anelamento 53 ° C por 30s e extensão de 72 ° C por 1 minuto, a amplificação foi concluída por um ciclo adicional de 72°C por 7 minutos, em um (termociclador com gradiente, modelo: veriti 96-well thermal cycler, 0.2ml - applied biosystems).

MIX- uma mistura de reação com um volume final de 25 µl contendo 14,3 µl de água de grau molecular (Epicentro), 0,25 µl de 10 mMol de mistura de desoxinucleosídeo trifosfato - dNTP, 2,5 µl de 10 × tampão de PCR, 0,75 µl de 25 mMol de MgCl₂ e 0,2 ul de Taq polimerase. Todos os reagentes foram adquiridos da Invitrogen® (São Paulo, Brasil). A mistura de reação foi completada adicionando 1 µl de cada iniciador direto e reverso (iniciador 1 e iniciador 2), acima mencionado e 2 µl de DNA de cada amostra de doador. Os controles negativos consistiram de 2 ul de água destilada e os positivos utilizados em todas as reações, consistiram em DNA de *B. henselae* (cepa Houston) cultivadas em células HEp-2 (Fuller Laboratories Fullerton, CA - USA).

4.5.4 Eletroforese

Os produtos amplificados pela PCR convencional foram submetidos a eletroforese, dez microlitros de cada ensaio de PCR foram submetidos em gel de agarose a 1,2% corado com SYBR® Safe DNA Gel (Invitrogen®) em tampão de corrida TBE 1X sob as condições de 60V durante 15 minutos e 100V durante 45 minutos. A presença de banda de 414 pb foi considerada positiva para o gene *htrA*; 380 a 400 bp Para *gltA* e 825 bp para o gene *rpoB* de acordo com a DNA ladder (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA) e os resultados foram visualizados e analisados em fotodocumentador para captura de géis de eletroforese – L-PIX TOUCH (Loccus®).

4.6 Sequenciamento

O produto amplificado da amostra positiva nas reações de PCR foi purificado utilizando o kit comercial Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification® (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. A amostra foi enviada a Rede de Plataformas Tecnológicas Fiocruz Genômica de Sequenciamento de DNA por eletroforese capilar (96 capilares) no Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Para a reação de sequenciamento foi utilizado o kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction® v3.1 e kit BigDye® X-Terminator Purification (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As sequências foram determinadas em sequenciador automático modelo ABI3730xl (Applied Biosystems), segundo seu manual de instruções. As sequências de nucleotídeos e seus cromatogramas foram analisados utilizando programa MEGA 6.0. e comparadas com outras sequências disponíveis no GenBank utilizando a ferramenta de pesquisa de alinhamento local básica (BLAST, National Center for Biotechnology Information, disponível em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

4.7 Análise estatística

As análises dos dados dos doadores de sangue incluídas nesse presente estudo foi realizada utilizando o software SPSS – (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 27. O teste Qui-quadrado foi usado para avaliar a possível associação entre amostras positivas por IFI e características dos doadores, como, gênero, raça, faixa etária, escolaridade, visitas a matas/florestas, contatos com animais e carrapatos. O p valor de Pearson foi usado a menos que mais de 20% das células tivessem valores esperados menores que 5, quando o p valor do teste exato de Fisher foi usado.

5 RESULTADOS

5.1 Teste Sorológico

Foram consideradas sorologicamente positivas, pela técnica de RIFI, as amostras que apresentaram coloração amarelo brilhante (Figura 4), na leitura pelo microscópio de fluorescência na amplificação de 400x.

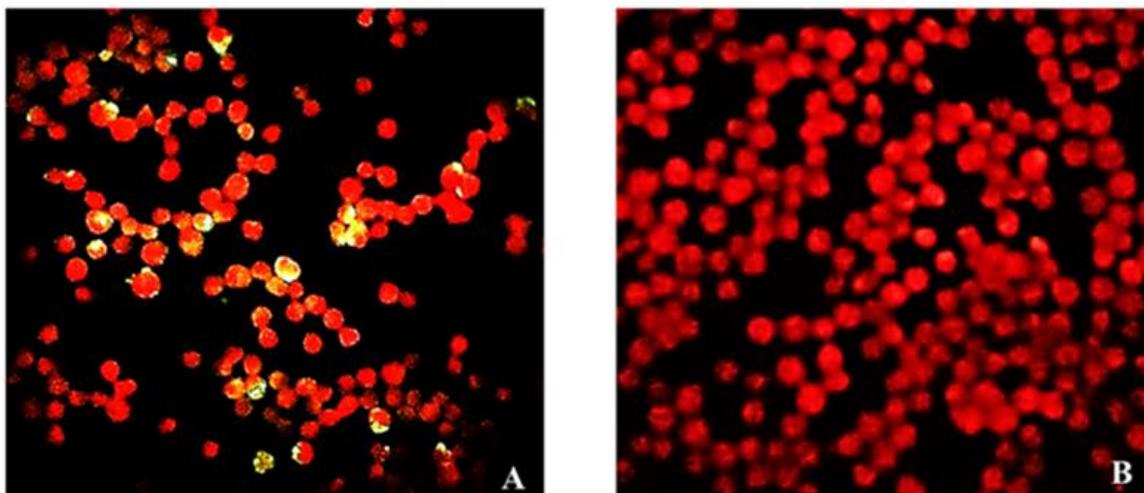


Figura 4 - Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI (A) reativa e (B) Não reativa para *Bartonella henselae* (Laboratório de Análises Clínicas (LAC - UFMS), aumento de 400x).

Das 501 amostras de doadores de sangue, 12% (60/501) apresentaram anticorpos IgG anti-*Bartonella henselae*. Segundo análise epidemiológica entre os doadores sororreagentes, 18 (30%) eram do sexo feminino e 42 (70%) do sexo masculino (Tabela 3) tinham idade entre 18 e 65 anos, sendo a maioria do município do Rio de Janeiro (41/68,3%), seguidos de Belford Roxo (3/5%), Duque de Caxias (5/8,33%), Itaguaí (rural)(1/1,66%), Maricá (1/1,66%), Mesquita (1/1,66%), Nilópolis (2/3,33%), Niterói (1/1,66%), Nova Iguaçu (1/1,66%), Queimados (2/3,33%), São Gonçalo (1/1,66%) e São João de Meriti (1/1,66%).

Nos testes sorológicos os sororreagentes apresentaram cut-off de 1:64, 1:128 e 1:256, conforme demonstrado na (Tabela 1). Sendo, 60 (100%) do total dos sororreagentes, com titulação de 1:64, 04/60 (6,66%) tiveram titulação 1:128 e 03/60 (5%) tiveram titulação de 1:256. Destes, 31,67% (19/60) tiveram contato com animal e 3,33% (2/60) contato com vetores. Uma amostra apresentou reação mais forte e foi de um doador do sexo masculino, 55 anos, da cor/raça negra, morador da região urbana da cidade do Rio de Janeiro, exercendo a profissão de motorista, respondeu que não teve contato com carrapato, mas que teve contato com o animal (cabrito).

Tabela 1. Titulação de anticorpos anti-*Bartonella henselae* pelo teste imunofluorescência indireta nas amostras de dos doadores de sangue, distribuido por gênero e contato com animais e vetores, no Rio de Janeiro – RJ, 2021. (N=60)

Titulação	Sexo			Contato	
	F=18 n=%	M=42 n=%	n (%)	Animais	Vetores
Reagente (1:64)	18 (30%)	42 (70%)	60 (100%)	19 (30%)	02 (3,33%)
Reagente (1:128) ^a	-	04 (1,7%)	04 (6,66%)	-	-
Reagente (1:256) ^a	-	03 (5%)	03 (5%)	-	-
Total	18 (30%)	42 (70%)	60 (100%)	19 (31,67%)	02 (3,33%)

^aMesmos doadores da titulação 1:64.

De acordo com os dados sóciodemográficos preenchidos na ficha epidemiológica para Rickettsioses – SINAN dos sororreagentes, a relação entre a cor e raça da população de doadores com base na autodeclaração, são 15 (25%) são brancos, 15 (25%) pretos e 30(50%) pardos. Não houve declaração como índigenas e amarelos. A maioria dos sororreativos estão na faixa entre 18-35 anos (31 doadores/51,66%), 36-45 anos (10 doadores/≅16,67%), seguidos de 46-55 anos (15 doadores 25%); e 56-65 anos (04 doadores/≅6,67%) (Tabela 2). As faixas etárias foram categorizadas de acordo com a distribuição oficial do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE.

Tabela 2. Perfil entre doadores de sangue sororreagentes , com exposição prévia a *Bartonella* spp. detectada por sorologia, em comparação a contato com animais e vetores. Rio de janeiro, RJ 2021 – (N=60)

Faixa etária	Contato com animais			Contato com Carrapatos			Total n (%)
	Sim n (%)	Não n (%)	Ignorado n (%)	Sim n (%)	Não n (%)	Ignorado n (%)	
18-35	08(25,8%)	07(22,6%)	16 (51,6%)	01(3,23%)	14 (45,17%)	16 (51,6%)	31 (100%)
36-45	05 (50%)	03 (30%)	02 (20%)	01 (10%)	07 (30%)	02 (60%)	10 (100%)
46-55	05 (33,3%)	04 (26,7%)	06(40%)	-	09(60%)	07 (46,66%)	15 (100%)
56-65	01 (25%)	01 (25%)	02(50%)	-	02 (50%)	01 (25%)	04 (100%)
Total	19 (31,7%)	15 (25%)	26 (43,34%)	02 (3,33%)	32 (53,33%)	26 (43,34%)	60 (100%)

Com relação aos doadores sororreagentes, 31,7% (19/60) tiveram contato ou posse de animais, sendo: 26,7% (16/60) com cães, destes, 3/16 tiveram contato também com pássaros (calopsita, papagaio e 1 pássaros não defenido) e 5/16 tiveram contato, também, com gatos, 3,3% (02/60) doadores tiveram contato somente com gatos e 1,66% (1/60) com cabrito. Do total de doadores sororreagente, 25% (15/60) responderam que não tiveram contato com animais e 43,34% (26/60) não responderam (ignorado). Exposição com vetores, 3,3% (02/60) doadores sororreagentes tiveram contato com carrapatos, 53,33% (32/60) responderam que não tiveram contato com vetores e 43,34% (26/60) não responderam (ignorados) (Tabela 3).

De acordo com as análises estatísticas, não houve significância ($p \text{ valor} \leq 0,05$) em nenhuma das características analisadas (Tabela 3). Em relação a média de idade dos doadores, 37,27 anos é a média de idade para não reagentes aos testes sorológicos e 37,55 para os doadores sororreagentes.

Tabela 3. Análise de fatores de risco entre doadores de sangue que tiveram contato com a *Bartonella* detectada por sorologia, em comparação com doadores não infectados. Rio de Janeiro, RJ 2021 – (N=501)

Característica	Sororreagente	Soronegativos	p-valor
	60/501	441/501	
	n (%)	n (%)	
Gênero			0,493
Masculino	42 (70%)	289 (65,53%)	
Feminino	18 (30%)	152(34,47%)	
Total	60 (100%)	441 (100%)	
Cor/Raça^a			0,194
Branco	15 (25%)	156 (35,37%)	
Pardo	30 (50%)	195 (44,22%)	
Preto	15 (25%)	80 (18,14%)	
Ignorados	-	10 (2,27%)	
Total	60 (100%)	441 (100%)	
Faixa etária			0,159
18-35 anos	31 (51,66%)	211 (47,94%)	
36-45 anos	10 (16,67%)	117 (26,53%)	
46-55 anos	15 (25%)	67 (15,19%)	
56-65 anos	04 (6,67%)	35 (7,94%)	

66-70 anos	-	11 (2,49%)	
Ignorado	-	-	
Total	60 (100%)	441 (100%)	
Escolaridade			0,964
Fundamental Completo	2 (3,33%)	15 (3,40%)	
Fundamental Incompleto	2 (3,33%)	21 (4,75%)	
Médio Completo	22 (36,66%)	147 (33,33%)	
Médio Incompleto	10 (16,67%)	82 (18,64%)	
Superior Completo	13 (21,68%)	106 (24,02%)	
Superior Incompleto	8 (13,33%)	47 (10,65%)	
Ignorado	3 (5%)	23 (5,21%)	
Total	60 (100%)	441 (100%)	
Ambientes Frequentados (Florestas/Matas)			0,248
Sim	4 (6,66%)	58 (13,15%)	
Não	30 (50%)	232 (52,60%)	
Ignorado	26 (43,34%)	151 (34,25%)	
Total	60 (100%)	441 (100%)	
Contato com animais^b			0,789
Sim	19 (31,70%)	162 (36,70%)	
Não	15 (25%)	141 (32%)	
Ignorado	26 (43,30%)	138 (31,30%)	
Total	60 (100%)	441 (100%)	
Carrapatos			1
Sim	2 (3,33%)	20 (4,54%)	
Não	32 (53,33%)	284 (64,40%)	
Ignorado	26 (43,34%)	137 (31,06%)	
Total	60 (100%)	441 (100%)	

^aNas análises, apenas pardo, preto e branco foram incluídos.

^bNas análises foram incluídas somente “sim” ou “não” relativo ao contato com os animais.

O teste Qui-quadrado de Pearson foi usado a menos que mais de 20% das células tivessem valores menores que 5. Neste caso o p valor do teste exato de Fisher foi usado.

Gênero, cor/raça, faixa etária e escolaridade foram categorizadas de acordo com o IBGE.

5.2 Testes Moleculares

5.2.1 Análise da PCR convencional para o IRBP

Na PCR para o gene IRBP foi verificada que todas as amostras de DNA foram positivas para esse alvo, indicando a qualidade do DNA extraído e a ausência de inibidores na reação de PCR.

5.2.2 Análise da PCR convencional para *Bartonella spp.*

O DNA de *Bartonella sp.* foi amplificado em 1 (0,2%) das 501 amostras de doadores de sangue testados (figura 5).

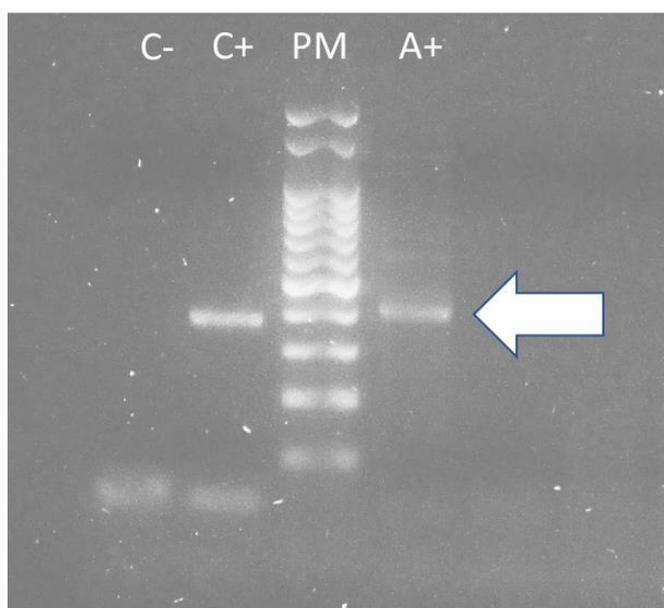


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1.2% corado com SYBR® Safe para protocolo de PCR convencional baseada no gene *gltA*. As bandas correspondem à amplificação de aproximadamente 400pb do referido gene de amostras de DNA extraídas de amostra de sangue. Legenda: Controle negativo (C-), Controle positivo (C+), Peso molecular 100pb (PM), amostra positiva de sangue (A+). Imagem grupo *Bartonella*. Fonte: Autoria própria.

DNA de *Bartonella sp.* foi amplificado a partir dos genes *gltA* (Figura 5). Essa amostra pertence a um doador morador da cidade do Rio de Janeiro - RJ, e seus dados sociodemográficos são, sexo masculino, de cor branca, 43 anos, morador da região urbana, possui grau de

escolaridade ensino médio e profissão vendedor. Este doador não respondeu aos dados sobre contato com animais e vetores.

5.2.3 Análise do sequenciamento

Na análise da amostra proveniente de sangue do doador de sangue para o fragmento do gene *gltA* amplificado e sequenciado foi encontrada porcentagem de identidade de 100% com sequência de *Bartonella henselae* (KT945243) depositada na base de dados GenBank, na análise da amostra proveniente de sangue do doador de sangue.

6 DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho realizado em banco de sangue no estado do Rio de Janeiro, região Sudeste do Brasil, que demonstrou soroprevalência de 12% (60/501) de *Bartonella henselae* na população de doadores de sangue assintomáticos. Neste estudo, a probabilidade de ocorrer reação heterológica, ou seja, reação cruzada com outros gêneros de bactérias é praticamente nula, pois esta reação ocorre na fase inicial da infecção, quando há detecção da imunoglobulina M (LAMAS *et al.*, 2010), que não é o caso deste trabalho.

Estudos anteriores, em alguns estados brasileiros, demonstraram a exposição desta bactéria em doadores de sangue através de métodos sorológicos e/ou moleculares. Em Campinas – SP, encontraram soroprevalência IgG de 16% e 32% de *B. henselae* e *B. quintana* respectivamente (PITASSI, *et al.*, 2015).

Estudos no Chile, com 140 amostras de doadores aleatórios, obtiveram 19/140 (13,6%) de amostras positivas pelo método molecular. Destas amostras foram identificadas 18 sendo de *B. henselae* (Núñez *et al.*, (2017).

O teste sorológico não deve ser utilizado como única ferramenta diagnóstica e, em caso de positividade, deve ser interpretado como uma exposição anterior à *Bartonella* sp.. Este teste deve ser utilizado em conjunto com outras técnicas como cultura e a PCR para garantir a fidelidade do diagnóstico (Breitschwerdt, 2017).

Fatidicamente, como não há obrigatoriedade para os testes de sorológicos e moleculares na triagem em doadores de sangue o diagnóstico de infecções causadas por *Bartonella* spp.. Os dados referentes à ocorrência de bartoneloses em populações saudáveis são escassos. No entanto, o diagnóstico somente por soroprevalência pode diferir por regiões, tais como: Grécia,

a soroprevalência foi de 21,6% (MINADAKIS *et al.*, 2008), na Espanha, 8,7% (PONS, I *et al.*, 2008), na Croácia foi de 57,4% (PANDAK *et al.*, 2009), na Turquia, respectivamente foi de 6%, 11,5% e 9,9% (YILMAZ *et al.*, 2009; AYDIN *et al.*, 2014; ARICI, AKSARAY e ANKARALI H, 2021), na China foi de 19,6% (LIU, EREMEEVA e LI, 2012), na Itália foi 11.4% (MANSUETO *et al.*, 2012), e na Polônia foi de 23% (LYSAKOWSKA *et al.*, 2019).

O resultado sorológico deste estudo foi de 12% 60/501. No ano de 2018, a soroprevalência de alguns patógenos do HEMORIO apresentou os resultados: um total de 279,101 doadores de sangue aptos, foram sororreagentes (4,26%) para HTLV 1 e 2, (5,9%) para Hepatite B anti-HBC, (23,43%) para Hepatite B HBsAg, (5,8%) para Hepatite C; (45,66%) para Sífilis; (6,82%) para HIV e (6,41%) para doença de Chagas (HEMORIO, 2020). Isso aponta a relevância dos resultados de *Bartonella*, uma vez que neste estudo apresenta 12%, uma prevalência mais alta do que os realizados para outros patógenos na triagem de rotina dos doadores de sangue.

Neste estudo foram avaliados estatisticamente os possíveis fatores de risco como, contato com animais e vetores, porém, não obtivemos p-valor ≤ 5 de significância associados à contato/infecção por *Bartonella*. Os reservatórios mais conhecidos de *B. henselae* são gatos e menos comum em cães, mas chama atenção, porque em estudo realizado na Turquia o achado mais comum foi linfadenite e 35 pacientes (76%) tinham história prévia de contato com animais (gato / cachorro) (ARICI, AKSARAY e ANKARALI, 2021). No Brasil demonstraram que a exposição com o gato aumenta até 3 a 4 vezes a probabilidade de ter infecção por *Bartonella* (DINIZ *et al.*, 2016). Pons *et al.*, (2008), na Espanha, detectou 31,6 % de soropositividade em pessoas saudáveis que relataram exposição a gatos. Na Coreia, a posse do gato foi associada com soropositividade para *B. henselae* 9,8 % dos indivíduos que tiveram contato com gatos e apresentaram soropositividade, em comparação com 2,0 % daqueles sem contato com gatos (KWON *et al.*, 2017). Já na Turquia demonstraram significância estatística com o contato de vetores (YILMAZ *et al.*, 2009). E assim, pode ser que estatisticamente não obtivemos p-valor significativo pelo fato, de os doadores não responderem o questionário adequadamente. Por exemplo, 26/60 (43,30%) dos sororreagentes não responderam às perguntas, se tiveram contatos com vetores e animais.

No presente estudo foi detectado a presença de *Bartonella* spp. em uma amostra (0,2%) 1/501 pelos métodos de biologia Molecular (PCR convencional- gene *gltA*). No entanto, no teste sorológico, este doador foi negativo, ou seja, demonstrando infecção recente para a bactéria e não apresentando resposta imunológica. Vários trabalhos demonstram que não há correlação

entre PCR e sorologia positiva (Pitassi *et al* 2015; Maggi *et al*, 2011). Isso demonstra o risco de os receptores receberem sangue contaminado por *Bartonella*.

A presença do DNA de *Bartonella henselae* em doadores de sangue no município do Rio de Janeiro, o primeiro relato da circulação desta bactéria nos doadores dessa região, sinaliza a necessidade de mais estudos sobre este agente etiológico no território brasileiro e os resultados obtidos apontam importância de incluir a pesquisa de *Bartonella* spp. na triagem de rotina em doadores de sangue e em pacientes pré-transplante, e que as amostras de sangue dos doadores podem ser confirmadas com mais precisão por métodos moleculares como PCR em combinação de cultura e sequenciamento.

No contexto da medicina transfusional, infecções emergentes têm sido identificadas como constante ameaça para a saúde humana. Muitas destas infecções são conhecidas por serem transmissíveis por sangue. A transmissão transfusional de espécies de *Bartonella* já foi documentada em gatos e há relatos de transmissão sanguínea por agulhas contaminadas entre veterinários (LIN, CHEN E CHANG, 2011; OTEO *et al.*, 2017).

A infecção por *Bartonella* spp. foi relatada em receptores de transplante de fígado. Como *B. henselae* sobrevive nos glóbulos vermelhos após o período de estocagem, e o receptor do fígado transplantado havia recebido hemoderivados durante e depois do transplante, estes fatos levantaram a hipótese de transmissão transfusional (MAGALHÃES *et al.*, 2008; VELHO, 2009). No Peru demonstrou que um paciente recebeu plaquetas contaminadas com *Bartonella bacilliformis* e foi diagnosticado com febre de Oroya (PONS *et al.*, 2016).

A transmissão de *B. henselae* por transfusão sanguínea foi confirmada em um modelo de estudo em camundongo, mesmo quando os animais doadores apresentavam infecção indetectável da corrente sanguínea (NEVES *et al.*, 2016; NÚNEZ *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2016).

O estudo demonstrou apenas uma amostra positiva para *Bartonella*. Isso pode ser explicado pela reduzida quantidade de *Bartonella* na corrente sanguínea, uma vez que ocorre sua inoculação no hospedeiro, a bactéria permanece no nicho dermal. O fato de a *Bartonella* sp. ser fastidiosa, ou seja, de difícil crescimento, ambiente equilibrado para o seu crescimento *in vitro*, de temperatura de 37 °C com 5% de gás carbônico, ágar enriquecido com sangue (5% - 10%), ou em meio de solução de soro fetal bovino ou cultura de tecido, seria recomendado (BRENNER *et al.*, 1993; MAGGI, DUNCAN e BREITSCHWERDT, 2005; PITASSI *et al.*, 2015; Diniz *et al.*, 2016).

No estudo de Pitassi *et al.*, (2015), em Campinas -SP demonstrou que através de técnicas de cultura por meio de crescimento líquido de *Bartonella* alfa-Proteobacteria (BAPGM – do inglês - *Bartonella alpha-Proteobacteria growth medium*) e PCR, positividade de mais de 50% de *Bartonella* spp. Sendo assim, é importante o uso da técnica de crescimento pelo meio de cultura (BAPGM), o que não ocorreu neste estudo. E assim, a falta dessa técnica de enriquecimento em nosso estudo pode ter sido a base do reduzido número de amostras positivas na PCR.

Bartonella spp. são responsáveis por diversas doenças em humanos e animais, e a resposta imune do hospedeiro desempenha um papel fundamental na interrupção do desenvolvimento da infecção para formas mais perigosas; por exemplo, *B. henselae* pode causar doença disseminada grave e vasoproliferação patológica em pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes, principalmente, transplantados. Sendo assim, a prevalência de infecções deve ser monitorada, principalmente considerando o potencial zoonótico de *Bartonella* spp. (VELHO, 2009; FAVACHO *et al.*, 2014; PISCHEL *et al.*, 2021).

No Brasil, existem poucos estudos sobre a ocorrência de infecções por *Bartonella* em seres humanos. Estudos mostram elevada prevalência de infecção, com taxas que podem variar de 20 a 95% (CRISSIUMA *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2010). Recentemente, o primeiro caso de DAG confirmado por análise molecular no Rio de Janeiro foi identificado em um paciente HIV positivo (FAVACHO *et al.*, 2014). Apesar da variedade de manifestações clínicas, pode haver bacteremia assintomática como ocorre em doadores de sangue infectados por *B. henselae* (SANOGO *et al.*, 2003; MILLER; BREITSCHWERDT; MAGGI, 2019).

Infecção por *Bartonella* spp. em doadores de sangue é assintomática e com isso há a necessidade de realização de testes para detectar a *Bartonella* durante o processo de doação ou na triagem das bolsas de sangue. No entanto, a ausência destes testes é um agravante para os receptores de sangue, principalmente nos imunossuprimidos (transplantados) e imunocomprometidos (HIV) entre outros, (FAVACHO *et al.*, 2014; PICASCIA *et al.*, 2017).

7 CONCLUSÕES

- Os resultados deste estudo indicam evidências sorológicas significativas de *Bartonella henselae* em doadores de sangue no estado do Rio de Janeiro;
- Nossos resultados também mostram a identificação, com base na análise molecular, da espécie *Bartonella henselae* em uma amostra de doador de sangue no município do Rio de Janeiro. Constituindo o primeiro relato da circulação desta bactéria nos doadores dessa região, o que sinaliza a necessidade de mais estudos sobre esse agente patógeno no território brasileiro.
- Os resultados obtidos apontam a importância de incluir a pesquisa de *Bartonella* spp. na triagem de rotina em doadores de sangue e em pacientes pré-transplante, e que as amostras de sangue dos doadores podem ser confirmadas com mais precisão por métodos moleculares como PCR, combinado à cultura.
- Não observamos associação de soropositividade para *Bartonella* e as variáveis coletadas neste estudo. Entretanto, a ausência de fatores de risco associados a transmissão transfusional, pode ser devido a necessidade de mais informações dos doadores de sangue, uma vez que estes doadores deixaram uma grande quantidade de respostas ignoradas no questionário aplicado.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU-YANES, E.; ABREU-ACOSTA, N.; KOSOY, M.; FORONDA, P. Detecção molecular de *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae* e *Rickettsia felis* em pulgas de cães e gatos em Tenerife, Ilhas Canárias, Espanha. **J Vector Ecol.** 2020; 45(2):233-240.

AKRAM, S.; M.; ANWAR, M.; Y.; THANDRA, K.; C.; RAWLA, P. Bacillary Angiomatosis. 2021 Jul 10. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448092>.> Acesso em 11/08/2021

ALEXANDER, B. A review of bartonellosis in Ecuador and Colombia. **Am J Trop Med Hyg.** 1995 Abr;52(4):354-9

ANDERSON, B.; SIMS, K.; REGNER, R.; ROBINSON, L.; SCHMIDT, M.J.; GORAL, S.; HAGER, C.; EDWARDS, K. Detection of *Rochalimaea henselae* DNA in specimens from cat scratch disease patients by PCR. **J Clin Microbiol.** 1994 Abr;32(4):942-8.

APPELT, S.; ARMOUGOM, F. L. E.; BAILLY, M.; ROBERT, C.; DRANCOURT, M. Polyphasic analysis of a Middle Ages coprolite microbiota, Belgium. **PLoS One.** 2014 Feb 28;9(2): e88376. doi: 10.1371/journal.pone.0088376

ARICI, N.; AKSARAY, S.; ANKARALI, H. *Bartonella henselae* IgM seropositivity in both adult and pediatric patients with diverse clinical conditions in Turkey. **Acta Microbiol Immunol Hung.** 2021 Mar 2.

AYDIN, N.; BÜLBÜL, R.; TELLİ, M.; GÜLTEKİN, B. Aydın ili kan donörlerinde *Bartonella henselae* ve *Bartonella quintana* seroprevalansı [Seroprevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* in blood donors in Aydın province, Turkey]. **Mikrobiyol Bul.** 2014 Jul;48(3):477-83.

BAI, Y.; GILBERT, A.; FOX, K.; OSIKOWICZ, L.; KOSOY, M. *Bartonella rochalimae* and *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* in wild carnivores from colorado, usa. **j wildl dis.** 2016 oct;52(4):844-849. doi: 10.7589/2016-01-015.

BATTISTI, J. M.; LAWYER, P. G.; MINNICK, M. F. Colonization of *Lutzomyia verrucarum* and *Lutzomyia longipalpis* Sand Flies (Diptera: *Psychodidae*) by *Bartonella bacilliformis*, the

Etiologic Agent of Carrión's Disease. **PLoS Negl Trop Dis**. 2015 Oct 5;9(10):e0004128. doi: 10.1371/journal.pntd.0004128

BIRTLES, R. J.; HARRISON, T. G.; SAUNDERS, N. A.; MOLYNEUX, D.H. Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp.nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. **Int J Syst Bacteriol** 1995; 45:1–8

BOUHSIRA, E.; FERRANDEZ, Y.; LIU, M.; FRANC, M.; BOULOUIS, H.J.; BIVILLE, F. *Ctenocephalides felis* an in vitro potential vector for five *Bartonella* species. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**. 2013;36:105–111.

BRAGA, M. S. C. O.; DINIZ, P. P. V. P.; ANDRÉ, M. R.; BORTOLI, C. P.; MACHADO, R. Z. Molecular characterisation of *Bartonella* species in cats from São Luís, state of Maranhão, north-eastern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2012 Sep;107(6):772-7.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução-RDC nº 34, de 11 de junho de 2014**. Dispõe sobre as Boas Práticas no Ciclo do Sangue. Diário Oficial da União, 2014. Disponível em: < <https://inc.saude.gov.br/download/resolucao-rdc-n-34-de-11-de-junho-de-2014.pdf> > Acesso em 10/12/2020.

BRASIL. **Constituição da República Federativa do Brasil de 1988**. Brasília. 1988. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicao.htm>. Acesso em: 10/12/2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 158, de 04 de fevereiro de 2016. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos**. Brasília, 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/abril/12/PORTARIA-GM-MS-N158-2016.pdf>> Acesso em: 10/12/2020

BRASIL. Ministério da Saúde. Ministério da Saúde promove a Semana Nacional da Doação de Sangue. Brasília, 2016. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/ministerio-da-saude-promove-a-semana-nacional-da-doacao-de-sangue>. Acesso em: 27/09/2021.

BREITSCHWERDT, E.B.; BRADLEY, J.M.; MAGGI, R.G.; LASHNITS, E.; REICHERTER, P. *Bartonella* Associated Cutaneous Lesions (BACL) in People with Neuropsychiatric Symptoms. **Pathogens**. 2020 Dec 4;9(12):1023.

BREITSCHWERDT, E. B.; MAGGI, R. G. *Bartonella quintana* and *Bartonella vinsonii* subsp. *vinsonii* bloodstream co-infection in a girl from North Carolina, USA. **Med Microbiol Immunol**. 2019 Feb;208(1):101-107.

BREITSCHWERDT, E. B. Bartonellosis, One Health and all creatures great and small. **Vet Dermatol**. 2017 Fev;28(1):96-e21.

BREITSCHWERDT, E.B.; MAGGI, R.G.; CHOMEL, B.B.; LAPPIN, M.R. Bartonellosis: an emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings. **J Vet Emerg Crit Care** (San Antonio). 2010 Fev;20(1):8-30.

BREITSCHWERDT, E.B.; MAGGI, R.G.; NICHOLSON, W.L.; CHERRY, N.A.; WOODS, C.W. *Bartonella* sp. bacteremia in patients with neurological and neurocognitive dysfunction. **J Clin Microbiol**. 2008;46:2856–2861.

BRENNER, D.J.; O'CONNOR, S.P.; WINKLER, H.H.; STEIGERWALT, A.G. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb.nov., *Bartonella vinsoni* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from the order *Rickettsiales*. **Int J Syst Bacteriol** 1993; 43:777–786

CLARRIDGE, J.E.; RAICH, T.J.; PIRWANI, D.; SIMON, B.; TSAI, L.; RODRIGUEZ-BARRADAS, M.C.; REGNERY, R.; ZOLLO, A.; JONES, D.C.; RAMBO, C. Strategy to detect and identify *Bartonella* species in routine clinical laboratory yields *Bartonella henselae*

from human immunodeficiency virus-positive patient and unique *Bartonella* strain from his cat. **J Clin Microbiol.** 1995 Aug;33(8):2107-13.

CHESLOCK, M. A.; EMBERS, M. E. Human bartonellosis: an underappreciated public health problem? **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 4, n. 69, apr. 2019. Doi: 10.3390/tropicalmed4020069

CHOMEL, B. B.; KASTEN, R. W. Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. **J Appl Microbiol.** 2010 Set;109(3):743-50.

CHOMEL, B.B.; MAC DONALD, K.A.; KASTEN, R.W.; CHANG, C.C.; WEY, A.C.; FOLEY, J.E.; THOMAS, W.P.; KITTLESON, M.D. 2001. Aortic valve endocarditis in a dog due to *Bartonella clarridgeiae*. **J Clin Microbiol** 39:3548 –3554.

CORRÊA, F.G.; C.L.S. PONTES, R.M.M. VERZOLA, J.C.P. MATEOS, P.E.N.F. VELHO, A.G. SCHIJMAN AND H.S. SELISTRE-DE-ARAÚJO. Association of *Bartonella* spp bacteremia with Chagas cardiomyopathy, endocarditis and arrhythmias in patients from South America. **Braz J Med Biol Res**, July 2012, v. 45(7): 644-651.

COSTA, F.; PORTER, F. H.; RODRIGUES, G.; FARIAS, H.; DE FARIA, M. T.; WUNDER E. A.; OSIKOWICZ, L. M.; KOSOY, M. Y.; REIS, M.G.; KO, A. I.; CHILDS, J. E. Infections by *Leptospira interrogans*, Seoul virus, and *Bartonella* spp. among Norway rats (*Rattus norvegicus*) from the urban slum environment in Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis.** 2014 Jan;14(1):33-40. doi: 10.1089/vbz.2013.1378. Epub 2013 Dez 20

COTTÉ, V.; BONNET, S.; LE RHUN, D.; LE NAOUR, E.; CHAUVIN, A.; BOULOUIS, H.J.; LECUELLE, B.; LILIN, T.; VAYSSIER-TAUSSAT, M. Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. **Emerg Infect Dis.** 2008;14:1074–1080

CRISSIUMA, A.; FAVACHO, A.R.M.; GERSHONY, L.; MENDES-DE-ALMEIDA, F.; GOMES, R.; MARES-GUIA, A.; ROZENTAL, T.; BARREIRA, J.; LEMOS, E.; LABARTHE, N. Prevalence of *Bartonella* species DNA and antibodies in cats (*Felis catus*) submitted to a spay/neuter program in Rio de Janeiro, Brazil. **J Feline Med Surg.** 2011;13(2):149-51

COSTA, P. S.; BRIGATTE, M. E.; GRECO, D. B. Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2005 Dec;100(8):853-9

DENG, H.; PANG, Q.; ZHAO, B.; VAYSSIER-TAUSSAT, M. Molecular Mechanisms of *Bartonella* and Mammalian Erythrocyte Interactions: A Review. **Front Cell Infect Microbiol**. 2018 Dec 12;8:431.

DENG, H. K.; LE RHUN, D.; LE NAOUR, E.; BONNET, S.; VAYSSIER-TAUSSAT, M. Identification of *Bartonella* Trw host-specific receptor on erythrocytes. **PLoS One**. 2012;7(7):e41447. doi: 10.1371/journal.pone.0041447. Epub 2012 Jul 26.

DINIZ, L. M.; MEDEIROS, K. B.; LANDEIRO, L. G.; LUCAS, E. A. Bacillary angiomatosis with bone invasion. **An Bras Dermatol**. 2016 Nov-Dec;91(6):811-814.

DRANCOURT, M.; TRAN-HUNG, L.; COURTIN, J.; LUMLEY, H.; RAOULT, D. *Bartonella quintana* in a 4000-year-old human tooth. **J Infect Dis** 2005;191:607-611.

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* 2007, 69, 273–281.

DOLAN, M. J.; WONG, M. T.; REGNERY, R. L.; JORGENSEN, J. H.; GARCIA, M.; PETERS, J.; DREHNER, D. – Syndrome of *Rochalimaea henselae* adenitis suggesting cat scratch disease. **Ann. Intern. Med.**, 118:331–6, 1993.

EREQAT, S.; NASEREDDIN, A.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; ABDELKADER, A.; AL-JAWABREH, A.; ZAID, T.; AZMI, K.; ABDEEN. Z. Molecular evidence of *Bartonella* species in ixodid ticks and domestic animals in Palestine. **Front Microbiol** 2016 - 7:1217.

FAVACHO, A.R.M.; ROGER, I.; AKEMI, A.K.; PESSOA, A.A. JR.; VARON, A.G.; GOMES, R.; GODOY, D.T.; PEREIRA, S.; LEMOS, E.R. Molecular identification of *Bartonella henselae* in a seronegative cat scratch disease patient HIV with AIDS in Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Inst Med Tropical São Paulo**, July-August, 56(4): 363-365. 2014

FERREIRA, E. C.; GONTIJO, C. M.; CRUZ, I.; MELO, M. N.; SILVA, A. M. Alternative PCR protocol using a single primer set for assessing DNA quality in several tissues from a large variety of mammalian species living in areas endemic for leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 7, p. 895-898, nov. 2010.

FOUCH, B.; COVENTRY, S. A case of fatal disseminated *Bartonella henselae* infection (cat-scratch disease) with encephalitis. **Arch Pathol Lab Med**. 2007 Oct;131(10):1591-4.

GARCIA-QUINTANILLA, M.; DICHTER, A. A.; GUERRA, H.; A. J. KEMPF, V. A. J. Carrion's disease: more than a neglected disease. *Parasites & Vectors*, v. 12, n. 141, mar. 2019.

GILLESPIE, T.N.; WASHABAU, R.J.; GOLDSCHMIDT, M.H.; CULLEN, J.M.; ROGALA, A.R.; BREITSCHWERDT, E.B. Detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* DNA in hepatic specimens from two dogs with hepatic disease. **J Am Vet Med Assoc** 2003; 222:47-51, 35

GLAUS, T.; HOFMANN-LEHMANN, R.; GREENE, C.; GLAUS, B.; WOLFENSBERGER, C.; LUTZ, A.H. Seroprevalence of *Bartonella henselae* infection and correlation with disease status in cats in Switzerland. **J Clin Microbiol**. 1997;35:2883-2885

GOLLY, E.; BREITSCHWERDT, E.B.; BALAKRISHNAN, N.; MOORE, D.; BIZIKOVA, P. *Bartonella henselae*, *Bartonella koehlerae* and *Rickettsia rickettsii* seroconversion and seroreversion in a dog with acute-onset fever, lameness, and lymphadenopathy followed by a protracted disease course. **Vet Parasitol Reg**. 2017;7:19-24.

GOMES, C.; RUIZ, J. Carrion's Disease: the Sound of Silence. **Clin Microbiol Rev**. 2017 Nov 29;31(1):e 00056-17.

GUTIÉRREZ, R.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; BUFFET, J.P.; HARRUS, S. Guidelines for the Isolation, Molecular Detection, and Characterization of *Bartonella* Species. **Vector Borne Zoonotic Dis**. 2017 Jan;17(1):42-50.

HAMERSCHLAK, N.; JUNQUEIRA, P. C.; ROSENBLIT, J. História da hemoterapia no Brasil. In **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 201-207, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v27n3/v27n3a13.pdf>>. Acesso em: 30/06/2021

HARMS, A.; DEHIO, C. Intruders below the radar: molecular pathogenesis of *Bartonella* spp. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 25, n. 1, p. 42-78, Jan. 2012.

HEMORIO - HEMORREDE ESTADO RJ. DOAÇÃO DE SANGUE. HEMATOLOGIA. ENSINO E PESQUISA. Rio de Janeiro - RJ. Disponível em: <http://www.hemorio.rj.gov.br/Html/Apresentacoes/Indicadores_Hemorio_2020/Dados.htm#1> . Acesso em: 14/09/2021

HICKS, L. D.; MINNICK, M. F. As células endoteliais vasculares humanas expressam o fator de crescimento epitelial em resposta à infecção por *Bartonella bacilliformis* . **PLoS Negl Trop Dis** . 2020; 14 (4): e0008236

JACKSON, L.A.; PERKINS, B.A.; WENGER, J.D. Scratch disease in cats in the United States: an analysis of three national databases. **Am J Public Health** 1993 83: 1707–1711

KAISER, P. O.; RIESS, T.; O'ROURKE, F.; LINKE, D.; KEMPF, V.A. *Bartonella* spp.: throwing light on uncommon human infections. *Int J Med Microbiol*. 2011 Jan;301(1):7-15.

KITADA, A. A.; FAVACHO, A. R.; OLIVEIRA. R. V.; PESSOA, A. A. JR.; GOMES, R.; HONSE, C. O.; GREMIÃO, I. D.; LEMOS, E. R.; PEREIRA, S. A. Detection of serum antibodies against *Bartonella* species in cats with *sporotrichosis* from Rio de Janeiro, Brazil. **J Feline Med Surg**. 2014 Apr;16(4):308-11.

KORDICK, D.L.; BREITSCHWERDT, E.B. Relapsing bacteremia after blood transmission of *Bartonella henselae* to cats. **Am J Vet Res**. 1997;58:492–497.

KORDICK, D.L.; HILYARD, E.J.; HADFIELD, T.L.; WILSON, K.H.; STEIGERWALT, A.G.; BRENNER, D.J.; BREITSCHWERDT, E.B. *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease). **J Clin Microbiol** 1997 35:1813–1818.

KOSEK, M.; LAVARELLO, R.; GILMAN, R.H.; DELGADO, J.; MAGUIÑA, C.; VERÁSTEGUI, M.; LESCANO, A.G.; MALLQUI, V.; KOSEK, J.C.; RECAVARREN, S.; CABRERA, L. Natural history of infection with *Bartonella bacilliformis* in a nonendemic population. **J Infect Dis**. 2000 Sep;182(3):865-72.

KUYKENDALL, L. D. ORDER, V. I. *Rhizobiales* ord. nov. **Bergey's Manual of 528 Systematic Bacteriology**. In: Brenner, D. J.; Krieg, N. R.; Staley, J. T.; Garrity, G. M. 529 (Eds.), vol. 2, Springer, New York, p. 324, 2006.

KWON, H. Y.; IM, J. H.; LEE, S. M.; BAEK, J. H.; DUREY, A.; PARK, S. G.; KANG, J. S.; LEE, J. S. The seroprevalence of *Bartonella henselae* in healthy adults in Korea. **Korean J Intern Med**. 2017 May;32(3):530-535.

LA, V. D.; CLAVEL, B.; LEPETZ, S.; ABOUDHARAM, G.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. Molecular detection of *Bartonella henselae* DNA in the dental pulp of 800-year-old French cats. **Clin Infect Dis**. 2004 Nov 1;39(9):1391-4.

LAMAS, C. C.; MARES-GUIA, M.A.; ROZENTAL, T.; MOREIRA, N.; FAVACHO, A. R.; BARREIRA, J.; GUTERRES, A.; BÓIA, M. N.; DE LEMOS, E. R. *Bartonella* spp. infection in HIV positive individuals, their pets and ectoparasites in Rio de Janeiro, Brazil: serological and molecular study. **Acta Trop**. 2010 Jul-Aug;115(1-2):137-41

LAROCHE M, BERENGER J-M, MEDIANNIKOV O, RAOULT D, PAROLA P. Detection of a Potential New *Bartonella* Species “Candidatus *Bartonella rondoniense*” in Human Biting Kissing Bugs (Reduviidae; Triatominae). **PLoS Negl Trop Dis** 11(1): 2017, e0005297.

LASHNITS, E.; CORREA, M.; HEGARTY, B.C.; BIRKENHEUER, A.; BREITSCHWERDT, E.B. *Bartonella* seroepidemiology in dogs from North America, 2008–2014. **J Vet Intern Med**. 2018; 32:222–231.

LEMOS, E. R. S. de. **Rickettsioses**. In: Coura J. R., editor. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap 142. 2018.

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 and Zoonotic Diseases*, v. 11, n. 5, p. 589-591, 2011.

LIU, Q.; EREMEEVA, M.E.; LI, D. *Bartonella* and *Bartonella* infections in China: from the clinic to the laboratory. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**. 2012 Mar;35(2):93-102.

LOGAN, J.M.J.; HALL, J.L.; CHALKER, V.J.; O'CONNELL, B.; BIRTLES, R.J. *Bartonella clarridgeiae* infection in a patient with aortic root abscess and endocarditis. *Access Microbiol.* 2019 Oct 10;1(10):e000064.

LUCEY, D.; DOLAN, M. J.; MOSS, C. W.; GARCIA, M.; HOLLIS, D. G.; WEGNER, S.; MORGAN, G.; ALMEIDA, R.; LEONG, D.; GREISEN, K. S. Relapsing illness due to *Rochalimaea henselae* in immunocompetent hosts: implication for therapy and new epidemiological associations. **Clin Infect Dis.** 1992;14:683–688

ŁYSAKOWSKA, M.E.; BRZEZIŃSKA, O.; SZYBKA, M.; KONIECZKA, M.; MOSKWA, S.; BRAUNCAJS, M.; MAKOWSKA, J.; PASTUSZAK-LEWANDOSKA, D.; GRZEGORCZYK, J. The seroprevalence of *Bartonella* spp. in the blood of patients with musculoskeletal complaints and blood donors, Poland: a pilot study. **Clin Rheumatol.** 2019;38(10):2691-2698.

MACKENZIE, J. S.; JEGGO, M. The One Health Approach-Why Is It So Important? **Trop Med Infect Dis.** 2019 May 31;4(2):88.

MADA, P. K.; ZULFIQAR, H.; JOEL CHANDRANESAN, A. S. **Bartonellosis.** [Updated 2021 Mar 14]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan.

MAGALHÃES, R.F.; PITASSI, L.H.; SALVADEGO, M.; DE MORAES, A.M.; BARJAS-CASTRO, M.L.; VELHO, P.E. *Bartonella henselae* survives after the storage period of red blood cell units: is it transmissible by transfusion? **Transfus Med** 2008; 18:287-291

MAGGI, R.; DUNCAN, A.; BREITSCHWERDT, E.B. Novel chemically modified liquid medium that will support the growth of seven *bartonella* species. **J Clin Microbiol.** 2005 Jun;43(6):2651-5

MAGGI, R.G.; ERICSON, M.; MASCARELLI, P.E.; BRADLEY, J.M.; BREITSCHWERDT, E.B. *Bartonella henselae* bacteremia in a mother and son potentially associated with tick exposure. **Parasit Vectors.** 2013;6:101

MAGGI, R.G.; RAVERTY, S.A.; LESTER, S.J.; HUFF, D.G.; HAULENA, M.; FORD, S.L.; NIELSEN, O.; ROBINSON, J.H.; BREITSCHWERDT, E.B. *Bartonella henselae* in captive and hunter-harvested beluga (*Delphinapterus leucas*). **J Wildl Dis.** 2008. 44:871–877

MAI, B. H.; BARBIERI, R.; CHENAL, T.; CASTEX, D.; JONVEL, R.; TANASI, D.; GEORGES-ZIMMERMANN, P.; DUTOUR, O.; PERESSINOTTO, D.; DEMANGEOT, C.; DRANCOURT, M.; ABOUDHARAM, G. Five millennia of *Bartonella quintana* bacteraemia. **PLoS One**. 2020 Nov 4;15(11):e0239526. doi: 10.1371/journal.pone.0239526

MANSUETO, P.; PEPE, I.; CILLARI, E.; ARCOLEO, F.; MICALIZZI, A.; BONURA, F.; SEIDITA, A.; PALILLO, L.; DI GREGORIO, M.F.; AFFRONTI, M.; DI ROSA, S.; RINI, G.; VITALE, G. Prevalence of antibodies anti-*Bartonella henselae* in western Sicily: children, blood donors, and cats. **J Immunoassay Immunochem** 2012;33(1):18-25

MARGILETH, A.M.; BAEHREN, D.F. Chest-wall abscess due to cat-scratch disease (CSD) in an adult with antibodies to *Bartonella clarridgeiae*: case report and review of the thoracopulmonary manifestations of CSD. **Clin Infect Dis** 1998. 27:353–357

MAURIN, M.; RAOULT, D. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* infections. **Clin Microbiol Rev**. 1996 Jul;9(3):273-92. doi: 10.1128/CMR.9.3.273

MCCORMICK, D.W.; ROWAN, S.E.; PAPPERT, R.; YOCKEY, B.; DIETRICH, E.A.; PETERSEN, J.M.; HINCKLEY, A.F.; MARX, G.E. *Bartonella* Seroreactivity Among Persons Experiencing Homelessness During an Outbreak of *Bartonella quintana* in Denver, Colorado, 2020. **Open Forum Infect Dis**. 2021 May 8;8(6):ofab230

MINADAKIS, G.; ANGELAKIS, E.; CHOCHLAKIS, D.; TSELENTIS, Y.; PSAROULAKI, A. Cat-scratch disease in Crete: an update. **Infect Dis Rep**. 2011 Dec 5;3(2):e15. doi: 10.4081/idr.2011.e15

MINADAKIS, G.; CHOCHLAKIS, D.; KOKKINI, S.; GIKAS, A.; TSELENTIS, Y.; PSAROULAKI, A. Seroprevalence of *Bartonella henselae* antibodies in blood donors in Crete. **Scand J Infect Dis**. 2008;40(10):846-7

MINNICK, M. F.; ANDERSON, B. E.; LIMA, A.; BATTISTI, J. M.; LAWYER, P. G.; BIRTLES, R. J. Oroya fever and verruga peruana: bartonelloses unique to South America. **PLoS Negl Trop Dis**. 2014 Jul 17;8(7):e2919.

MILLER, J.; BREITSCHWERDT, E. B.; MAGGI, R. G. **Galaxy Diagnostics** 2019. Disponível em: <https://www.galaxydx.com/csd_to_bartonellosis/>. Acesso em: 21 Mar. 2021

MOSBACHER, M. E.; KLOTZ, S.; KLOTZ, J.; PINNAS, J. L. *Bartonella henselae* and the potential for arthropod vector-borne transmission. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011 May;11(5):471-7. doi: 10.1089/vbz.2010.0106

MOSEPELE, M.; MAZO, D.; COHN, J. *Bartonella* infection in immunocompromised hosts: immunology of vascular infection and vasoproliferation. **Clin Dev Immunol.** 2012;2012:612809.

MÜLLER, A.; REITER, M.; SCHÖTTA, AM.; STOCKINGER, H.; STANEK, G. Detection of *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* ticks and *Bartonella* seroprevalence in human populations. **Ticks Tick Borne Dis.** 2016;7:763–767

MULLINS, K. E.; HANG, J.; CLIFFORD, R.J.; ONMUS-LEONE, F.; YANG, Y.; JIANG, J.; LEGUIA, M.; KASPER, M. R.; MAGUINA, C.; LESHU, E. P.; JARMAN, R. G.; RICHARDS, A.; BLAZES, D. Whole-Genome Analysis of *Bartonella ancashensis*, a Novel Pathogen Causing Verruga Peruana, Rural Ancash Region, Peru. **Emerg Infect Dis.** 2017 Mar;23(3):430-438.

NEVES, S.M.; VIEIRA-DAMIANI, G.; ERICSON, M.E.; GUPTA, K.; GILIOLI, R.; DE ALMEIDA, A.R.; ROVANI, D.M.; GROSSELLI, L.B.; DE ALMEIDA, L.K.; BENETTI SOARES, T.C.; NEVES, F.; VELHO P.E. *Bartonella henselae* transmission by blood transfusion in mice. **Transfusion.** 2016. 56:1556–1559

NOGUCHI, H.; SHANNON, R. C.; TILDEN, E. B.; TYLER, J. R. Etiology of Oroya Fever: XIV. The Insect Vectors of Carrion's Disease. **The Journal of experimental medicine**, New York, 1926. v. 49, n. 6, p. 993-1008

NORMAN, A. F.; REGNERY, R.; JAMESON, P.; GREENE, C.; KRAUSE, D. C. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. **J Clin Microbiol.** 1995 Jul;33(7):1797-803.

NÚÑEZ, M.A.; CONTRERAS, K.; DEPIX, M.S.; GEOFFROY, E.; VILLAGRA, N.; MELLADO, S.; SALINAS, A.M. Prevalence of *Bartonella henselae* in blood donors and risk of blood transmission in Chile. **Rev Chil Infectol.** 2017 34:539–543.

OLIVEIRA, A.M.; MAGGI, R.G.; WOODS, C.W.; BREITSCHWERDT, E.B. Suspected needle stick transmission of *Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffii* to a veterinarian. **J Vet Intern Med.** 2010; 24:1229–1232

OTEO, J. A.; MAGGI, R.; PORTILLO, A.; BRADLEY, J.; GARCÍA-ÁLVAREZ, L.; SAN-MARTÍN, M.; ROURA, X.; BREITSCHWERDT, E. Prevalence of *Bartonella* spp. by culture, PCR and serology, in veterinary personnel from Spain. **Parasit Vectors.** 2017 Nov 7;10(1):553.

PANDAK, N.; DAKOVIĆ-RODE, O.; CABRAJA, I.; KRISTOF, Z.; KOTARAC, S. Prevalence of *Bartonella henselae* antibodies in children and blood donors in Croatia. **Infection.** 2009 Apr;37(2):166-7.

PENNISI, M. G.; PERSICHETTI, M. F.; SERRANO, L.; ALTET, L.; REALE, S.; GULOTTA, L.; SOLANO-GALLEGO, L. Ticks and associated pathogens collected from cats in Sicily and Calabria (Italy). **Parasit Vectors.** 2015;8:512

PICASCIA, A.; PAGLIUCA, C.; SOMMESE, L.; COLICCHIO, R.; CASAMASSIMI, A.; LABONIA, F.; PASTORE, G.; PAGLIARULO, C.; CICATIELLO, A. G.; CASTALDO, F.; SCHIANO, C.; MAIELLO, C.; MEZZA, E.; D'ARMIENTO, F. P.; SALVATORE, P.; NAPOLI, C. Seroprevalence of *Bartonella henselae* in patients awaiting heart transplant in Southern Italy. **J Microbiol Immunol Infect.** 2017 Apr;50(2):239-244

PISCHEL, L.; RADCLIFFE, C.; VILCHEZ, G.A.; CHARIFA, A.; ZHANG, X.C.; GRANT, M. Bartonellosis in transplant recipients: A retrospective single center experience. **World J Transplant.** 2021 Jun 18;11(6):244-253

PITASSI, L.H.; DE PAIVA; DINIZ, P.P.; SCORPIO, D.G.; DRUMMOND, M.R.; LANIA, B.G.; BARJAS-CASTRO, M.L.; GILIOLI, R.; COLOMBO, S.; SOWY, S.; BREITSCHWERDT, E.B.; NICHOLSON, W.L.; VELHO, P.E. *Bartonella* spp. bacteremia in blood donors from Campinas, Brazil. **PLoS Negl Trop Dis.** 2015;9(1):e0003467

PODSIADLY, E.; CHMIELEWSKI, T.; SOCHON, E.; TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA, S. *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks removed from dogs. **Vector Borne Zoonotic Dis.** 2007 Summer;7(2):189-92

PONS, M. J.; GOMES, C.; DEL VALLE-MENDOZA, J.; RUIZ, J. Carrion's Disease: More Than a Sand Fly-Vectored Illness. **PLoS Pathog.** 2016 Oct 13;12(10):e1005863.

PONS, I.; SANFELIU, I.; CARDENOSA, N.; NOGUERAS, M.M.; FONT, B.; SEGURA, F. Serological evidence of *Bartonella henselae* infection in healthy people in Catalonia, Spain. **Epidemiol Infect.** 2008; 136: 1712–1716

RAOULT, D. From Cat scratch disease to *Bartonella henselae* infection. **Clin Infect Dis.** 2007 Dec 15;45(12):1541-2.

RAOULT, D.; DUTOUR, O.; HOUHAMDI, L.; JANKAUSKAS, R.; FOURNIER, P.E.; ARDAGNA, Y.; DRANCOURT, M.; SIGNOLI, M.; LA, V. D.; MACIA, Y.; ABOUDHARAM, G. Evidence for louse-transmitted diseases in soldiers of Napoleon's Grand Army in Vilnius. **J Infect Dis.** 2006 Jan 1;193(1):112-20.

RAOULT, D.; WOODWARD, T.; DUMLER, J.S. The history of epidemic *typhus*. **Infect Dis Clin North Am.** 2004;18:127-140

RAHIMIAN, J.; RAOULT, D.; TANG, Y.W.; HANNA, B.A. *Bartonella quintana* endocarditis with positive serology for *Coxiella burnetii*. **J Infect** 2006;53(3):e151-3.

RENESTO, P.; GOVERNET, J.; DRANCOURT, M.; ROUX, V.; RAOULT, D. Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. **J Clin Microbiol.** 2001 Feb;39(2):430-7.

ROBINSON, M.T.; HILLMAN, T.; LANGTON, D.A.; SHAW, S.E. *Bartonella clarridgeiae* in a cat in the UK. **Vet Rec.** 2009. 164:58 –59

SANDER A, ZAGROSEK A, BREDT W, SCHILTZ E, PIEMONT Y, LANZ C, DEHIO C. Characterization of *Bartonella clarridgeiae* flagellin (FlaA) and detection of anti-flagellin antibodies in patients with lymphadenopathy. 2000 **J Clin Microbiol** 38:2943–2948

SANOGO, Y. O.; ZEAITER, Z.; CARUSO, G.; MEROLA, F.; SHPYNOV, S.; BROUQUI, P.; RAOULT, D. *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks (*Acari: Ixodida*) removed from humans, Belluno province, Italy. **Emerg Infect Dis.** 2003 Mar;9(3):329-32.

SILVA, M. N.; VIEIRA-DAMIANI, G.; ERICSON, M. E.; GUPTA, K.; GILIOLI, R.; DE ALMEIDA, A. R.; DRUMMOND, M. R.; LANIA, B. G.; DE ALMEIDA LINS, K.; SOARES, T. C.; VELHO, P. E. *Bartonella henselae* transmission by blood transfusion in mice. **Transfusion**. 2016 Jun;56(6 Pt 2):1556-9.

SOUZA, A. M.; ALMEIDA, D. N. P.; GUTERRES, A.; GOMES, R.; FAVACHO, A. R. M.; MOREIRA, N. S.; MAIA, L. M. P.; ROZENTAL, T.; TORRES FILHO, R. A.; CERQUEIRA, A. M. F.; LEMOS, E. R. F.; ALMOSNY, N. R. P. Bartonelose: análise molecular e sorológica em gatos do Rio de Janeiro - Brasil. 2010- **Rev Bras Cie Vet** - 17: 7-11

STAGGEMEIER, R.; VENKER, C. A.; KLEIN, D. H.; PETRY, M.; SPILKI, F. R.; CANTARELLI, V. V. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats in the south of Brazil: a molecular study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2010 Nov;105(7):873-8.

SYKES, J.E.; WESTROPP, J.L.; KASTEN, R.W.; CHOMEL, B.B. Association between *Bartonella* species infection and disease in pet cats as determined using serology and culture. **J Feline Med Surg**. 2010. 12:631– 636

TRAN, T.N.; LE FORESTIER, C.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D.; ABOUDHARAM, G. Brief communication: co-detection of *Bartonella quintana* and *Yersinia pestis* in an 11th-15th burial site in Bondy, France. **Am J Phys Anthropol**. 2011 Jul;145(3):489-94.

TRATARIS, A.N.; ROSSOUW, J.; ARNTZEN, L.; KARSTAEDT, A.; FREAN, J. *Bartonella* spp. in human and animal populations in Gauteng, South Africa, from 2007 to 2009. Onderstepoort **J Vet Res**. 2012 Jun 20;79(2):452

VAYSSIER-TAUSSAT, M.; LE RHUN, D.; BONNET, S.; COTTÉ, V. Insights in *Bartonella* host specificity. **Ann NY Acad Sci**. 2009 May; 1166:127-32.

VELHO, P.E. Blood transfusion as an alternative bartonellosis transmission in a pediatric liver transplant. **Transplant Infectious Disease**. 2009 Oct;11(5):474

VELHO, P. E.; CINTRA, M. L.; UTHIDA-TANAKA, A. M.; DE MORAES, A. M.; MARIOTTO, A. What do we (not) know about the human bartonellosis? **Braz J Infect Dis**. 2003 Feb;7(1):1-6.

VERMEULEN MJ, VERBAKEL H, NOTERMANS DW, REIMERINK JH, PEETERS MF. Evaluation of sensitivity, specificity and cross-reactivity in *Bartonella henselae* serology. **J Med Microbiol.** 2010; 59: 743-5.

VIEIRA, C. B.; PRAÇA, Y. R.; BENTES, K. L. D. S.; SANTIAGO, P. B.; SILVA, S. M. M.; SILVA, G. D. S.; MOTTA, F. N.; BASTOS, I. M. D.; DE SANTANA, J. M.; DE ARAÚJO, C. N. Triatomíneos: Tripanossomatídeos, bactérias e vetores potenciais de vírus? **Front Cell Infect Microbiol.** 2018; 8: 405

WARDROP, K. J.; BIRKENHEUER, A.; BLAIS, M. C.; CALLAN, M. B.; KOHN, B.; LAPPIN, M. R.; SYKES, J. Update on Canine and Feline Blood Donor Screening for Blood-Borne Pathogens. **J Vet Intern Med.** 2016 Jan-Feb;30(1):15-35.

WILLIAMS, H. M.; & DITTMAR, K. Expanding our view of *Bartonella* and its hosts: *Bartonella* in nest ectoparasites and their migratory avian hosts. **Parasites & vectors**, 2020. 13(1): 13.

YILMAZ, C.; ERGIN, C.; KALELI, I. Pamukkale Üniversitesi Kan Merkezine başvuran donörlerde *Bartonella henselae* seroprevalansinin araştırılması ve risk faktörlerinin irdelenmesi [Investigation of *Bartonella henselae* seroprevalence and related risk factors in blood donors admitted to Pamukkale University Blood Center]. **Mikrobiyol Bul.** 2009 Jul;43(3):391-401. Turkish.

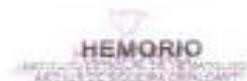
ZORRILLA, V. O.; LOZANO, M. E.; ESPADA, L. J.; KOSOY, M.; MCKEE, C.; VALDIVIA, H. O.; AREVALO, H.; TROYES, M.; STOOPS, C. A.; FISHER, M. L.; VÁSQUEZ, G. M. Comparison of sand fly trapping approaches for vector surveillance of *Leishmania* and *Bartonella* species in ecologically distinct, endemic regions of Peru. **PLoS Negl Trop Dis.** 2021 Jul 14;15(7):e0009517

9 ANEXOS

ANEXO I - Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa do HEMORIO



GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP HEMORIO

Rio de Janeiro, 10 de março de 2017.

ASSUNTO: Parecer consubstanciado de projeto de pesquisa avaliado pelo CEP HEMORIO

Prezada Pesquisadora,

O projeto, "*Bartonella spp. Em doadores de sangue no Estado do Rio de Janeiro: um risco potencial de transmissão por transfusão sanguínea*", registrado no CEP HEMORIO sob o número 409/16, foi apresentado de acordo com a Resolução 466/12. Assim, após apresentação e análise dos documentos recebidos, o Comitê de Ética em Pesquisa HEMORIO considera o projeto **APROVADO**.

Ressaltamos abaixo, algumas orientações fundamentais, as quais o pesquisador deve estar muito atento:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado;
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeira ação imediata;
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificações ao CEP e à ANVISA, junto com seu posicionamento;
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente até 11/09/2017 e ao término do estudo.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Rua Frei Caneca, 8 – Centro – Rio de Janeiro – CEP 20011-030

Tel: (21) 2088-4442 R. 2016 – Fax: 3343-4152 – www.hemorio.rj.gov.br – cep@hemorio.gov.br



GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE



Sendo assim, por favor, contate a Coordenação do CEP HEMORIO (Sra. Marcia Villa Nova, Thaís Oliveira ou Joseleine Sousa) pelo telefone 2332-8612, ramal 2415, a fim de estabelecermos o fluxo de sua pesquisa e tomarmos outras providências pertinentes.

Atenciosamente,

Marcia Villa Nova
Coordenadora do CEP HEMORIO

ANEXO II – Questionário aplicado (Ficha do Sinan Rickettsioses)

República Federativa do Brasil Ministério da Saúde		SINAN SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO FICHA DE INVESTIGAÇÃO FEBRE MACULOSA		Nº
<p>CASO SUSPEITO: Indivíduo que apresente febre, cefaléia, mialgia e história de picada de carrapatos e/ou contato com animais domésticos e/ou silvestres e/ou tenha frequentado área sabidamente de transmissão de febre maculosa nos últimos 15 dias e/ou apresente exantema máculo-papular ou manifestações hemorrágicas.</p>				
Dados Gerais	1 Tipo de Notificação	2 - Individual		
	2 Agravado(a)	Febre Maculosa / Rickettsioses		Código (CID10) 3 Data da Notificação A 77.9
	4 UF	5 Município de Notificação	Código (BGE)	
Notificação Individual	6 Unidade de Saúde (ou outra fonte notificador)	Código	7 Data dos Primeiros Sintomas	
	8 Nome do Paciente	9 Data de Nascimento		
	10 (ou) Idade	11 Sexo M - Masculino F - Feminino I - Ignorado	12 Ocorrência 1- 1ª vez 2- 2ª vez 3- 3ª vez 4- 4ª vez 5- 5ª vez 6- 6ª vez 7- 7ª vez 8- 8ª vez 9- 9ª vez 10- 10ª vez 11- 11ª vez 12- 12ª vez 13- 13ª vez 14- 14ª vez 15- 15ª vez 16- 16ª vez 17- 17ª vez 18- 18ª vez 19- 19ª vez 20- 20ª vez 21- 21ª vez 22- 22ª vez 23- 23ª vez 24- 24ª vez 25- 25ª vez 26- 26ª vez 27- 27ª vez 28- 28ª vez 29- 29ª vez 30- 30ª vez 31- 31ª vez 32- 32ª vez 33- 33ª vez 34- 34ª vez 35- 35ª vez 36- 36ª vez 37- 37ª vez 38- 38ª vez 39- 39ª vez 40- 40ª vez 41- 41ª vez 42- 42ª vez 43- 43ª vez 44- 44ª vez 45- 45ª vez 46- 46ª vez 47- 47ª vez 48- 48ª vez 49- 49ª vez 50- 50ª vez 51- 51ª vez 52- 52ª vez 53- 53ª vez 54- 54ª vez 55- 55ª vez 56- 56ª vez 57- 57ª vez 58- 58ª vez 59- 59ª vez 60- 60ª vez 61- 61ª vez 62- 62ª vez 63- 63ª vez 64- 64ª vez 65- 65ª vez 66- 66ª vez 67- 67ª vez 68- 68ª vez 69- 69ª vez 70- 70ª vez 71- 71ª vez 72- 72ª vez 73- 73ª vez 74- 74ª vez 75- 75ª vez 76- 76ª vez 77- 77ª vez 78- 78ª vez 79- 79ª vez 80- 80ª vez 81- 81ª vez 82- 82ª vez 83- 83ª vez 84- 84ª vez 85- 85ª vez 86- 86ª vez 87- 87ª vez 88- 88ª vez 89- 89ª vez 90- 90ª vez 91- 91ª vez 92- 92ª vez 93- 93ª vez 94- 94ª vez 95- 95ª vez 96- 96ª vez 97- 97ª vez 98- 98ª vez 99- 99ª vez 100- 100ª vez	13 Raça/Cor 1- Branca 2- Preta 3- Amarela 4- Parda 5- Indígena 9- Ignorado
14 Escolaridade	15 Número do Cartão SUS			
Dados de Localização	16 Nome da mãe	17 UF		
	18 Município de Residência	Código (BGE)	19 Distrito	
	20 Bairro	21 Logradouro (rua, avenida, ...)		Código
Dados Complementares do Caso	22 Número	23 Complemento (apto., casa, ...)		24 Geo campo 1
	25 Geo campo 2	26 Ponto de Referência		27 CEP
	28 (DDD) Telefone	29 Zona 1 - Urbana 2 - Rural 3 - Periurbana 9 - Ignorado	30 País (se residente fora do Brasil)	
Dados Clínicos	31 Data de Investigação	32 Ocupação		
	33 Sinais e Sintomas	1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado		
	<input type="checkbox"/> Febre	<input type="checkbox"/> Cefaléia	<input type="checkbox"/> Dor Abdominal	<input type="checkbox"/> Mialgia
<input type="checkbox"/> Náusea/Vômito	<input type="checkbox"/> Exantema	<input type="checkbox"/> Diarreia	<input type="checkbox"/> Ictericidade	
<input type="checkbox"/> Hiperemia Conjuntival	<input type="checkbox"/> Hepatomegalia/Esplenomegalia	<input type="checkbox"/> Petéquias	<input type="checkbox"/> Manifestações hemorrágicas	
<input type="checkbox"/> Linfadenopatia	<input type="checkbox"/> Convulsão	<input type="checkbox"/> Necrose de extremidades	<input type="checkbox"/> Prostração	
<input type="checkbox"/> Choque/Hipotensão	<input type="checkbox"/> Estupor/Coma	<input type="checkbox"/> Sução hemorrágica	<input type="checkbox"/> Alterações Respiratórias	
<input type="checkbox"/> Oligúria/Anúria	<input type="checkbox"/> Outros: _____			
Epidemiologia	Situação/exposição de risco nas últimas duas semanas (14 dias)			
	34 Teve contato com animais?	1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado		
Tratamento	<input type="checkbox"/> Carrapato	<input type="checkbox"/> Capivara	<input type="checkbox"/> Cão/Gato	<input type="checkbox"/> Bovinos
	<input type="checkbox"/> Equinos	<input type="checkbox"/> Outros animais: _____		
35 Frequentou ambientes com mata, floresta, rios, cachoeiras, etc.	1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado			
36 Ocorreu Hospitalização	1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado			
37 Data de Internação	38 Data de Alta	39 UF		
40 Município do Hospital	Código (BGE)	41 Nome do Hospital		
42 Código	43 Código			

Febre Maculosa Sinan NET SVS 19/09/2006

