



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MARINA ROVANI DRUMMOND

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE *Bartonella*
spp. EM DOADORES DE SANGUE DO HEMOCENTRO DE CAMPINAS/SP

CAMPINAS

2018

MARINA ROVANI DRUMMOND

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE *Bartonella*
spp. EM DOADORES DE SANGUE DO HEMOCENTRO DE CAMPINAS/SP

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de doutora em Ciências, na área de concentração Clínica Médica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho

COORIENTADOR: Prof. Dr. Pedro Paulo Vissotto de Paiva Diniz

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Marina Rovani Drummond e orientada pelo Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 159717/2013-2; FAPESP, 2013/14211-3

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6849-608X>

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

D844c Drummond, Marina Rovani, 1985-
Comparação de métodos moleculares para detecção de *Bartonella* spp. em doadores de sangue do Hemocentro de Campinas/SP / Marina Rovani Drummond. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho.
Coorientador: Pedro Paulo Vissotto de Paiva Diniz.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Bartonella. 2. Doadores de sangue. 3. Reação em cadeia da polimerase. 4. Diagnóstico. I. Velho, Paulo Eduardo Neves Ferreira, 1966-. II. Diniz, Pedro Paulo Vissotto de Paiva. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Comparison of molecular methods for detection of *Bartonella* spp. in blood donors at the Blood Bank of Campinas/SP

Palavras-chave em inglês:

Bartonella

Blood donors

Polymerase chain reaction

Diagnosis

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho [Orientador]

Lucieni de Oliveira Conterno

Marcos Rogério André

Maria Luiza Moretti

Marcelo Brocchi

Data de defesa: 17-01-2018

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MARINA ROVANI DRUMMOND

ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO

COORIENTADOR: PROF. DR. PEDRO PAULO VISSOTTO DE PAIVA DINIZ

MEMBROS:

1. PROF. DR. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO

2. PROFA. DRA. LUCIENI DE OLIVEIRA CONTERNO

3. PROF. DR. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

4. PROFA. DRA. MARIA LUIZA MORETTI

5. PROF. DR. MARCELO BROCCHI

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

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: DATA DA DEFESA 17/01/2018

Ao meu filho Mateus,
por me lembrar como a vida pode ser tão divertida.

Herança do Senhor e meu melhor experimento!

Agradecimentos

A Deus, por presentear-me com a oportunidade de continuar a pesquisar, por capacitar e por renovar as minhas forças apesar de todas as dificuldades.

Ao meu querido marido Elias, por me apoiar na decisão de voltar para a pesquisa e por tentar entender mais desse universo maluco que é estudar bartonela!

Ao meu filho Mateus, melhor projeto até agora, por me amar incondicionalmente e me chamar para brincar toda vez que me vê estudando ou tentando escrever. Brincar com você é a melhor parte do meu dia!

Aos meus amados pais, por terem me amado e educado, pelo incentivo e apoio em todas as decisões. Amo ainda mais vocês depois de ter me tornado mãe!

Ao meu orientador, ou mais que isso, o avô “torto” do Mateus, Prof. Paulo Eduardo. Depois de mais de 10 anos trabalhando juntos, posso dizer que me tornei um pouco sua filha. É um prazer dividir a pesquisa, as descobertas científicas e burocráticas e as experiências da vida com você. O apoio que você me deu para superar tudo o que eu passei durante o período do doutorado fez com que eu o admirasse ainda mais. Que venham mais 10 anos!

Ao Prof. Dr. Pedro Paulo Vissoto de Paiva Diniz, por ter me coorientado e auxiliado nas padronizações das PCR e na análise estatística tão complexa. Obrigada pela disponibilidade e parceria de anos!

À Luciene, por ter me auxiliado não apenas com a infinidade de experimentos realizados nesta tese, mas por ter se tornado uma amiga para toda a vida. Por me animar sempre, me incentivar, ser minha companheira de lanchinhos, extrações, PCR e géis, e por me ensinar tanto. Sei que você não acredita Nele, mas não tenho dúvidas que você é um presente de Deus para minha vida.

A toda equipe do laboratório de bartoneloses: Amanda, Karina, Bruno, Marilene, Gislaine, Tânia, Ellen, Rodrigo, Beatriz, Gabriel, Ana, Diego e Pâmela. Obrigada por todo apoio e ajuda durante a realização dos experimentos e da escrita deste doutorado.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos, por ter nos recebido em seu laboratório e ter disponibilizado o uso do equipamento para PCR em tempo real.

À equipe CEMIB por sempre nos receber de portas abertas.

À minha amiga Carolina, por me incentivar e trocar experiências da vida de pesquisa e que junto com o Thiago me presenteou com a Anna, melhor amiga do Mateus.

À minha amiga Annelize, que além de viabilizar o uso do equipamento para PCR em tempo real, sempre que possível ajudava a agilizar as reações. Sua amizade há mais de 14 anos é muito preciosa para mim. Obrigada por fazer parte da minha vida junto com o Lucas e a Belinha!

Aos meus dois irmãos, cunhadase sobrinhas. Obrigada por me incentivarem e acharem o máximo ter uma cientista na família (muito embora não saibam direito o que eu faço).

Ao CNPq por ter me concedido bolsa de doutorado o que possibilitou a dedicação exclusiva.

À Fapesp, pelo auxílio pesquisa (2013/14211-3) e à Faepex que viabilizaram a execução do projeto.

RESUMO

O gênero *Bartonella* é constituído por patógenos reemergentes e negligenciados, associados a um amplo espectro de doenças humanas potencialmente fatais. Não existe um teste padrão-ouro para o diagnóstico destes agentes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a prevalência de *Bartonella* spp. em 500 doadores de sangue do Hemocentro de Campinas/SP. Foram utilizados métodos moleculares (PCR convencional, PCR *nested* e PCR em tempo real) para o diagnóstico da infecção assintomática por *Bartonella* spp.. Foi extraído DNA de amostras de sangue e das culturas líquidas que foram analisadas por: (A) PCR convencional para duas regiões gênicas, (A1) a *ITS* que tem como alvo o gênero *Bartonella* e (A2) a *gltA* específica para *Bartonella henselae*; (B) PCR de dupla amplificação (*nested*) para a região *ftsZ* e (C) PCR em tempo real para a região *gltA*, ambas espécie-específicas para *B. henselae*. Considerando as quatro reações realizadas obtiveram-se 30/500 (6%) positivos do DNA extraído do sangue; 77/500 (15,4%) positivos do DNA extraído de cultura líquida sendo que cinco amostras foram positivas para ambas as amostras. No total, 102/500 (20,4%) doadores foram positivos. A análise estatística revelou que para este grupo: (1) a PCR convencional para a região *gltA* é a menos sensível; (2) a PCR em tempo real (*gltA*) é o melhor teste para cultura líquida; (3) para amostras de sangue não há diferença na sensibilidade entre a PCR *nested* e a PCR em tempo real (*gltA*). As amostras utilizadas neste estudo já haviam sido submetidas à pesquisa para este mesmo agente utilizando apenas PCR convencional na cultura líquida. Dezesesseis (3,2%) amostras foram positivas anteriormente, e, destas, 13 foram negativas na nova investigação. Conclui-se que o uso de cultura líquida combinado a diferentes testes moleculares aumentam a possibilidade de detectar a infecção assintomática por estas bactérias, mas não evitam resultados falso-negativos. Considerando-se também os resultados obtidos anteriormente, o DNA de *Bartonella* spp. foi identificado ou o agente isolado em 23% dos doadores analisados. Constatou-se alta prevalência de *Bartonella* spp. no sangue de doadores. Os resultados apresentados estabelecem a necessidade de uma reavaliação pelas autoridades de saúde pública dos riscos e do impacto da transmissão de *Bartonella* spp. por meio de transfusões sanguíneas, especialmente para os pacientes imunodeficientes. Como também demonstrado, a baixa bacteremia e a característica fastidiosa da

bactéria são desafios ao diagnóstico laboratorial e podem dificultar a confirmação da infecção em pacientes com bartoneloses.

Palavras-chave: Bartonella; Doadores de Sangue; Reação em Cadeia da Polimerase; Diagnóstico.

ABSTRACT

The *Bartonella* genus consists of reemerging and neglected pathogens, associated with a broad spectrum of potentially fatal human diseases. There is no gold standard for the diagnosis of these agents. The aim of this work was to evaluate *Bartonella* spp. prevalence in 500 blood donors from Campinas/ Sao Paulo. We used molecular methods (conventional PCR, nested PCR and real time PCR) in the diagnosis of *Bartonella* sp. asymptomatic infection. DNA was extracted from blood samples and from liquid cultures. These samples were analyzed by: (A) conventional PCR for two gene regions, (A₁) the *ITS* targeting the genus *Bartonella* and (A₂) the specific *gltA* *Bartonella henselae*; (B) nested PCR for the *ftsZ* region and (C) real-time PCR for the *gltA* region, both species-specific for *B. henselae*. Considering the four reactions performed, we got 30/500 (6%) positives from DNA extracted from the blood; 77/500 (15.4%) positives from DNA extracted from liquid culture and five samples were positive for both samples. In total, 102/500 (20.4%) donors were positive. Statistical analysis revealed that: (1) conventional PCR for the *gltA* region is the less sensitive; (2) real-time PCR (*gltA*) is the best test for liquid culture; (3) for blood samples there is no difference in sensitivity between nested PCR and real-time PCR (*gltA*). The samples used in this study had already been submitted for *Bartonella* spp. diagnosis using only conventional PCR in the liquid culture. Sixteen samples (3.2%) were positives previously and, from these samples, 13 were negative in the new investigation. We concluded that the use of liquid culture combined with different molecular tests increases the possibility of detecting asymptomatic infection by these bacteria, but the tests do not avoid false-negative results. Considering also the results obtained previously, the DNA of *Bartonella* spp. was identified or the agent isolated in 23% of analyzed blood donors. This study revealed a high prevalence of *Bartonella* spp. in the blood of donors. The presented results establish the need for an evaluation by the public health authorities of the risks and impact of the transmission of *Bartonella* spp. by blood transfusions, especially for immunodeficient patients. As demonstrated by these results, the low bacteremia and the fastidious characteristic of the bacterium are challenges to the laboratory diagnosis and can make difficult the confirmation of the infection in patients with bartonellosis.

Keywords: Bartonella; Blood Donors; Polymerase Chain Reaction; Diagnosis.

SUMÁRIO

Sumário

1. Introdução.....	13
1.1. Transmissão.....	17
1.2. Métodos diagnósticos laboratoriais	19
1.2.1. Métodos diagnósticos imunológicos	19
1.2.2. Cultura microbiológica	20
1.2.3. Microscopia.....	21
1.2.4. PCR.....	21
1.3. Epidemiologia.....	22
1.4. Diagnóstico desafiador	26
1.5. Projeto anterior com doadores de sangue	28
2. Objetivos.....	30
2.1. Geral.....	30
2.2. Específicos.....	30
3. Metodologia	31
3.1. Extração do DNA a partir do sangue total.....	32
3.2. Extração do DNA a partir da cultura líquida	32
3.3. Amplificação do DNA	33
3.3.1. PCR controle.....	34
3.3.2. PCR convencional	34
3.3.3. PCR de dupla-amplificação (<i>nested</i>) para <i>B. henselae</i>	37
3.3.4. PCR em tempo real para <i>B. henselae</i>	38
3.4. Sequenciamento	38
3.5. Análise estatística	38
4. Resultados.....	40
4.1. Amplificação do DNA	40
4.2. Sequenciamento	43
4.3. Análise estatística	45
4.4. Comparação com os resultados do projeto anterior	53
5. Discussão.....	54
6. Conclusões	58
7. Referências	60

8. Apêndice.....	66
Padronização das reações utilizadas no projeto	66
9. Anexos.....	77
Anexo 1 – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp	77
Anexo 2 – Certificado - Premiação 9ª Semana de Pesquisa da FCM (2016)	81
Anexo 3 – Certificado 100 melhores trabalhos – 72º Congresso Brasileiro de Dermatologia (2017).....	82
Anexo 4 – Certificado Prêmio 2º lugar categoria dissertação/tese – 72º Congresso Brasileiro de Dermatologia (2017)	83
Anexo 5 – Certificado Apresentação e-pôster – XX Congresso Brasileiro de Infectologia (2017).....	84

1. Introdução

O gênero *Bartonella* é composto de pequenas bactérias cocobacilares, gram-negativas, intracelulares facultativas, pertencentes ao subgrupo alpha-2 da classe Proteobacteria (1). Entre suas características mais marcantes estão o crescimento fastidioso, com necessidade de meios enriquecidos com sangue e de atmosfera com 5% de gás carbônico (2-5). Também são conhecidas por infectarem eritrócitos, células endoteliais, células dendríticas e macrófagos, geralmente causando bacteremia crônica e cíclica em seus hospedeiros (4, 6-8). As bactérias deste gênero têm sido relacionadas a doenças descritas há centenas de anos, visto que relíquias do império Inca retratam características da verruga peruana, uma das bartoneloses clássicas (9, 10).

Atualmente o gênero *Bartonella* compreende pelo menos 45 espécies e subespécies descritas, sendo que pelo menos 16 delas são patogênicas ao homem. Destas, três espécies de *Bartonella* estão associadas ao maior número de manifestações clínicas em seres humanos. São elas: *Bartonella bacilliformis*, *Bartonella quintana* e *Bartonella henselae* (11).

A primeira espécie de *Bartonella* descrita foi a *B. bacilliformis* identificada pelo microbiologista argentino Alberto Barton que estudava uma doença endêmica no Peru, transmitida por um flebotomíneo (*Lutzomyia verrucarum*). A doença, endêmica na Região dos Andes, é bifásica: a fase aguda (febre de Oroya) a qual é caracterizada por uma bacteremia intraeritrocitária que resulta em uma anemia hemolítica fatal em 8% dos casos atualmente, mas que chegava a 90% dos casos na era pré-antibiótico, e a fase crônica (verruga peruana) que consiste em tumores vasculares que se originam de células endoteliais colonizadas. Também é conhecida por doença de Carrión, em homenagem ao médico peruano Daniel Carrión, que em 1885 inoculou em si mesmo material proveniente de uma lesão cutânea de verruga peruana e faleceu durante a fase aguda da infecção. Atingiu seu objetivo de comprovar que as duas fases eram causadas pelo mesmo agente (12, 13). A *B. bacilliformis* tem como hospedeiro reservatório os humanos (13).

Os humanos também são considerados o reservatório primário de *B. quintana*, a qual é transmitida pelo piolho de corpo humano (*Pediculus humanus corporis*). Esta espécie foi identificada como o agente da febre quintana, também conhecida como febre das trincheiras, pelo microbiologista brasileiro Enrique da Rocha Lima quando investigava o tifo para o governo alemão durante a Primeira Guerra Mundial (14). O agente causou grandes epidemias infectando mais de um milhão de soldados durante a Primeira Guerra Mundial (15). Reemergiu no final do século passado, descrita principalmente em pacientes sem-teto e alcoólicos crônicos. Esta doença é caracterizada pelo aparecimento de uma febre súbita acompanhada por uma bacteremia intraeritrocitária tipicamente de cinco dias de duração e recorrência (3-5 por ano) após períodos assintomáticos (16). Esta espécie também pode causar angiomatose bacilar, lesões em que as bactérias são encontradas em estreita associação com a proliferação de células endoteliais e pode ser acompanhada por doença visceral disseminada, tanto em imunodeficientes como em imunocompetentes (17, 18), e bacteremia crônica. Na pele, as lesões são indistinguíveis da verruga peruana. Adicionalmente trata-se da espécie mais comumente associada à endocardite cultura negativa, que caracteriza-se pela inflamação do endocárdio sem etiologia definida e em que não há identificação do agente mesmo após a inoculação de pelo menos três amostras de sangue independentes em hemocultura de rotina com incubação de cinco dias além de subcultura (5, 14, 19, 20).

A *B. henselae* foi assim denominada em homenagem à microbiologista Diane Hensel que contribuiu para o seu isolamento inicial (21). Os gatos são o reservatório primário, sendo considerados os principais responsáveis pela transmissão aos humanos (22). Entre os gatos, este microorganismo é transmitido por pulgas (*Ctenocephalides felis*) e a transmissão não ocorre sem os ectoparasitas, mesmo que se arranhem. Os cães também são relacionados como reservatórios (16). A *B. henselae* é a espécie mais frequentemente associada a doenças humanas (16, 18, 23). É o agente causador da doença da arranhadura do gato (DAG), cuja transmissão é associada a arranhaduras de gatos infectados possivelmente possibilitando contato dérmico com fezes infectadas das pulgas (24). Geralmente após três

semanas de infecção há o aparecimento de linfonodomegalia unilateral no linfonodo mais próximo da região da lesão. É causa comum de linfonodomegalia em crianças as quais também podem apresentar dor de cabeça, febre ou esplenomegalia. Frequentemente a DAG é autolimitada e o tratamento com antibióticos é questionável uma vez que estudos demonstraram não haver mudança na evolução da doença com seu uso (1). Em alguns casos, pode ocorrer manifestações oculares, como a síndrome de Parinaud e a neurorretinite, encefalopatias ou osteomielites (25). A *B. henselae* também pode provocar outras manifestações sendo as mais descritas: angiomatose bacilar; endocardite cultura negativa; peliose bacilar, que é caracterizada por lesões angioproliferativas associadas a dilatações capilares e formação de espaços cavernosos cheios de sangue afetando o fígado, o baço ou a medula óssea (18, 26, 27), e febre de origem indeterminada (FOI), que caracteriza-se por febre recorrente de pelo menos 38,3°C persistente por mais de três semanas (28, 29) .

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

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

Além destas três espécies patogênicas ao homem, outras 13 têm sido relacionadas a doenças em humanos. No quadro 1, adaptado e atualizado de Kaiser *et al.* (16) e Chomel & Kasten (30), é possível obter um panorama geral dos seus reservatórios, vetores e manifestações descritas em humanos (5, 7, 31-33).

Diversas outras manifestações já foram relacionadas à infecção por *Bartonella* spp., tais como: indisposição, fadiga, insônia, perda da memória, esplenomegalia, hepatite, meningites, etc.. A infecção em alguns casos pode até mesmo ser fatal (13, 18, 24, 34-36).

A diversidade das manifestações clínicas pode estar relacionada a diversos fatores, entre eles: a variedade de espécies e cepas, o que levaria a diferenças na sua patogenicidade e ao desenvolvimento de quadros clínicos mais ou menos graves (37, 38); diferenças na resposta imune do hospedeiro e outros fenômenos como coinfeção, imunossupressão, doenças não infecciosas concomitantes e desnutrição (7).

Várias cepas regionais já foram descritas. No Brasil, Diniz *et al.* depositaram, sob o número de acesso DQ346666, a cepa *B. henselae* Brazil-1, sequenciada a partir de amostra de sangue de cão da região de Botucatu e que diferia das cepas até então presentes no GenBank® (39). Sequência 100% homóloga foi encontrada em paciente de Minas Gerais atendido no Hospital das Clínicas da Unicamp (40) e em doadores de sangue (41). Estes dados sugerem haver, pelo menos, uma cepa brasileira da *B. henselae*, ainda que a mesma já tenha sido descrita fora do país (42).

Apesar de ser uma doença negligenciada mesmo dentre as doenças negligenciadas, uma vez que as bartoneloses não constam na lista da Organização Mundial da Saúde (43), as publicações sobre o tema vêm crescendo ao longo dos anos (Figura 1). O levantamento foi realizado utilizando a base Scopus com todas as publicações desde a reclassificação do gênero de *Rochalimae* para *Bartonella* (1993) até novembro de 2017 e que tivesse “Bartonella” no título, no resumo ou nas palavras-chave.

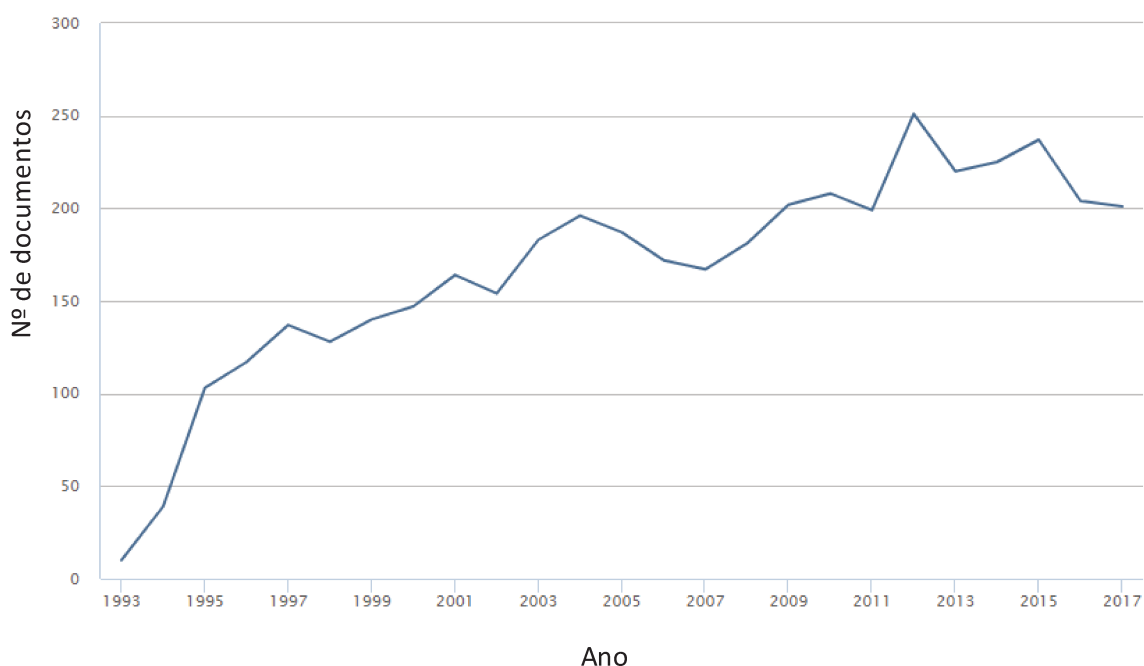


Figura 1. Gráfico feito pela base de dados Scopus do número de publicações com “*Bartonella*” desde o ano de reclassificação do gênero *Bartonella* (1993) até novembro de 2017.

1.1. Transmissão

Muitos artrópodes como o piolho de corpo humano, as pulgas de gato, mosquitos e carrapatos já foram confirmados como vetores competentes na transmissão de diversas espécies de *Bartonella*. Essa grande diversidade de vetores sugere uma adaptação seletiva de espécies de *Bartonella* com os hospedeiros mamíferos e os vetores (6, 44, 45).

A estratégia dos agentes do gênero *Bartonella* de causar bacteremia intraeritrocitária prolongada em vários hospedeiros é provavelmente uma adaptação específica a transmissão por artrópodes hematófagos (27, 46). Contudo, é conhecido que a *B. bacilliformis* pode causar uma hemólise massiva dos eritrócitos colonizados causando uma anemia hemolítica potencialmente fatal (4). Intensa anemia também já foi descrita em pacientes com infecção por *B. henselae* (40, 47).

Alguns autores acreditam que o principal modo de transmissão de *B. henselae* para humanos seria por meio de trauma cutâneo causado principalmente pelo arranhão de gato (22, 36). Porém, o trauma não é suficiente na transmissão entre gatos, sem a presença de pulgas (48). Já foram

relatados casos de transmissão por acidente percutâneo em veterinários (49, 50).

Outras formas de transmissão têm sido relacionadas às infecções por *Bartonella* sp. como o transplante de órgãos sólidos (rim e fígado), e transmissão vertical (24, 51-54).

A transmissão por transfusão sanguínea parece ser possível. Em relato de caso de Pons *et al.* é descrita a transmissão de *B. bacilliformis* após transfusão de plaquetas de doador de sangue assintomático (55). Estudo realizado na Unicamp demonstrou que *B. henselae* permaneceu viável por 35 dias em bolsas de sangue infectadas experimentalmente e estocadas a 4°C (56). Este estudo foi utilizado para incluir a bactéria como patógeno possível de ser transmitido por transfusão sanguínea pela *American Association of Blood Banks* (AABB). Outro trabalho realizado por Ruiz *et al.* demonstrou que a *B. bacilliformis* permaneceu viável nas amostras coletadas de pacientes com sintomas de doença de Carrión após 30 meses de estocagem a 4°C (57). O grupo de pesquisa da Unicamp realizou um experimento em que foram infectados camundongos via intraperitoneal com 30 µL de uma suspensão a 10⁴ unidades formadoras de colônia (UFC) de *B. henselae*. Após três dias, os animais foram eutanaziados e quatro outros animais foram transfundidos com sangue dos animais infectados. Metade dos animais que receberam transfusão de sangue de animais inoculados intraperitonealmente com *B. henselae* apresentaram PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) positiva no baço, embora os testes moleculares de sangue tivessem sido negativos para *B. henselae* em todos os animais transfundidos (58).

Existe o risco real de que um doador de sangue, infectado por *Bartonella* spp., porém assintomático, tenha suas hemácias contendo estes agentes. Em 2010, foi publicado o primeiro caso de sangue doado infectado por *B. henselae* (59). Estes resultados estabelecem a necessidade de reavaliação da transmissão de *Bartonella* spp. por transfusões de sangue, especialmente em pacientes imunodeficientes .

1.2. Métodos diagnósticos laboratoriais

Não existe um diagnóstico laboratorial padrão para as infecções causadas por *Bartonella* spp.. É cada vez mais claro que nenhum método diagnóstico disponível atualmente confirmará a infecção com *Bartonella* sp. em todos os pacientes imunocompetentes infectados, uma vez que este grupo apresenta baixa bacteremia, o que dificulta ainda mais a detecção (15). Hoje é evidente que várias técnicas precisam ser utilizadas concomitantemente para evitar resultados falso-negativos (60). O diagnóstico laboratorial é baseado principalmente em sorologia por imunofluorescência indireta (IFI), cultura ou PCR (Reação em cadeia da polimerase) (12, 13, 61).

1.2.1. Métodos diagnósticos imunológicos

A IFI é o método diagnóstico mais utilizado por causa da sua simplicidade. Entretanto, os métodos imunológicos apresentam algumas limitações como: reação cruzada entre as espécies e com diversos patógenos, já descrita em vários trabalhos, o que acarretaria falsos-positivos (por exemplo na IFA para IgM que apresentou 80% de reatividade com o vírus Epstein-Barr) além do fato que os antígenos de *kits* comerciais são restritos a poucas espécies (62, 63). Outros fatores que devem ser considerados são a heterogeneidade entre as cepas e genótipos de *Bartonella* spp., as diferenças de parâmetros de análise entre laboratórios e a subjetividade das leituras dos resultados de IFA; além da baixa sensibilidade dos testes de IgM, também relacionados aos diferentes genótipos distribuídos regionalmente (13, 61, 64).

É importante ressaltar que os anticorpos IgG permanecem circulantes por períodos prolongados em gatos experimentalmente infectados e que, em humanos, a prevalência de anticorpos contra *Bartonella* spp. varia de acordo com a idade dos indivíduos investigados (adultos possuem maiores taxas de prevalência do que crianças) (64, 65). Além disso, para uma clara interpretação da soroprevalência de uma área geográfica em particular, a utilização de antígenos regionais deve ser considerada (64). Já foram descritos resultados falso-negativos em amostras japonesas ao se utilizar antígenos americanos na realização de IFA (IgM). Ao utilizar antígenos desenvolvidos a partir de cepas locais, houve o aumento de detecção em 7% (6/85) (66).

Trabalho realizado por Edouard *et al.* (67) sugere a utilização de *Western blotting* para o diagnóstico de endocardite causada por *Bartonella* sp., possibilitando inclusive a identificação da espécie. No entanto, neste trabalho a técnica foi utilizada em amostras previamente positivas na sorologia (IFA). Outro fator a ser considerado é que a técnica de *Western blotting* é muito trabalhosa e não é facilmente reproduzida (68).

Vários trabalhos demonstram que não há correlação entre PCR e sorologia positiva. Em trabalho realizado por Maggi *et al.*, apenas 30,4% das amostras positivas na PCR apresentaram positividade na sorologia (60). No trabalho já citado com 500 doadores do Hemocentro, apenas três dos doadores reagentes na IFI tiveram PCR positiva (41).

Um dos critérios para o diagnóstico etiológico de endocardite cultura negativa é a IFI para anticorpos anti-*Bartonella* sp. (IgG) com títulos ≥ 800 . Porém, já foram descritos pacientes com endocardite causada por *Bartonella* sp. com títulos menores de 1:100 (67).

Em geral, o teste sorológico não deve ser utilizado como única ferramenta diagnóstica e, em caso de positividade, deve ser interpretado apenas como uma exposição anterior à *Bartonella* sp.. O teste sorológico deve ser utilizado em conjunto com outras técnicas como cultura e a PCR para garantir a fidelidade do diagnóstico (7).

1.2.2. Cultura microbiológica

O isolamento da maioria das espécies de *Bartonella* em placas de ágar sangue requer um extenso período de incubação (de 6 a 8 semanas) a 35°C, em atmosfera saturada de água e contendo 5% de CO₂ (22, 65, 69). O isolamento primário em hospedeiros não reservatórios e/ou imunocompetentes, assim como em humanos com DAG ou em cães com infecções causadas por *Bartonella* sp., requer meios específicos e incubação prolongada e raramente se obtém sucesso (5, 22, 69, 70). Dificilmente há o isolamento em cultura direta de sangue ou outras amostras (líquor, fluidos articulares ou efusões cavitárias) em ágar sangue (7).

A cultura líquida de *Bartonella* spp. aumenta a sensibilidade de detecção da infecção por estas bactérias por métodos moleculares (69-71). O desenvolvimento de um meio de cultura líquido denominado BAPGM[®] que

permite o crescimento de, pelo menos, sete espécies de *Bartonella* possibilitou a melhora do isolamento diagnóstico. Este meio é utilizado para pré-enriquecimento e, combinado com diagnósticos moleculares, aumentou o sucesso e a sensibilidade da cultura para diagnóstico tanto em animais como em humanos (15, 69, 72).

1.2.3. Microscopia

A histologia não é frequentemente utilizada como método diagnóstico, mas pode ter grande utilidade para casos de angiomatose bacilar, verruga peruana e DAG. As duas primeiras entidades são histologicamente indistinguíveis. Caracterizam-se por proliferação endotelial disposta em lóbulos com vasos centrais mais diferenciados. Tanto histológica como clinicamente lembram o granuloma piogênico. A presença de infiltrado inflamatório agudo e crônico, com leucócitos no interior dos lóbulos é achado que sugere o diagnóstico. Na DAG, os achados histológicos são semelhantes na lesão primária e no linfonodo acometido, constituindo-se de granulomas com área necrótica central, circundada por linfócitos e histiócitos e com infiltrado neutrofílico, formando microabscessos (26).

Assim, o exame histológico em um estágio inicial da doença, de fato, mostra apenas hiperplasia linfóide e proliferação vascular. Por outro lado, quando há granulomas bem formados, o diagnóstico diferencial em relação à tuberculose ou outras doenças infecciosas granulomatosas pode ser muito difícil (73).

1.2.4. PCR

Assim como para os outros métodos diagnósticos, não existe um consenso sobre os melhores *primers* e condições a serem usadas na PCR para detecção de DNA de bartonela. Vários artigos descrevem as regiões do gene 16S rRNA, a região intergênica (*ITS*) 16S-23S rRNA, o gene da citrato sintase, ou da riboflavina sintase, o gene *groEL*, o gene *ftsZ*, o gene *gltA* ou o gene da subunidade beta da RNA polimerase como as mais eficientes e promissoras na detecção e diferenciação das diferentes espécies de *Bartonella* (74, 75). Além dos *primers* que determinam a região a ser amplificada e, portanto, a sensibilidade da reação, a técnica da PCR escolhida também

influencia no sucesso do diagnóstico. A PCR *nested* (PCR de dupla amplificação) pode aumentar muito a sensibilidade da detecção assim como a PCR em tempo real (PCR *Real Time*) (12, 65, 71, 76).

A grande vantagem dos métodos diagnósticos moleculares como a PCR é a rapidez do resultado quando comparado ao da cultura, que é prolongada, além da possível identificação da espécie causadora da infecção (77). A partir do desenvolvimento de testes por PCR mais sensíveis e específicos, existe a possibilidade de diagnosticar a infecção rapidamente, mesmo que a bacteremia seja baixa. Este teste poderia ser utilizado rotineiramente para o diagnóstico de pacientes ou mesmo na triagem dos doadores de sangue, evitando assim a transmissão deste agente.

Apesar destas vantagens, existem algumas limitações do uso da PCR: a possibilidade de resultados falso-positivos por contaminação por DNA de controle ou de amostras positivas anteriormente; resultados falso-negativos por terem quantidade de DNA inferior ao limite de detecção. Além disso, encontrar o DNA do patógeno na amostra não prediz com garantia total uma infecção ativa (78, 79).

1.3. Epidemiologia

O gênero *Bartonella* está presente em todo o mundo, embora as doenças não sejam relatadas em muitos países (80). Algumas espécies são endêmicas de determinadas áreas, como a *B. bacilliformis* que é restrita à região dos Andes (Peru, Colômbia e Equador). Esta distribuição geográfica limitada de algumas espécies reflete a distribuição de seus hospedeiros e vetores. As espécies *B. quintana* e *B. henselae* estão presentes ao redor do mundo porque possuem hospedeiros (humanos e gatos) e vetores (piolhos de corpo e pulgas) também com distribuição mundial (23, 80, 81).

Não existem dados suficientes para determinar a exata prevalência da bacteremia causada por *Bartonella* spp. (80). Estimou-se que, a cada ano, ocorram vinte e quatro mil casos de DAG nos Estados Unidos, o que resultaria em duas mil internações e que o custo estimado desta doença é de, aproximadamente, doze milhões de dólares (23). A soroprevalência em humanos varia de 1,5 a 77,5%, sendo a menor taxa encontrada no Reino Unido e a maior na Peru (82). No Brasil, estudo realizado em 2001, com 437

indivíduos de 5 a 92 anos da cidade de Piau-MG, revelou soroprevalência de 13,7% e 12,8% para *B. henselae* e *B. quintana* respectivamente (41, 83). Outro trabalho, realizado com pacientes cardiopatas (três grupos: portadores de arritmias, endocardite e pacientes com doença de Chagas) do Brasil e grupo controle brasileiro, mostrou positividade na PCR para *Bartonella* spp. de 40,5% (60/148) nos pacientes cardiopatas *versus* 1,8% (1/56) do grupo controle. A análise separada dos quatro grupos mostrou que o risco de um paciente brasileiro com endocardite estar infectado com *Bartonella* sp. foi 22 vezes maior do que nos controles. Em pacientes de arritmia, o risco da infecção foi de 45 vezes maior quando comparado com os mesmos controles e 40 vezes maior para pacientes com cardiomiopatia chagásica (84).

Não existem muitos trabalhos de prevalência de infecção por *Bartonella* sp. em humanos assintomáticos, como é possível observar no quadro 2. Para o levantamento bibliográfico mostrado neste quadro, buscou-se nas bases de dados do Scholar Google, Pubmed e Scopus os artigos publicados entre 2009 (ano de coleta das amostras deste estudo) até novembro de 2017, com “blood donors” e “Bartonella” no título ou no resumo.

Quadro 2. Levantamento nas bases de dados do Scholar Google, Pubmed e Scopus dos artigos publicados entre 2009 até novembro de 2017, com “blood donors” e “Bartonella” no título ou no resumo.

País	PCR positiva	Imunofluorescência positiva	Referência
Turquia	NT	48/800 (6%) IgG <i>B. henselae</i>	Yilmaz <i>et al.</i> 2009 (85)
Croácia	NT	31/54 (57,4%) IgG <i>B. henselae</i>	Pandak <i>et al.</i> 2009 (86)
Grécia	NT	104/481 (21,6%) IgG <i>B. henselae</i>	Minadakis <i>et al.</i> 2009 (87)
Brasil	NT	43/125 (34%) IgG <i>B. henselae</i>	Lamas <i>et al.</i> 2010 (88)
China	NT	52/351 (14,81%) IgG <i>B. henselae</i>	Sun <i>et al.</i> 2010 (89)
Brasil	1/56 (1,8%)	NT	Corrêa <i>et al.</i> 2012 (90)
Itália	NT	13/122 (11,4%) IgG <i>B. henselae</i>	Mansueto <i>et al.</i> 2012 (91)
Polinésia Francesa	NT	0/472 (0%) IgG <i>B. henselae</i>	Musso <i>et al.</i> 2014 (92)
Namíbia	NT	3/319 (2,9%) IgG <i>B. henselae</i>	Noden <i>et al.</i> 2014 (93)
Turquia	NT	3,3% (11/333) IgG <i>B. henselae</i>	Aydin <i>et al.</i> 2014 (94)
Brasil	16/500 (3,2%)	81/500 (16,2%) IgG <i>B. henselae</i> 160/500 (32,0%) IgG <i>B. quintana</i>	Pitassi <i>et al.</i> 2014 (41)
Áustria	NT	1/100 (1%) IgG <i>B. henselae</i> 22/100 (22%) IgG <i>B. quintana</i>	Müller <i>et al.</i> 2016 (95)
Peru	1/42 (2,38%)	NT	Pons <i>et al.</i> 2016 (96)

NT: Não testado

Como é possível observar no quadro 2, foram realizados apenas três trabalhos com PCR para detecção de *Bartonella* sp. em assintomáticos no período pesquisado, sendo que dois deles foram realizados no Brasil e prevalência variou de 1,8% a 3,2%. Em ambos foi realizada apenas uma reação de triagem em cada amostra (41, 90).

Ao realizar levantamento semelhante, mas sem considerar doadores de sangue, é possível verificar que há poucos trabalhos publicados utilizando PCR como método diagnóstico e com número considerável de pacientes. Para o levantamento bibliográfico mostrado no quadro 3, buscou-se nas bases de dados do Scholar Google, Pubmed e Scopus os artigos publicados entre 2009 e novembro de 2017, com “PCR” e “Bartonella” no título. Foram excluídos os trabalhos que não foram realizados com humanos e com menos de 30 indivíduos.

Quadro 3. Levantamento nas bases de dados do Scholar Google, Pubmed e Scopus dos artigos publicados entre 2009 (ano de coleta das amostras deste estudo) até novembro de 2017, com “PCR” e “Bartonella” no título.

País	Nº de pacientes/ População estudada	PCR positiva (amostra)	Manifestações clínicas	Referência
EUA	192 Pacientes com exposição a animais	46 (23,9%) <i>Bartonella</i> spp. (sangue, soro e cultura líquida)	Fadiga, insônia, dor nas articulações e dor muscular	Maggi <i>et al.</i> 2011 (60)
EUA	296 Pacientes reumatológicos	40 (13,5%) <i>B. henselae</i> 54 (18,2%) <i>B. koehlerae</i> 10 (3,4%) <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>Berkhoffii</i> (sangue, soro e cultura líquida)	Artralgia/artrite, Fadiga crônica e fibromialgia	Maggi <i>et al.</i> 2012 (97)
França	106 Pacientes com endocardite	48/52 (92,0%) <i>Bartonella</i> spp. (valvas cardíacas) 20/60 (33,0%) <i>Bartonella</i> spp. (sangue) 25/70 (36,0%) <i>Bartonella</i> spp. (soro)	Endocardite	Edouard <i>et al.</i> 2014 (67)
Espanha	89 Veterinários	2 (2,25%) <i>B. henselae</i> 3 (3,37%) <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i> 2 (2,25%) <i>B. quintana</i> (sangue e cultura líquida)	Assintomático	Oteo <i>et al.</i> 2017 (98)
França	83 Pacientes com DAG	28 (33,73%) <i>Bartonella</i> spp. (aspirado de linfonodo)	DAG	Hobson <i>et al.</i> 2017 (99)

Praticamente todos os trabalhos citados no quadro 3 utilizaram PCR para amplificação de apenas uma região. Os dois trabalhos do Maggi *et al.* foram realizados com os mesmos *primers* para PCR convencional (região *ITS*). O trabalho de Hobson *et al.* também utilizou apenas PCR convencional, mas para a região *ribC*. Já o trabalho de Oteo *et al.* utilizou PCR convencional e em tempo real, mas as duas com os mesmos *primers* utilizados nos trabalhos de Maggi *et al.* (*ITS*). Apenas o trabalho de Edouard *et al.* realizou PCR para regiões distintas, mas só nas amostras previamente positivas na PCR em tempo real para a região *ITS*, ou seja, as outras reações, para as regiões *pap31* e *YOP* foram utilizadas apenas para confirmação do primeiro resultado.

1.4. Diagnóstico desafiador

Além do amplo espectro de manifestações clínicas, pode haver ainda bacteremia assintomática, bem reconhecido no período intercrise da febre das trincheiras (41). O crescimento lento, mesmo em meio de cultura específico, a necessidade de meios enriquecidos e atmosfera rica em CO₂, além da bacteremia cíclica e baixa tornam o diagnóstico laboratorial das bartoneloses um desafio, como pode ser exemplificado pelo relato de caso a seguir (4, 8, 18).

Homem, 62 anos, hipertenso e diabético, com antecedentes de tabagismo e etilismo, contato com cães e histórico de picada por carrapatos apresentou-se no Hospital das Clínicas da Unicamp referindo, havia dois meses, febre, tosse e perda de 13 kg. Não apresentava linfonodo ou visceromegalias indicativas de bartonelose. Apresentava-se anêmico (hemoglobina 6,1g/dL). A pesquisa de bacilos álcool-ácidos resistentes no escarro e o teste tuberculínico foram negativos. A broncoscopia apresentou resultados microbiológicos e citológicos normais. Quinze hemoculturas de rotina, além de culturas para micobactérias, não apresentaram crescimento bacteriano. Exames sorológicos foram negativos para bartonelose, coxielose, erliquiose, rickettsioses, brucelose, paracoccidioidomicose, sífilis, toxoplasmose, hepatites B e C e infecção pelo HIV. A tomografia computadorizada (TC) de tórax mostrou um nódulo de 0,8 cm no segmento posterior do lóbulo pulmonar superior esquerdo e um pequeno derrame pleural bilateral. Além disso, a TC de abdomen mostrou esplenomegalia e a cintilografia com gálio 67 sugeriu uma inflamação infecciosa nos pulmões, hepatoesplenomegalia e artrite nos joelhos. Durante 40 dias o paciente foi tratado empiricamente com amoxicilina + ácido clavulânico, piperacilina de sódio e tazobactam sódico. Durante este período o paciente apresentou piora do quadro. Dois dias antes de sua morte por choque séptico, foram solicitados testes microbiológicos e moleculares para bartonelose e iniciado tratamento com imipenem, cloranfenicol, gentamicina e ceftriaxona por suspeita de choque séptico. Todas as doses antimicrobianas utilizadas foram as preconizadas internacionalmente (100).

Os testes moleculares realizados com o DNA extraído do sangue foram negativos. A PCR de uma amostra de cultura líquida foi positiva apenas

para a reação de dupla amplificação. Foi possível isolar colônias, apesar da antibioterapia em uso, e estas foram positivas em todos os testes moleculares realizados (Quadro 4).

Quadro 4. Resultados de PCR para *Bartonella* sp. do paciente descrito no relato de caso.

PCR	Amostra de DNA		
	Sangue	Cultura Líquida	Cultura Sólida
PCR convencional (<i>ITS</i>)(39)	Negativo	Negativo	Positivo
PCR de dupla amplificação (<i>ftsZ</i>)(101)	Negativo	Positivo	Positivo
Resultado final	Negativo	Positivo	Positivo

Os resultados deste paciente ilustram a ineficiência do tratamento antibiótico utilizado, além da dificuldade do diagnóstico laboratorial com resultado falso-negativo na sorologia para *B. henselae*. Também é notável a diferença entre as diferentes técnicas de PCR e como a realização de cultura líquida de enriquecimento e subcultura em meio sólido e ambientes específicos permitiu o isolamento do agente. Todas estas dificuldades já foram descritas anteriormente na literatura (35, 40, 102). Como é possível observar, apesar dos esforços, o diagnóstico de bartonelose ainda é muito difícil e demorado.

Em trabalho com gatos realizado pelo grupo de pesquisa da Unicamp observou-se que 27,7% (31/112) dos animais estudados em Campinas foram positivos na PCR convencional realizada a partir do DNA extraído das culturas líquidas. Quando o mesmo material foi examinado com a PCR de dupla amplificação 45,5% (51/112) dos gatos puderam ter DNA de *Bartonella* spp. detectado. O DNA extraído diretamente do sangue também foi testado por PCR de dupla amplificação, sendo que 76,8% (86/112) foram positivos. Ao levar em consideração todos os testes realizados nas amostras de sangue e cultura líquida 90,2% (101/112) dos gatos tiveram DNA de *Bartonella* spp. detectado (103).

1.5. Projeto anterior com doadores de sangue

Sem financiamento nacional, o mesmo grupo de pesquisa, em parceria com pesquisadores da Universidade Johns Hopkins (EUA), investigou a prevalência das espécies de *Bartonella* em uma população de doadores de sangue de Campinas, sudeste do Brasil. As amostras de sangue de 500 doadores voluntários foram incubadas em meio de crescimento líquido BAPGM[®] (*Bartonella Alpha-Proteobacteria Growth Liquid Medium*) e cultivadas a 37°C em 5% CO₂ durante 14 dias. Subsequentemente, amostras foram subinoculadas em meio ágar contendo 30% de sangue de carneiro por mais 42 dias. O recurso obtido permitia a realização de uma única reação de PCR de todas as amostras e o DNA foi extraído da cultura líquida e foi testado por PCR convencional específico para o gênero *Bartonella*, que amplifica a região *ITS*. Os produtos amplificados foram sequenciados para a identificação de espécies. Os isolados gram-negativos obtidos da cultura sólida foram também testados pela mesma técnica. Anticorpos IgG contra *B. henselae* e *B. quintana* foram detectados por imunofluorescência indireta. Dezesseis doadores de sangue (3,2%) foram positivos para *Bartonella* sp. na PCR após cultura em meios líquidos e sólidos. O sequenciamento do DNA indicou que 15 amostras mostraram identidade para *B. henselae* e uma amostra à *B. clarridgeiae*. Os anticorpos contra *B. henselae* e *B. quintana* foram detectados em 16,2% e 32% dos 500 doadores, respectivamente (41, 104).

Ao considerar doadores de sangue assintomáticos, mas infectados com *Bartonella* spp., existe a real possibilidade de transmissão desta bactéria por transfusão sanguínea. O receptor desta transfusão pode manifestar os sintomas da bartonelose, sem que este seja um diagnóstico aventado pela equipe médica, uma vez que esta doença é negligenciada, pouco conhecida e o espectro de manifestações a elas associadas cresce rapidamente. Como a infecção assintomática pode ser crônica, não existe necessariamente relação temporal entre infecção e a manifestação clínica.

Como foi demonstrado no trabalho realizado anteriormente com gatos (103), a combinação de PCR diferentes e de amostras diferentes aumentam as chances de detecção do patógeno. Assim, foi proposto analisar novamente as mesmas 500 amostras de doadores de sangue, coletando alíquotas do sangue total e da cultura líquida para realização de diferentes

reações moleculares. Isso porque com o desenvolvimento e a identificação de uma metodologia diagnóstica melhor, seria possível detectar a infecção causada por *Bartonella* sp., mesmo que subclínica, e no futuro utilizar como ferramenta diagnóstica ou mesmo de triagem dos doadores de sangue ou órgãos sólidos.

2. Objetivos

2.1. Geral

- Avaliar a prevalência de *Bartonella* spp. no sangue de 500 doadores de sangue do Hemocentro de Campinas/SP utilizando quatro PCR distintas.

2.2. Específicos

- Padronizar método diagnóstico potencialmente mais eficiente por meio de PCR em tempo real (*real-time*) para a detecção de *Bartonella* spp. em humanos.
- Avaliar a presença do DNA de *Bartonella* spp. por PCR em tempo real do DNA extraído de sangue total e do DNA extraído de cultura líquida.
- Avaliar a presença do DNA de *B. henselae* por PCR de amplificação dupla (PCR *nested*) do DNA extraído de sangue total e do DNA extraído de cultura líquida.
- Avaliar a presença do DNA de *Bartonella* spp. por PCR convencional do DNA extraído de sangue total e cultura líquida com *primers* para duas regiões distintas.
- Comparar a sensibilidade dos métodos moleculares (PCR convencional, PCR *nested* e PCR em tempo real) para o diagnóstico de infecção assintomática por *Bartonella* spp. em doadores de sangue do Hemocentro de Campinas/SP.
- Comparar os resultados obtidos no projeto anterior e já publicados (41) com o presente projeto, uma vez que as amostras utilizadas foram as mesmas.

3. Metodologia

Foram utilizadas as mesmas 500 amostras de doadores de sangue do Hemocentro de Campinas que foram coletadas aleatoriamente no período de novembro de 2009 a janeiro de 2010, durante procedimento de doação de sangue, para a realização do projeto previamente descrito (41).

O projeto havia sido submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Unicamp sob o nº 122/2005. No ano de 2015 foi reaprovaado por essa mesma comissão sob nº 1.135.941 para a realização dos novos exames das amostras estocadas (Anexo 1).

Novas amostras foram obtidas dos tubos com EDTA contendo o sangue total dos doadores e dos frascos da cultura de enriquecimento que havia sido realizada em meio líquido BAPGM[®] conforme ilustrado na figura 2. Os tubos e os frascos estavam armazenadas em freezer a -20°C e novas extrações de DNA foram feitas a partir de alíquotas destes materiais.

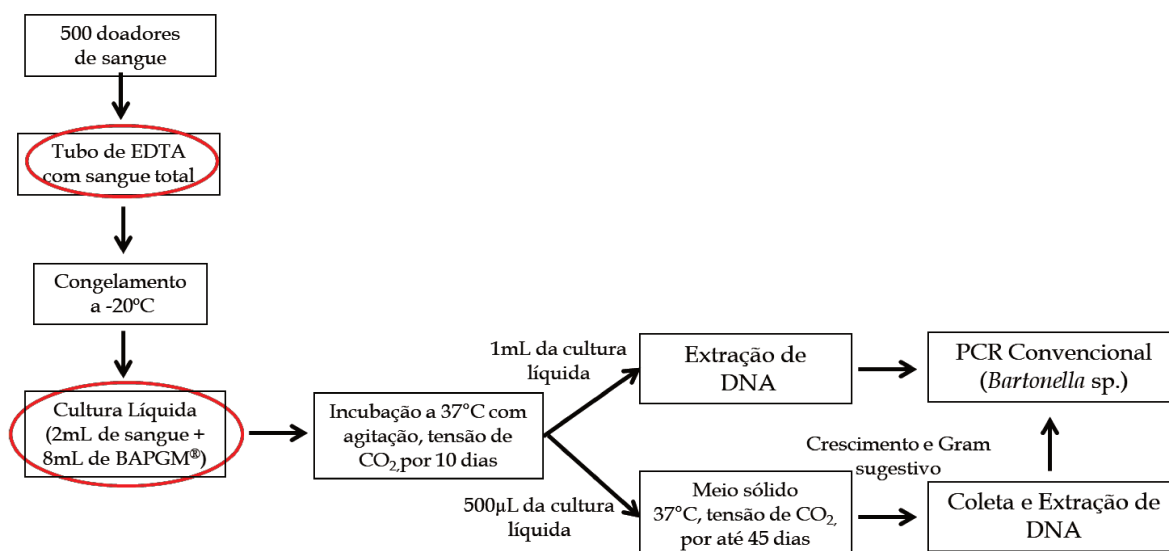


Figura 2. Fluxograma de materiais e métodos do projeto realizado anteriormente. A sinalização em vermelho mostra quais amostras foram selecionadas para coleta de novas alíquotas para a realização do presente projeto.

3.1. Extração do DNA a partir do sangue total

A extração de DNA a partir do sangue total foi realizada com QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen®), de acordo com as recomendações do fabricante. Foi realizada apenas uma alteração: o DNA foi eluído em 100µL ao invés de 200 µL em água Milli-Q e foi armazenado a -20°C até o momento de uso.

Em cada extração realizada foram adicionados dois controles:

- “branco de extração”: tubo em que foram adicionadas todas as soluções da extração, mas sem amostra inicial;
- “controle positivo”: cepa padrão de *B. henselae* Houston (ATCC 49882) suspensa em sangue total.

3.2. Extração do DNA a partir da cultura líquida

Uma alíquota de 1mL de cultura líquida foi centrifugada por 5 minutos a 6.000x g para concentrar as células na parte inferior do tubo. Após esta etapa foram submetidas à extração de DNA utilizando o QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen®) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA foi eluído em 100µL de água Milli-Q e armazenado a -20°C até o momento de uso.

Em cada extração realizada foram adicionados três controles:

- “branco de extração”: tubo com todas as soluções da extração, mas sem amostra inicial;
- “controle negativo”: meio líquido BAPGM® sem inóculo e que foi incubado nas mesmas condições que as amostras;
- “controle positivo”: cepa padrão de *B. henselae* Houston (ATCC 49882).

3.3. Amplificação do DNA

Em todas as reações foram adicionados três controles:

- “branco de PCR”: tubo com apenas os reagentes de cada reação e ao invés do DNA, foi colocada a mesma água utilizada na preparação da reação
- “controle positivo”: DNA extraído de cepa de *B. henselae*
- diluições seriadas de DNA de *B. henselae* de modo a determinar a sensibilidade e o limite de detecção de cada reação.

As diluições seriadas foram calculadas da seguinte maneira: a partir do número de pares de bases do genoma completo da *B. henselae* obtido do GenBank® (*Bartonella henselae* strain Houston-I chromosome, complete genome. Número de acesso: CP020742.1) foi possível calcular o peso molecular do seu genoma inteiro por uma ferramenta matemática disponível no site www.changbioscience.com/genetics/mw.html. A cepa padrão de *B. henselae* (*B. henselae* Houston – I ATCC 49882) foi extraída e quantificada por espectrofotometria (NanoDrop®). A partir destes dois dados foi possível calcular o número de cópias por microlitro presente no DNA extraído da cepa padrão. Realizaram-se diluições seriadas que foram testadas em 10 reações de PCR de cada técnica e para cada região. O menor número de cópias amplificado em todas as 10 reações foi utilizado como a sensibilidade analítica (Figura 3).

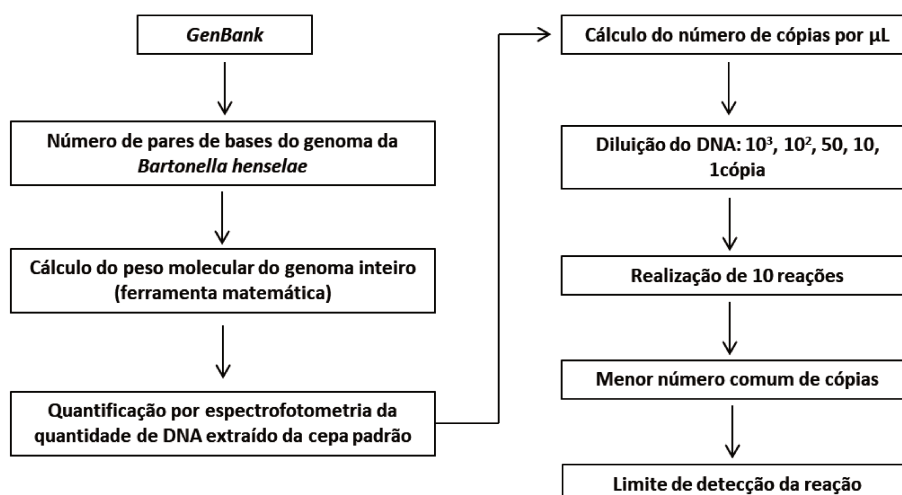


Figura 3. Fluxograma do cálculo do limite de detecção das PCR.

Todas as amostras (tanto o DNA extraído do sangue total quanto o de cultura líquida) foram testadas para todos os tipos de PCR descritos abaixo. Em todas as reações (exceto a PCR em tempo real) foi utilizada a enzima da Promega (GoTaq® Flexi).

3.3.1. PCR controle

Todas as amostras extraídas foram testadas com PCR para amplificação de um gene constitutivo. A região escolhida foi um fragmento do gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), o qual codifica uma enzima relacionada com a glicólise e expressa por todas as células de mamíferos. Esta reação tem como objetivo a verificação da qualidade do DNA extraído, além da certificação da inexistência de inibidores de amplificação. Os detalhes da reação estão descritos no quadro abaixo (Quadro 5).

Quadro 5. Sequência dos *primers* e protocolo da PCR controle.

PCR Controle (<i>GAPDH</i>)		
GAPDH F → 5' – CCTTCATTGACCTCAACTACAT – 3'		
GAPDH R → 5' – CCAAACCTTGTCATGGATGACC – 3'		
Reagente	Volume (em µL)	Ciclo
Água	6,75	95° C – 2' 94° C – 15'' 57° C – 15'' 72° C – 15'' 72° C – 2' 4° C – ∞ 35 X

3.3.2. PCR convencional

Todas as amostras de DNA foram submetidas à PCR convencional para *Bartonella* sp. baseado na região *ITS*, ou a região intergênica 16S-23S do RNAr (39). O limite de detecção considerado para esta PCR foi de 50 cópias. Os detalhes da reação estão descritos no quadro abaixo (Quadro 6).

Quadro 6. Sequência dos *primers* e protocolo da PCR convencional *ITS* baseado em um fragmento da região intergênica 16S-23S do RNAr.

PCR Convencional (<i>ITS</i>) – Para gênero <i>Bartonella</i>		
ITS F → 5' – CTTCA GATGATGATCCCAAGCCTT(Y)TGGCG – 3'		
ITS R → 5' – GAACCGACGACCCCCTGCTTGCAAAGCA – 3'		
Reagente	Volume (em µL)	Ciclo
Água	9,875	95° C – 5' 94° C – 15'' 66° C – 15'' 72° C – 15'' 72° C – 5' 4° C – ∞ } 55 X
Tampão 5x incolor	5	
MgCl ₂ (25mM)	2	
dNTP (10µM)	0,5	
ITS F (10µM)	1,25	
ITS R (10µM)	1,25	
Taq (5U/µL)	0,125	
Total Mix:	20	Tamanho esperado do fragmento: 604pb
DNA	5	

Também foi realizada com todas as amostras outra reação com os *primers* para a região *gltA*, ou do gene da citrato sintase, específica para *B. henselae* (105). O limite de detecção considerado para esta PCR foi de 50 cópias. Os detalhes da reação estão descritos no quadro abaixo (Quadro 7).

Quadro 7. Sequência dos *primers* e protocolo da PCR convencional baseada em um fragmento do gene *gltA*.

PCR Convencional (<i>gltA</i>) – Para <i>Bartonella henselae</i>		
CS F → 5-ATGGGTTTTGGTCATCGAGT-3		
CS R → 5-AAATCGACATTAGGGTAAAGTTTTT-3		
Reagente	Volume (em µL)	Ciclo
Água	10,375	95° C – 5' 95° C – 30'' 59° C – 1' 72° C – 30'' 72° C – 5' 4° C – ∞ 45 X

3.3.3. PCR de dupla-amplificação (*nested*) para *B. henselae*

Todas as amostras que tiveram o DNA extraído foram testadas por PCR *nested* espécie-específica para a região alvo que codifica a proteína FtsZ que atua na divisão celular da *B. henselae* (*primers* BH) (101). O limite de detecção considerado para esta PCR foi de 10 cópias. O protocolo da reação está descrito no quadro abaixo (Quadro 8).

Quadro 8. Sequência dos *primers* e protocolo da PCR *nested* para *B. henselae* baseado no gene *ftsZ*.

PCR nested (<i>ftsZ</i>)– Para <i>Bartonella henselae</i>		
Primeira reação:		
BH F → 5' – GCCGCAAAGTTCTTTTCATG – 3'		
BH R→ 5' – AGGTGAACGCGCTTGTATTTG – 3'		
Segunda reação:		
BH S→ 5' – CAAAACGGTTGGAGAGCGT– 3'		
BH A→ 5' – CGCCTGTCATCTCATCAAGA – 3'		
Primeira Reação		
Reagente	Volume (em µL)	Ciclo
Água	12,875	
Tampão 5x incolor	5	95° C – 5' 95° C – 1' 56° C – 1' 72° C – 1' } 40 X 72° C – 5' 4° C – ∞
MgCl ₂ (25mM)	2	
dNTP (10µM)	0,5	
BH F(10µM)	1	
BH R (10µM)	1	
Taq (5U/µL)	0,125	
Total Mix:	22,5	Tamanho esperado do fragmento: 354pb
DNA:	2,5	
Segunda Reação		
Reagente	Volume (em µL)	Ciclo
Água	15,175	
Tampão 5x incolor	5	95° C – 5' 95° C – 1' 61° C – 1' 72° C – 1' } 40 X 72° C – 5' 4° C – ∞
MgCl ₂ (25mM)	2	
dNTP (10µM)	0,5	
BH S (10µM)	1	
BH A (10µM)	1	
Taq (5U/µL)	0,125	
Total Mix:	24,8	Tamanho esperado do fragmento: 218pb
Produto PCR 1	0,2	

3.3.4. PCR em tempo real para *B. henselae*

O DNA extraído do sangue total e da cultura líquida foi testado por PCR *Real-time* utilizando os mesmos *primers* utilizados na PCR convencional para amplificação da região do gene da citrato sintase (*gltA*) no sistema *Sybr[®] Green* utilizando a enzima Fast SYBR[™] Green Master Mix (ThermoFisher Scientific) (105). O limite de detecção considerado para esta PCR foi de 20 cópias. O protocolo da reação segue abaixo (Quadro 9).

Quadro 9. Sequência dos *primers* e protocolo da PCR em tempo real

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

3.4. Sequenciamento

Os amplificados de boa qualidade foram enviados para o sequenciamento em empresa terceirizada. Os resultados foram comparados com banco de dados do GenBank[®] utilizando a ferramenta BLAST do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

3.5. Análise estatística

Para verificar qual tipo de amostra (sangue ou cultura líquida) seria a mais adequada considerando os resultados de qualquer método de PCR utilizado, foi realizado o teste não-paramétrico de McNemar-Bowker, que é uma extensão do teste de McNemar quando se tem variáveis nominais com mais do que duas categorias de variáveis não-independentes (também chamadas “pareadas”).

Já para analisar qual seria o melhor método de PCR espécie-específico para *B. henselae* independentemente da amostra testada e também qual seria o melhor método de PCR para amostras de sangue ou para amostras de cultura líquida foi realizada a análise bayesiana tipo *Latent Class Model* (LCM). Neste teste, supõe-se que nenhum dos testes é um padrão-ouro perfeitamente preciso, portanto um modelo de “padrão-ouro imperfeito” é definido com base nos resultados de múltiplos testes de diagnósticos oriundos das mesmas amostras. A abordagem bayesiana pode extrair inferências sobre a prevalência do agente estudado e as propriedades do teste ao ajustar a possibilidade de dependência condicional entre os testes (106). O fator limitante do uso da análise bayesiana LCM é a necessidade de intensa programação computacional. Neste estudo, uma ferramenta *online* foi utilizada (*Modelling of Infectious Disease Centre - Imperfect Gold Standard Model*) utilizando resultados de três distintos métodos de PCR das mesmas amostras. O número de repetições da análise foi definido em 25.000. Medidas de acurácia como sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, e valor preditivo negativo (107) foram calculados usando esse método, assim como o intervalo de confiança de 95%.

Também foi utilizado o método da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Esta análise por meio de um método gráfico simples que permite estudar a variação da sensibilidade e especificidade, para diferentes valores de corte. A área abaixo da curva ROC (AUC: *Area Under the Curve*) está associada ao poder discriminante de um teste de diagnóstico (108).

4. Resultados

4.1. Amplificação do DNA

Todas as amostras extraídas apresentaram positividade na PCR controle, demonstrando a presença de DNA íntegro e ausência de inibidores da PCR.

Para uma melhor compreensão dos resultados, os dados estão representados em diagrama de Venn. Desta forma, é possível visualizar quantas amostras foram positivas em cada reação, além de observar se houve amostra positiva em mais de uma PCR. Cada elipse representa uma PCR realizada e os números a quantidade de amostras positivas em cada reação. Também é possível observar as intersecções entre cada método empregado.

Na figura 4 estão representados os resultados dos ensaios de PCR realizados a partir do DNA extraído de amostras de sangue. É possível visualizar que em amostras de sangue a PCR *nested* foi a mais eficiente, tendo, no total, 16 amostras positivas, sendo 10 delas positivas apenas nessa reação. A segunda reação mais eficiente para detecção do DNA foi a PCR em tempo real, com 14 amostras positivas, sendo que cinco delas também foram positivas na PCR *nested*. A PCR convencional para a região da citrato sintase (*gltA*) foi a menos eficiente, mostrando positividade apenas em quatro amostras, sendo que três destas amostras também foram positivas em outras reações. Apenas uma amostra foi positiva nos quatro testes realizados. No total, considerando as quatro reações, 30 doadores foram positivos, o que corresponde a 6% de positividade.

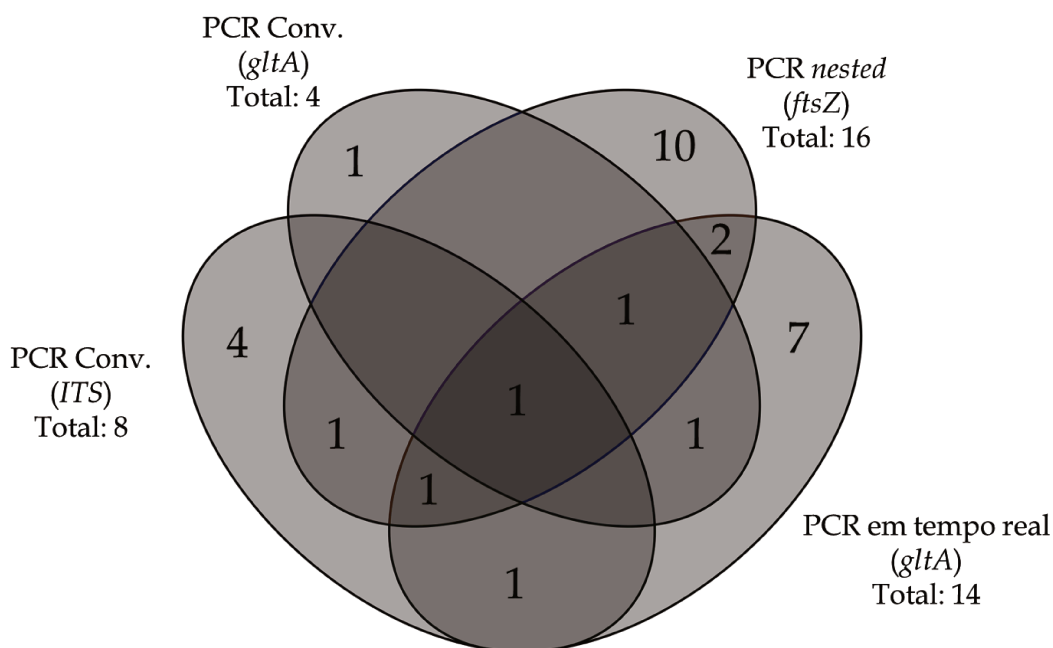


Figura 4. Resultados com PCR positivas das amostras extraídas de sangue de 500 doadores. No total, considerando as quatro reações, 30 (6%) amostras foram positivas.

Na figura 5 estão representados os resultados dos ensaios de PCR realizados a partir do DNA extraído da cultura líquida. É possível visualizar que nessas amostras a PCR em tempo real foi a reação mais eficiente, tendo no total 60 amostras positivas. Dentre estas, 41 foram positivas apenas neste teste. A segunda reação mais eficiente foi a PCR *nested*, com 31 amostras positivas, sendo que 18 delas também foram positivas na PCR em tempo real. A PCR convencional para a região *ITS* foi a menos eficiente, mostrando positividade em oito amostras, sendo que seis amostras também foram positivas em outras reações. Apenas quatro amostras foram positivas nos quatro testes. No total, considerando as quatro PCR diferentes, 77 doadores foram positivos, o que corresponde a 15,4%.

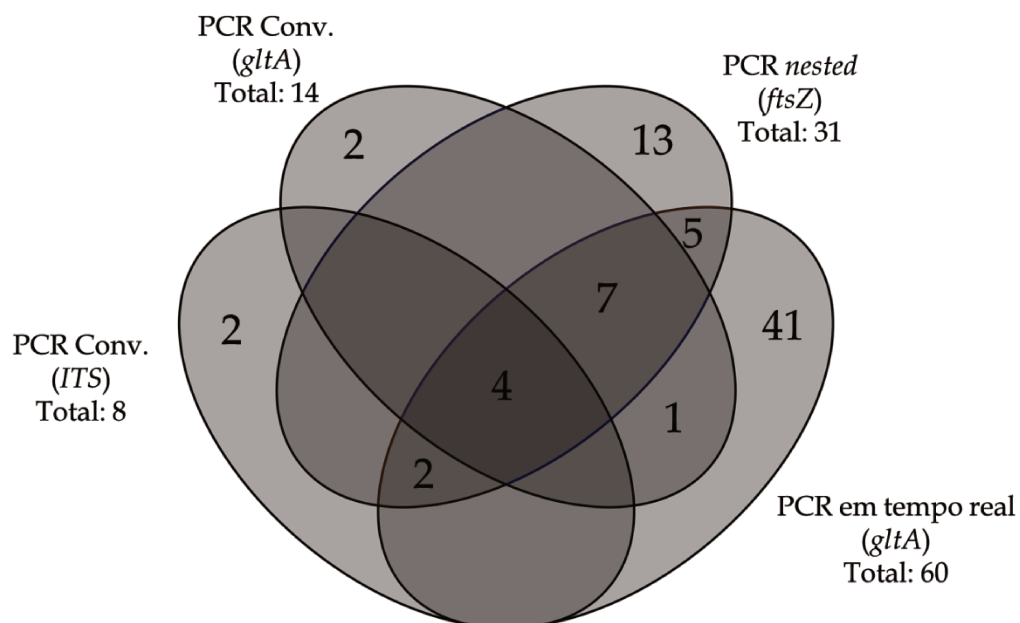


Figura 5. Resultados com PCR positivas das amostras extraídas de cultura líquida de 500 doadores. No total, considerando as quatro reações, 77 (15,4%) amostras foram positivas.

Na figura 6 estão representados os resultados de todos os ensaios de PCR realizados a partir do DNA extraído tanto das amostras de sangue como da cultura líquida. A reação mais sensível na detecção de DNA de *Bartonella* sp. foi a PCR em tempo real com 72 amostras positivas, sendo que 36 foram positivas apenas neste teste. A segunda reação mais eficiente foi a PCR *nested* com 54 amostras positivas, sendo que 22 foram positivas apenas neste teste. A PCR convencional para o gene da citrato sintase (*gltA*), apesar de ter tido um maior número de positivos quando comparado com a PCR convencional baseado no gene *ITS*, não se mostrou mais eficiente que esta última, já que só uma amostra foi positiva apenas nessa reação, enquanto que na *ITS*, apesar de 16 amostras positivas, cinco só foram positivas nessa reação. Somando os resultados 102/500 (20,4%) dos doadores mostraram-se positivos.

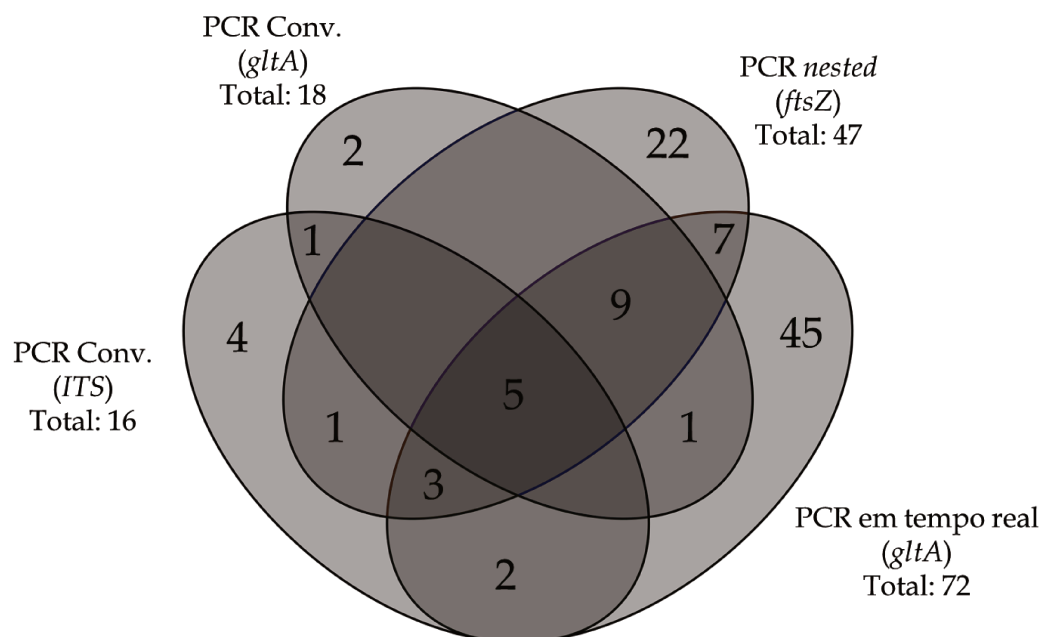


Figura 6. Resultados de positividade nos diferentes ensaios de PCR das amostras extraídas de sangue e cultura líquida de 500 doadores. No total, considerando as quatro reações, 102 (20,4%) amostras mostraram-se positivas.

4.2. Sequenciamento

Foi possível realizar sequenciamento em 72 amostras que apresentaram qualidade suficiente. Outras 27 amostras também foram encaminhadas ao sequenciamento, mas não foi possível obter resultado, pois o laboratório terceirizado, responsável pelo sequenciamento, errou o procedimento inviabilizando os dados. Estes amplificados não puderam ser recuperados.

Ao todo foram sequenciadas amostras de 66 doadores dos 102 positivos. Em seis doadores foi possível sequenciar mais de uma região (Quadro 10).

Todas as amostras foram submetidas à ferramenta BLAST do NCBI e apresentaram 100% de similaridade com *B. henselae*. O número de acesso correspondente ao GenBank® para cada região está descrito no quadro 11.

Quadro 10. Relação das amostras e das regiões sequenciadas

Identificação da Amostra	Amostra Sequenciada	Região	Identificação da Amostra	Amostra Sequenciada	Região
2	Cultura líquida	<i>ftsZ</i>	301	Sangue	<i>ftsZ</i>
7	Cultura líquida	<i>gltA</i>	311	Cultura líquida	<i>ftsZ</i>
10	Cultura líquida	<i>ITS</i>	316	Cultura líquida	<i>gltA</i>
14	Cultura líquida	<i>ftsZ</i>	317	Sangue	<i>ftsZ</i>
15	Cultura líquida	<i>gltA</i>	324	Sangue	<i>ftsZ</i>
17	Cultura líquida	<i>ITS e gltA</i>	330	Cultura líquida	<i>ftsZ</i>
18	Cultura líquida	<i>gltA</i>	332	Cultura líquida	<i>ftsZ</i>
27	Cultura líquida	<i>gltA</i>	342	Cultura líquida	<i>ftsZ</i>
39	Cultura líquida	<i>gltA</i>	349	Cultura líquida	<i>gltA</i>
45	Cultura líquida	<i>gltA</i>	353	Cultura líquida	<i>gltA</i>
62	Cultura líquida	<i>ftsZ e gltA</i>	357	Cultura líquida	<i>gltA</i>
63	Cultura líquida	<i>ITS e gltA</i>	358	Cultura líquida	<i>ftsZ</i>
109	Cultura líquida	<i>gltA</i>	368	Cultura líquida	<i>gltA</i>
136	Cultura líquida	<i>ITS</i>	369	Cultura líquida	<i>ftsZ</i>
159	Cultura líquida	<i>ftsZ</i>	373	Sangue	<i>ftsZ</i>
187	Cultura líquida	<i>ITS</i>	379	Sangue	<i>ftsZ</i>
195	Sangue	<i>ftsZ</i>	380	Cultura líquida	<i>ftsZ</i>
197	Sangue	<i>ftsZ</i>	387	Cultura líquida	<i>gltA</i>
203	Sangue	<i>ftsZ</i>	388	Cultura líquida	<i>gltA</i>
207	Sangue	<i>gltA</i>	393	Cultura líquida	<i>ftsZ</i>
221	Cultura líquida	<i>ftsZ</i>	398	Cultura líquida	<i>ITS e gltA</i>
228	Sangue	<i>gltA</i>	400	Cultura líquida	<i>gltA</i>
231	Cultura líquida	<i>gltA</i>	401	Cultura líquida	<i>ITS e gltA</i>
232	Cultura líquida	<i>gltA</i>	403	Cultura líquida	<i>gltA</i>
263	Cultura líquida	<i>ftsZ</i>	404	Cultura líquida	<i>gltA</i>
277	Cultura líquida	<i>gltA</i>	408	Cultura líquida	<i>gltA</i>
282	Cultura líquida	<i>ftsZ</i>	409	Cultura líquida	<i>gltA</i>
288	Cultura líquida	<i>ftsZ</i>	423	Cultura líquida	<i>ftsZ</i>
290	Sangue	<i>ftsZ</i>	474	Cultura líquida	<i>ftsZ</i>
294	Sangue	<i>ftsZ</i>	482	Sangue	<i>ITS e gltA</i>
295	Cultura líquida	<i>ftsZ</i>	485	Sangue	<i>ITS</i>
297	Cultura líquida	<i>ftsZ</i>	496	Sangue	<i>ITS</i>
299	Sangue	<i>ftsZ</i>	498	Sangue	<i>ITS</i>

Quadro 11. Número de acesso do GenBank® para cada região sequenciada

Região	Definição	Acesso
<i>gltA</i>	Bartonella henselae strain BR_LHR human 346 citrate synthase (<i>gltA</i>)	KT945243.1
<i>ftsZ</i>	Bartonella henselae strain BM1374163 complete genome	HG965802.1
<i>ITS</i>	Bartonella henselae strain Houston1 complete genome	BX897699.1

Foi possível amplificar uma cópia de *B. henselae* em pelo menos uma das muitas reações realizadas em cada técnica de PCR realizada no projeto. Apesar disso, a sensibilidade de cada ensaio, que é o padrão utilizado para validar a reação e que refere-se ao número de cópias que foi amplificado em todas as reações, foi de 50 cópias de DNA nas PCR convencionais, 20 cópias na PCR em tempo real e de 10 cópias na PCR *nested*. A partir desses dados é possível, hipoteticamente, calcular a quantidade de cópias genômicas de bactéria necessária para que haja a detecção pelos métodos descritos neste trabalho considerando: 1) a sensibilidade de cada reação, 2) a quantidade utilizada em cada etapa do diagnóstico (extração/PCR) e 3) o efeito de diluição (no caso da cultura líquida) (Tabela 1).

Tabela 1. Quantidade inicial de cópias de DNA de *Bartonella* sp. por mL de sangue para amplificação

Cópias/mL na amostra inicial de sangue	Cultura líquida			Sangue		
	PCR conv.	PCR em tempo real	PCR <i>nested</i>	PCR Conv.	PCR em tempo real	PCR <i>nested</i>
abaixo de 2.000	-	-	-	-	-	-
de 2.001 a 4.999	-	+	+	-	+	+
acima de 5.000	+	+	+	+	+	+

“+”: PCR positiva “-”: PCR negative

4.3. Análise estatística

A primeira análise estatística foi realizada para determinar a melhor amostra (sangue ou cultura líquida) a ser utilizada independente do tipo de PCR. Considerou-se como padrão-ouro o resultado final de “qualquer PCR positiva”. Os dados mostram que as reações realizadas na cultura líquida foram significativamente mais eficazes em detectar DNA de *Bartonella* sp. que aquelas realizadas no sangue ($p < 0,0001$, teste de McNemar-Bowker). A cultura líquida também se mostrou melhor em relação ao valor preditivo negativo e à razão de probabilidade negativa (Tabela 2 e Figura 7).

Tabela 2. Análise estatística dos resultados de amostra de sangue *versus* amostra de cultura líquida (considerando “qualquer PCR positiva” como padrão-ouro)

	Sangue	Cultura líquida
Sensibilidade	29,4% (IC: 21,4 – 38,9)	75,5% (IC: 66,3 – 82,8)
Especificidade	100,0% (IC: 99,0 – 100,0)	100,0% (IC: 99,0 – 100,0)
Valor preditivo positivo	100,0% (IC: 88,6 – 100,0)	100,0% (IC: 95,2 – 100,0)
Valor preditivo negativo	84,7% (IC: 81,1 – 87,7)	94,1% (IC: 91,4 – 96,0)
Razão de probabilidade positiva	*	*
Razão de probabilidade negativa	0,706 (IC: 0,623 – 0,800)	0,245 (IC: 0,174 – 0,345)

* Não pode ser calculado porque a especificidade é de 100%.
IC: Intervalo de confiança

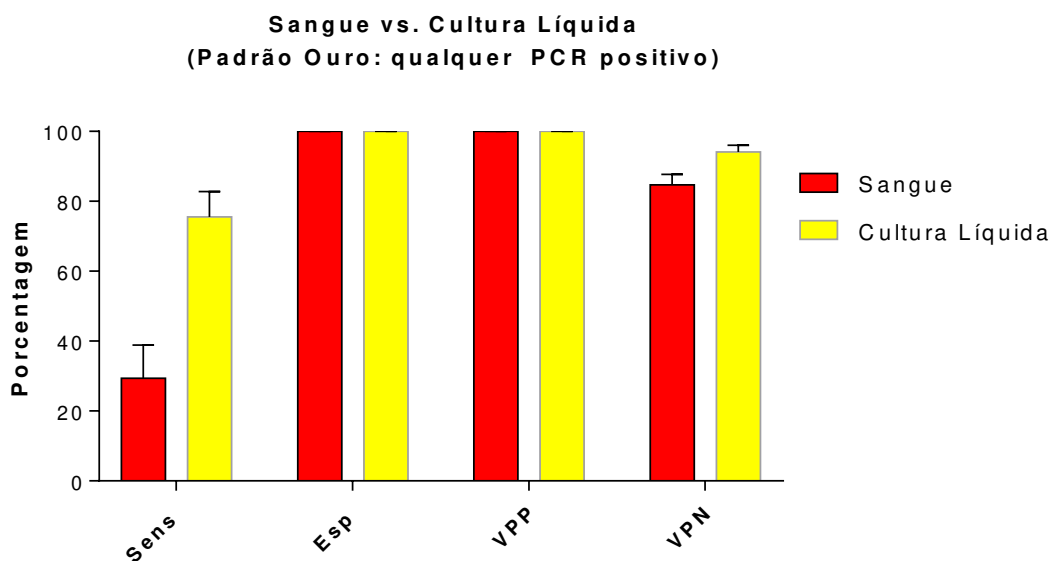


Figura 7. Comparação entre resultados obtidos ao analisar amostra de sangue *versus* amostra de cultura líquida (considerando “qualquer PCR positiva” como padrão-ouro) (Sens: sensibilidade; Esp: Especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.).

Foi realizada análise bayesiana LCM para determinar qual seria o melhor tipo de PCR a ser realizada em amostras de sangue, em amostras de cultura líquida e depois combinando os resultados de sangue e cultura líquida, todas utilizando “qualquer PCR positiva” como padrão-ouro. Para estas análises não foram utilizados os resultados da PCR convencional para a região

ITS por ser a única reação que o alvo era o gênero *Bartonella*, em todos os outros o alvo foi *B. henselae*. Os resultados apresentados nas tabelas 3 e 4 e nas figuras 8 e 9 referem-se a amostras de sangue.

Tabela 3. Análise estatística bayesiana comparando os resultados de três ensaios de PCR para *B. henselae* distintos a partir de amostras de sangue

	PCR convencional (<i>gltA</i>)	PCR em tempo real (<i>gltA</i>)	PCR <i>nested</i> (<i>ftsZ</i>)
Sensibilidade	32,8 (IC: 7,6 – 79,6)	87,1 (IC: 34,1 – 100,0)	57,8 (IC: 21,6 – 96,5)
Especificidade	99,8 (IC: 99,0 – 100,0)	98,8 (IC: 97,2 – 100,0)	97,8 (IC: 96,2 – 99,4)
Valor preditivo positivo	77,1 (IC: 27,5 – 99,8)	56,3 (IC: 19,5 – 99,6)	33,7 (IC: 11,3 – 83,2)
Valor preditivo negativo	98,7 (IC: 95,1 – 99,8)	99,8 (IC: 96,7 – 100,0)	99,2 (IC: 96,3 – 100,0)

IC: Intervalo de confiança

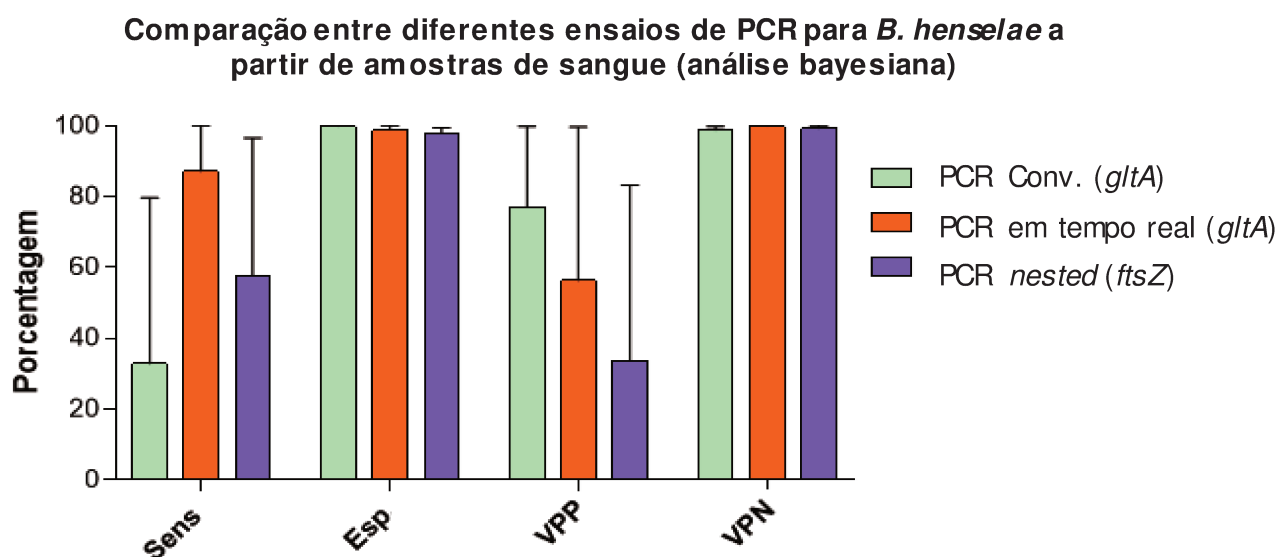


Figura 8. Comparação entre diferentes ensaios de PCR para *B. henselae* a partir de amostras de sangue. (Sens: sensibilidade; Esp: Especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.)

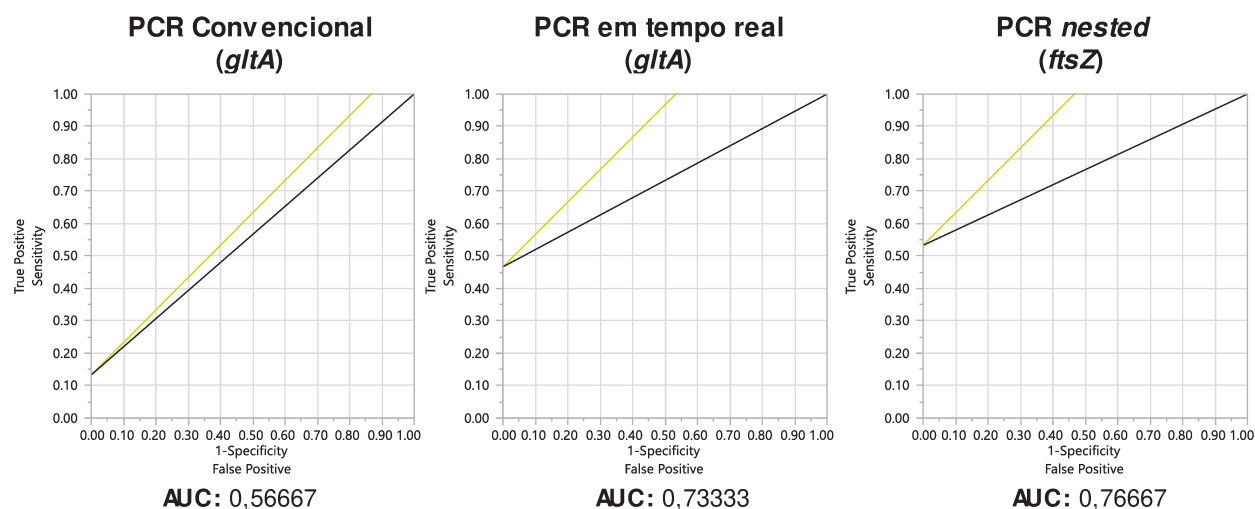


Figura 9. Gráfico ROC gerado dos resultados dos diferentes ensaios de PCR para *B. henselae* a partir de amostras de sangue e considerando “qualquer PCR positiva” como padrão-ouro. AUC: *Area under the curve*.

Na figura 9 é possível observar que a AUC da PCR *nested* é maior que a AUC da PCR em tempo real, ou seja, a PCR *nested* tem um poder diagnóstico discriminante maior para amostras de sangue.

Como é possível verificar na tabela 4, quando testadas as amostras de sangue, não há diferença na concordância de resultados entre a PCR *nested* (*ftsZ*) e a PCR em tempo real (*gltA*) (Teste de McNemar-Bowker, $p > 0,05$).

Tabela 4. Comparação da concordância de resultados entre cada tipo de PCR a partir das amostras de sangue, pelo teste de McNemar-Bowker ($p < 0,05$).

Técnica	PCR convencional (<i>gltA</i>)	PCR <i>nested</i> (<i>ftsZ</i>)	PCR em tempo real (<i>gltA</i>)
PCR convencional (<i>gltA</i>)	-	0,0027	0,0039
PCR <i>nested</i> (<i>ftsZ</i>)		-	0,6547
PCR em tempo real (<i>gltA</i>)			-

Os resultados apresentados a seguir nas tabelas 5 e 6 e nas figuras 10 e 11 referem-se à comparação dos resultados dos ensaios de PCR em amostras de cultura líquida (análise bayesiana LCM) considerando “qualquer PCR positiva” como padrão-ouro.

Tabela 5. Análise estatística bayesiana comparando os resultados de três reações distintas para amostras de cultura líquida

	PCR Convencional (<i>gltA</i>)	PCR em tempo real (<i>gltA</i>)	PCR <i>nested</i> (<i>ftsZ</i>)
Sensibilidade	64,2 (IC: 38,7 – 88,5)	97,5 (IC: 76,2 – 100,0)	92,1 (IC: 66,8 – 99,9)
Especificidade	99,5 (IC: 98,6 – 99,9)	91,2 (IC: 88,2 – 93,7)	97,0 (IC: 95,1 – 98,5)
Valor preditivo positivo	83,2 (IC: 58,0 – 97,5)	29,3 (IC: 17,2 – 43,5)	53,7 (IC: 33,0 – 73,6)
Valor preditivo negativo	98,7 (IC: 96,9 – 99,7)	99,9 (IC: 98,8 – 100,0)	99,7 (IC: 98,4 – 100,0)

IC: Intervalo de confiança

Comparação entre diferentes ensaios de PCR para *B. henselae* a partir de amostras de cultura líquida (análise bayesiana)

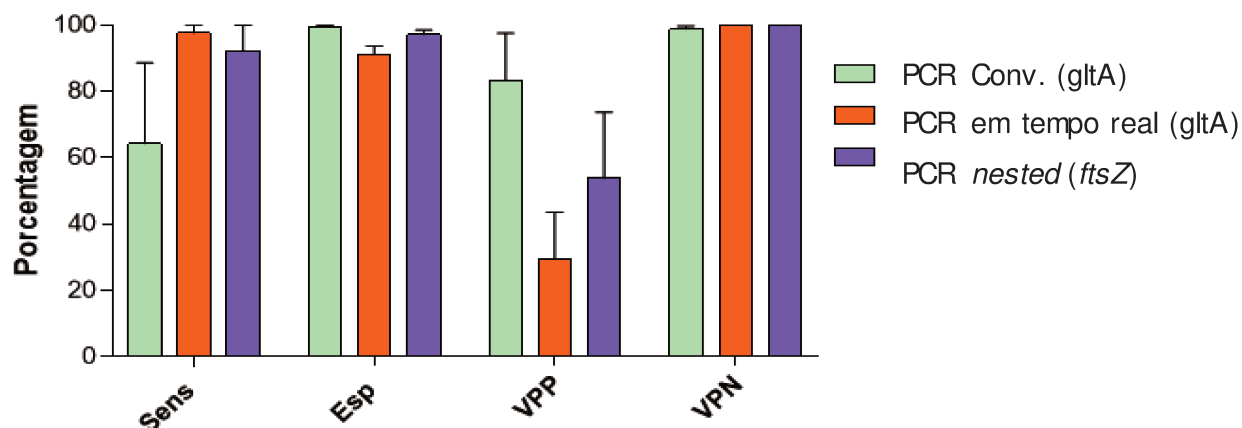


Figura 10. Comparação entre diferentes ensaios de PCR para *B. henselae* a partir de amostras de cultura líquida. (Sens: sensibilidade; Esp: Especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.)

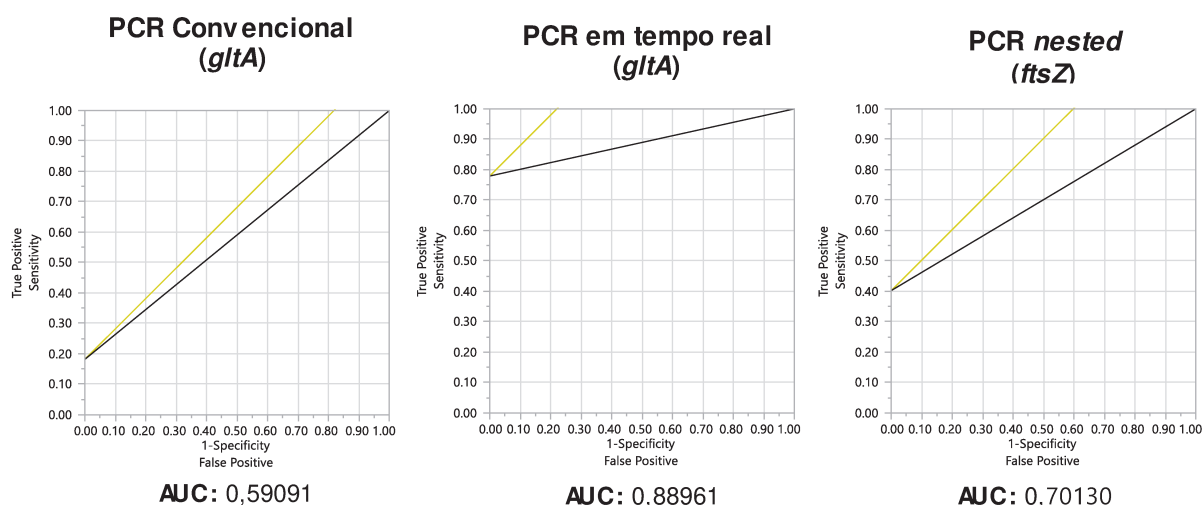


Figura 11. Gráfico ROC gerado a partir dos resultados de amostras de cultura líquida e considerando “qualquer PCR positiva” como padrão-ouro. AUC: Area under the curve.

Na figura 11 é possível observar que a AUC da PCR em tempo real é maior que a AUC das outras PCR, ou seja, a PCR em tempo real tem um poder diagnóstico discriminatório maior para amostras de cultura líquida.

Como é possível verificar na tabela 6, quando testado a cultura líquida, não houve concordância dos resultados de cada técnica sugerindo que a sensibilidade é diferente entre elas (Teste de McNemar-Bowker, $p < 0,05$).

Tabela 6. Comparação da concordância de resultados entre cada tipo de PCR a partir das amostras de cultura líquida, pelo teste de McNemar-Bowker ($p < 0,05$).

Técnica	PCR convencional (<i>gltA</i>)	PCR <i>nested</i> (<i>ftsZ</i>)	PCR em tempo real (<i>gltA</i>)
PCR convencional (<i>gltA</i>)	-	0,0004	<0,0001
PCR <i>nested</i> (<i>ftsZ</i>)		-	<0,0001
PCR em tempo real (<i>gltA</i>)			-

Os resultados apresentados a seguir na tabela 7 e figura 12 referem-se a comparação dos resultados dos ensaios de PCR combinando cultura líquida e sangue (teste bayesiano LCM).

Tabela 7. Análise estatística bayesiana *Latent Class Model* comparando os resultados de três ensaios de PCR distintos para *B. henselae* em amostras de sangue e cultura líquida combinadas.

	PCR Convencional (<i>gltA</i>)	PCR em tempo real (<i>gltA</i>)	PCR <i>nested</i> (<i>ftsZ</i>)
Sensibilidade	64,8 (IC: 41,3 – 90,1)	98,1 (IC: 81,9 – 100,0)	94,8 (IC: 72,3 – 100,0)
Especificidade	99,3 (IC: 98,2 – 99,8)	89,5 (IC: 86,4 – 92,3)	94,5 (IC: 92,2 – 96,5)
Valor preditivo positivo	80,3 (IC: 57,0 – 95,1)	30,4 (IC: 18,4 – 43,7)	44,8 (IC: 27,5 – 61,2)
Valor preditivo negativo	98,4 (IC: 96,4 – 99,6)	99,9 (IC: 98,9 – 100,0)	99,8 (IC: 98,3 – 100,0)

IC: Intervalo de confiança

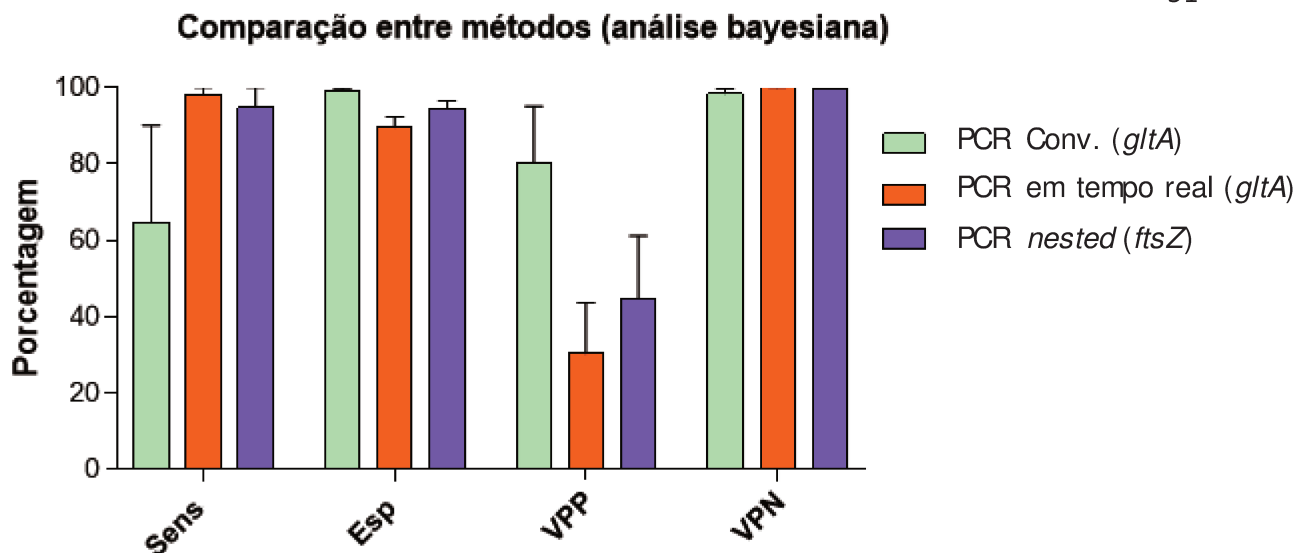


Figura 12. Representação gráfica da comparação dos resultados das PCR combinando sangue e cultura líquida. (Sens: sensibilidade; Esp: Especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.)

Os resultados apresentados a seguir na tabela 8 e 9 referem-se a comparação dos resultados dos ensaios de PCR independente da amostra testada (cultura líquida ou sangue).

Tabela 8. Análise estatística bayesiana *Latent Class Model* comparando os resultados de três ensaios de PCR distintos para *B. henselae* independente da amostra testada (sangue ou cultura líquida), considerando “qualquer PCR positiva” como padrão-ouro.

	PCR Convencional (<i>gltA</i>)	PCR em tempo real (<i>gltA</i>)	PCR <i>nested</i> (<i>ftsZ</i>)
Sensibilidade	17,6 (IC: 11,5 – 26,2)	70,6 (IC: 61,1 – 78,6)	46,1 (IC: 36,7 – 55,7)
Especificidade	100,0 (IC: 99,0 – 100,0)	100,0 (IC: 99,0 – 100,0)	100,0 (IC: 99,0 – 100,0)
Valor preditivo positivo	100,0 (IC: 82,4 – 100,0)	100,0 (IC: 94,9 – 100,0)	100,0 (IC: 92,4 – 100,0)
Valor preditivo negativo	82,6 (IC: 78,9 – 85,7)	93,0 (IC: 90,2 – 95,0)	87,9 (IC: 94,5 – 90,6)

IC: Intervalo de confiança

Tabela 9. Comparação da concordância entre cada tipo de PCR, independente da amostra testada (sangue ou cultura líquida), pelo teste de McNemar-Bowker.

Técnica	PCR convencional (<i>gltA</i>)	PCR <i>nested</i> (<i>ftsZ</i>)	PCR em tempo real (<i>gltA</i>)
PCR convencional (<i>gltA</i>)	-	<0,0001	<0,0001
PCR <i>nested</i> (<i>ftsZ</i>)		-	0,003
PCR em tempo real (<i>gltA</i>)			-

A partir dos resultados obtidos com a análise estatística é possível concluir que a PCR convencional baseada na região *gltA* é a menos eficiente para detectar DNA de *Bartonella* sp.. A PCR em tempo real (*gltA*) é o melhor teste para cultura líquida enquanto que, para o sangue, não há diferença na sensibilidade entre a PCR *nested* e a PCR em tempo real (*gltA*). Isso se deve ao fato de que os intervalos de confiança da sensibilidade se sobrepõem.

Utilizando os resultados da análise estatística também foi possível determinar um fluxograma para a decisão do melhor diagnóstico molecular usando todos os testes para *B. henselae* tanto para sangue quanto para cultura. Utilizou-se como padrão-ouro “qualquer PCR positivo” (Figura 13).

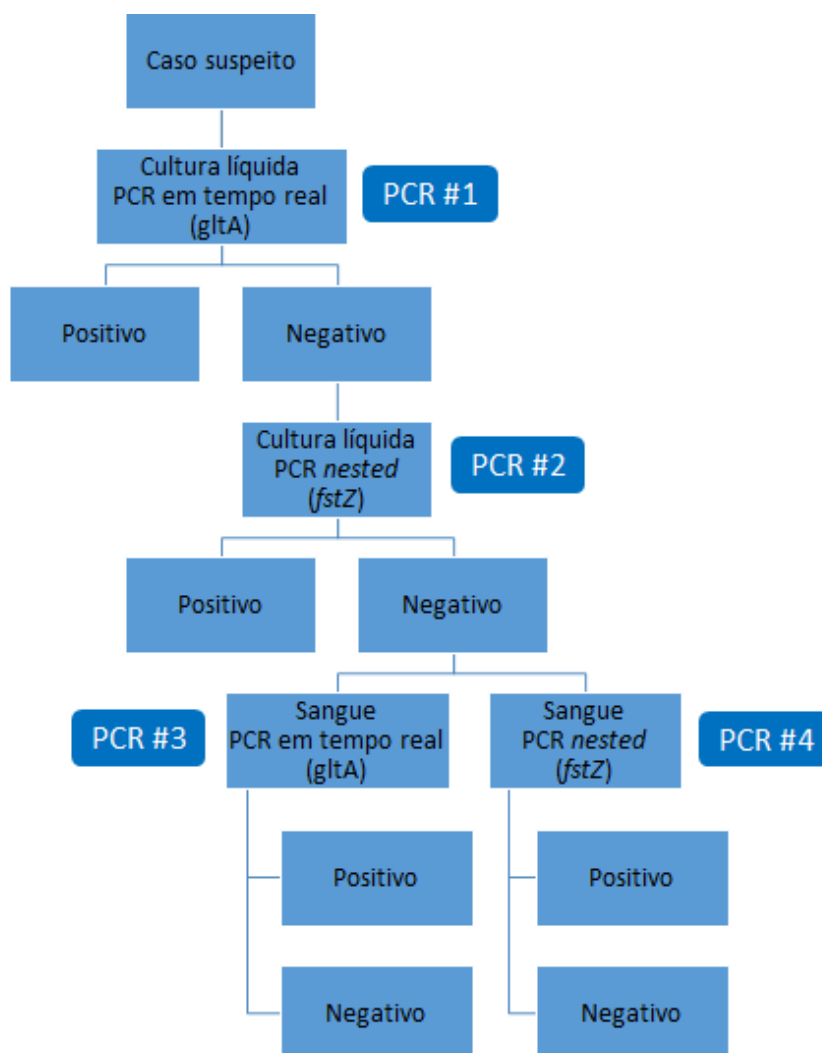


Figura 13. Matriz geral de decisão para o diagnóstico molecular usando todos os testes para *B. henselae* tanto para sangue quanto para cultura . Utilizou-se como padrão-ouro “qualquer PCR positivo”.

4.4. Comparação com os resultados do projeto anterior

No projeto anterior, realizado em 2010, foram positivos 16 doadores (41). Destes, apenas três amostras foram novamente positivas nas PCR realizadas no presente estudo e somente uma que foi isolada anteriormente foi novamente positiva no PCR em tempo real (Quadro 10).

Quadro 10. Amostras positivas no estudo anterior com doadores de sangue e resultados obtidos no estudo atual

Doador	Amostra positiva (estudo anterior)	Resultado PCR do estudo atual			
		Conv. <i>ITS</i>	Conv. <i>gltA</i>	<i>Nested</i>	Tempo em tempo real
108	CL/Isolado				
176	Isolado				
234	Isolado				
240	Isolado				+ CL
256	Isolado				
487	Isolado				
97	CL				
227	CL				
261	CL		+ CL	+ CL	+ CL
271	CL				
294	CL		+ Sg	+ Sg	+ Sg
361	CL				
378	CL				
410	CL				
417	CL				
426	CL				

(CL: Cultura líquida; Sg: sangue total)

5. Discussão

O caso clínico apresentado na Introdução mostra que as variáveis estudadas a partir das amostras de doadores de sangue têm nítida repercussão na prática clínica. A infecção por agentes fastidiosos torna difícil o isolamento dos mesmos. A baixa bacteremia típica de bactérias gram-negativas e a característica de infecção cíclica das *Bartonella* spp. são elementos que dificultam ainda mais o diagnóstico das bartoneloses. Somam-se a isto, características metodológicas ora estudadas.

Considerando os resultados de todas as PCR deste projeto, foram positivos 20,4% dos doadores (102/500). Ao confrontar estes dados com a literatura científica, nota-se que a prevalência encontrada neste estudo é alta. Como é possível verificar no quadro 2, apresentado na página 24, não existiam muitos estudos com humanos assintomáticos, ainda mais com a utilização de vários testes moleculares combinados e com um número tão grande de amostras.

Como é possível observar no quadro 3, apresentado na página 25, são poucos os estudos moleculares para a detecção de *Bartonella* spp. com um número considerável de amostras em humanos. A realização sistemática de diferentes técnicas de PCR com alvo em diferentes regiões gênicas era inexistente.

Ao reanalisarem-se as amostras dos 500 hemodoadores foi possível comparar os resultados positivos obtidos de alíquotas de sangue total e de cultura líquida. Houve menor detecção nas reações realizadas pelo DNA extraído diretamente do sangue (6% ou 30/500), quando comparada com cultura líquida (15,4% ou 77/500). No teste de McNemar-Bowker a cultura líquida apresentou melhor sensibilidade e valor preditivo negativo quando comparado ao sangue. Isto pode ser explicado pelo fato de que o diagnóstico realizado diretamente do sangue ser menos eficaz do que o realizado após cultura líquida de enriquecimento (69). As amostras são provenientes de doadores de sangue assintomáticos e que, portanto, devem possuir baixa bacteremia, ou seja, estão abaixo do nível de detecção do teste diagnóstico. Após a cultura líquida de enriquecimento, há possível multiplicação das bactérias cujo número fica acima deste limite de detecção. Estima-se que em

humanos imunocompetentes a bacteremia causada por *Bartonella* sp. seja de 1-10 cópias genômicas/ μ L (ou seja, 1.000-10.000 cópias/mL) (13). Fica fácil reconhecer a real possibilidade de falsos negativos, como observado no relato de caso descrito na introdução em que todos os testes no sangue foram negativos e a confirmação laboratorial só foi possível na PCR *nested* da cultura líquida.

Vinte e cinco amostras foram positivas no DNA extraído diretamente do sangue, mas negativas quando testadas na cultura líquida. Isto pode ser explicado pelo “efeito de diluição” (79). Não houve aumento de quantidade de bactérias na cultura e houve diluição em um grande volume de meio de cultura, ficando a concentração de bactérias na amostra abaixo do nível de detecção do teste indicando a amplificação de bactéria não viável. A característica fastidiosa da bactéria somado ao fato da presença de inibidores de crescimento (como o uso de antimicrobianos, mesmo que eventualmente utilizados como anti-inflamatórios, como acontece com a sulfona, hidroxicloroquina, etc) tornam esta hipótese ainda mais provável.

Vários relatos de casos (35, 40, 102) e o trabalho realizado anteriormente com amostras de sangue de gatos (103) mostram que a combinação de PCR diferentes e de amostras diferentes aumentam a chances de detecção do patógeno. Os resultados deste estudo corroboram com a literatura ao mostrar a necessidade de combinação de vários testes diagnósticos para evitar falsos negativos.

A divergência dos resultados dos dois estudos realizados a partir da amostra dos 500 doadores de sangue (quadro 10) demonstram a dificuldade de diagnosticar laboratorialmente a infecção por *Bartonella* spp., uma vez que as amostras das quais foram obtidos isolados anteriormente supostamente deveriam ter tido reações positivas, o que não aconteceu na maioria das amostras. No primeiro estudo, foi realizada uma única reação de PCR convencional para a região *ITS*, gênero específica, a partir do DNA extraído da cultura líquida. Vários fatores podem explicar esta discordância. Entre eles, a baixa bacteremia (1-10 cópias genômicas/ μ L) particularmente por se tratar de portadores assintomáticos. Portanto, deve existir pouca quantidade de DNA do

patógeno, próximo do limite de detecção. Na alíquota utilizada para fazer a reação pode não haver a quantidade necessária para amplificação (Figura 14).

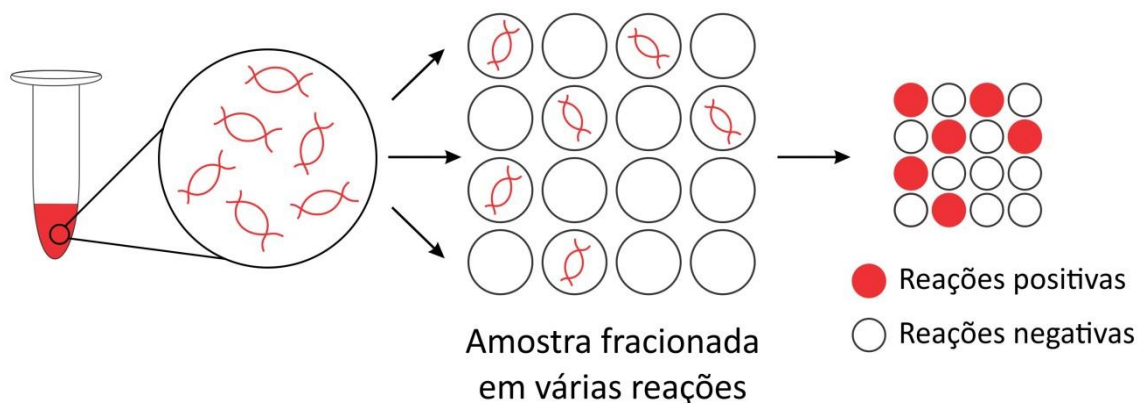


Figura 14. Representação gráfica da variação da quantidade de DNA em múltiplas reações de PCR

Também há o fato de uma variação estocástica (aleatória) do processo de amplificação por PCR na análise de baixas quantidades de DNA. Os efeitos estocásticos são manifestos como uma flutuação de resultados entre análises replicadas (79). Por isto, mesmo a combinação de várias técnicas não evita resultados falso-negativos. Na pesquisa realizada anteriormente a partir das mesmas amostras, o DNA de *Bartonella* spp. foi detectado em apenas 3,2% (16/500) das amostras de cultura líquida utilizando-se PCR convencional, sendo que em seis destas foi possível obter isolado em cultura sólida (41).

Edouard *et al.* defendem que, para se firmar o diagnóstico de bartonelose usando apenas a técnica de PCR, deve-se considerar positivas apenas as amostras que tiveram o DNA de *Bartonella* spp. detectado para, pelo menos, duas regiões genômicas diferentes (67). Neste caso, reduz-se a possibilidade de falsos positivos e, conseqüentemente, aumenta-se a especificidade, mas perde-se em sensibilidade.

Ainda que se considere o critério acima, 35 amostras foram positivas no presente estudo para reações de duas regiões genômicas distintas (7%). Se forem somadas também as seis amostras das quais se obteve isolados no estudo anterior, o que é padrão-ouro para diagnóstico microbiológico (nenhuma delas cumpriu o critério de duas regiões distintas positivas no estudo atual), seriam 41 amostras positivas (8,2%).

No caso do diagnóstico de bartonelose, por se tratar de doença causada por bactérias fastidiosas e responsáveis por bacteremia baixa, não seria aconselhável utilizar o critério de positividade para duas regiões gênicas distintas para confirmação do diagnóstico. Sendo assim, somando-se todos os positivos obtidos nos dois projetos, 115 doadores tiveram o DNA de *Bartonella* sp. detectado, o que corresponde a 23%.

Ao analisar a matriz geral de decisão diagnóstica (Figura 13) observa-se que estatisticamente a primeira amostra que deveria ser testada seria a cultura líquida. Porém, a cultura líquida tem uma incubação de 10 dias e, portanto, não é adequada para a decisão diagnóstica de pacientes sintomáticos. Embora a possibilidade de um positivo em amostra extraída diretamente do sangue seja baixa, este tem sido no laboratório o primeiro teste a ser realizado levando-se em conta o tempo do diagnóstico.

As cinco manifestações mais descritas relacionadas a *Bartonella* spp. (DAG, angiomatose bacilar, peliose bacilar, endocardite cultura negativa e febre de origem indeterminada) (109, 110) são inquestionáveis e por si só já justificariam maiores investimentos nas pesquisas deste gênero.

Como se pode notar o diagnóstico laboratorial de *Bartonella* sp. é um desafio por vários motivos: primeiro pela característica fastidiosa da bactéria que dificulta o seu cultivo laboratorial, segundo pelo fato de provocar bacteremia cíclica e baixa e por último a inexistência de testes específicos e sensíveis para o seu diagnóstico. Há a necessidade da combinação de métodos para reduzir falso-negativos.

6. Conclusões

Mais de um quinto dos doadores de sangue tiveram pelo menos uma PCR positiva entre as oito reações moleculares realizadas (quatro no sangue total e quatro na cultura líquida. Sete por cento tiveram PCR positivas para duas ou mais regiões distintas.

A PCR em tempo real foi padronizada para *B. henselae* e se mostrou sensível, sendo o melhor teste a ser realizado em cultura líquida. Neste teste obtiveram-se 14 amostras positivas no sangue e 60 na cultura líquida.

Na PCR *nested* (região *ftsZ* específica para *B. henselae*) foram positivas 16 amostras do DNA extraído de sangue total e 31 amostras do DNA extraído de cultura líquida. A análise estatística mostrou que não há diferença de concordância dos resultados obtidos nesta técnica quando comparado com os resultados da PCR em tempo real para amostras de sangue.

Na PCR convencional para a região *ITS* específica para gênero *Bartonella* foram positivas oito amostras tanto de sangue como de cultura líquida, sendo este o teste com o menor número de positivos. Os resultados deste ensaio de PCR não foram inseridos na análise estatística da análise bayesiana por ser a única reação para o gênero *Bartonella*, enquanto as outras foram específicas para *B. henselae*.

Já na PCR convencional para a região *gltA* específica para *B. henselae* foram positivas quatro amostras de sangue e 14 de cultura líquida. A análise estatística mostrou que esta reação foi a menos eficiente na detecção de DNA de *Bartonella* sp..

A análise estatística realizada utilizando todos os resultados de sangue e cultura líquida mostrou que, independente da amostra testada, a sensibilidade é diferente entre os tipos de PCR (convencional, *nested* e em tempo real) e para os diferentes alvos de regiões gênicas.

O uso dos três diferentes ensaios de PCR em dois tipos de amostras (sangue e cultura líquida) aumentou a possibilidade de detecção de *Bartonella*

sp. uma vez que no projeto anterior foram positivos 3,2% dos doadores de sangue e neste projeto essa porcentagem subiu para 20,4%. Apesar disso, a combinação de técnicas não evitou resultados falso-negativos uma vez que 13 doadores que foram positivos no projeto anterior não foram positivos novamente.

Considerando os dois estudos, em 23% dos doadores foi possível detectar DNA de *Bartonella* sp..

O uso de cultura líquida combinado a vários testes moleculares aumentam a possibilidade de detectar o DNA da bactéria.

Esforços devem ser feitos para a melhoria dos métodos de diagnóstico com sensibilidade suficiente para excluir a infecção por *Bartonella* spp. em doadores de sangue e para proteger os receptores de transfusões sanguíneas. Os resultados apresentados estabelecem a necessidade de uma reavaliação por autoridades de saúde pública dos riscos e do impacto da transmissão de *Bartonella* spp. por meio de transfusões sanguíneas, especialmente para os pacientes imunodeficientes. A baixa bacteremia e a característica fastidiosa da bactéria são desafios ao diagnóstico laboratorial.

7. Referências

1. Rolain JM, Brouqui P, Koehler JE, Maguina C, Dolan MJ, Raoult D. Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(6):1921-33.
2. Lynch T, Iverson J, Kosoy M. Combining culture techniques for *Bartonella*: the best of both worlds. *J Clin Microbiol*. 2011;49(4):1363-8.
3. Maggi RG, Harms CA, Hohn AA, Pabst DA, McLellan WA, Walton WJ, et al. *Bartonella henselae* in porpoise blood. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(12):1894-8.
4. Pulliainen AT, Dehio C. Persistence of *Bartonella* spp. stealth pathogens: from subclinical infections to vasoproliferative tumor formation. *FEMS microbiology reviews*. 2012.
5. Okaro U, Addisu A, Casanas B, Anderson B. *Bartonella* Species, an Emerging Cause of Blood-Culture-Negative Endocarditis. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30(3):709-46.
6. Billeter SA, Levy MG, Chomel BB, Breitschwerdt EB. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Med Vet Entomol*. 2008;22(1):1-15.
7. Breitschwerdt EB. Bartonellosis, One Health and all creatures great and small. *Vet Dermatol*. 2017;28(1):96-e21.
8. Abbott RC, Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, Kikuchi Y, Koehler JE, et al. Experimental and natural infection with *Bartonella henselae* in domestic cats. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1997;20(1):41-51.
9. Schultz MG. A history of bartonellosis (Carrion's disease). *Am J Trop Med Hyg*. 1968;17(4):503-15.
10. 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(4):607-11.
11. Dehio C. Molecular and cellular basis of bartonella pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*. 2004;58:365-90.
12. Guptill L. Bartonellosis. *Vet Microbiol*. 2010;140(3-4):347-59.
13. Breitschwerdt EB, Maggi RG, Chomel BB, Lappin MR. Bartonellosis: an emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings. *J Vet Emerg Crit Care*. 2010;20(1):8-30.
14. Schwartzman W. Bartonella (Rochalimaea) infections: beyond cat scratch. *Annu Rev Med*. 1996;47:355-64.
15. Breitschwerdt EB. Bartonellosis: one health perspectives for an emerging infectious disease. *Ilar j*. 2014;55(1):46-58.
16. Kaiser PO, Riess T, O'Rourke F, Linke D, Kempf VA. *Bartonella* spp.: throwing light on uncommon human infections. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2011;301(1):7-15.
17. Velho PENF, Souza EM, Cintra ML, Mariotto A, Moraes AM. Angiomatose bacilar: revisão da literatura e documentação iconográfica. *An Bras Dermatol*. 2003;78(5):601-9.
18. Harms A, Dehio C. Intruders below the radar: molecular pathogenesis of *Bartonella* spp. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(1):42-78.
19. Greub G, Raoult D. *Bartonella*: new explanations for old diseases. *J Med Microbiol*. 2002;51(11):915-23.
20. Raoult D, Casalta JP, Richet H, Khan M, Bernit E, Rovey C, et al. Contribution of systematic serological testing in diagnosis of infective endocarditis. *J Clin Microbiol*. 2005;43(10):5238-42.
21. Regnery RL, Anderson BE, Clarridge JE, 3rd, Rodriguez-Barradas MC, Jones DC, Carr JH. Characterization of a novel Rochalimaea species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. *J Clin Microbiol*. 1992;30(2):265-74.

22. Boulouis HJ, Chang CC, Henn JB, Kasten RW, Chomel BB. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet Res.* 2005;36(3):383-410.
23. Anderson BE, Neuman MA. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(2):203-19.
24. Mosbacher ME, Klotz S, Klotz J, Pinnas JL. *Bartonella henselae* and the potential for arthropod vector-borne transmission. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011;11(5):471-7.
25. Kalogeropoulos C, Koumpoulis I, Mentis A, Pappa C, Zafeiropoulos P, Aspiotis M. *Bartonella* and intraocular inflammation: a series of cases and review of literature. *Clin Ophthalmol.* 2011;5:817-29.
26. Velho PENF, Souza EM, Cintra ML, Moraes AM, Uthida-Tanaka AM. Diagnosis of *Bartonella* spp. infection: study of a bacillary angiomatosis case. *An Bras Dermatol.* 2006;81(4):349-53.
27. Dehio C. *Bartonella*-host-cell interactions and vascular tumour formation. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(8):621-31.
28. Tsukahara M, Tsuneoka H, Iino H, Murano I, Takahashi H, Uchida M. *Bartonella henselae* infection as a cause of fever of unknown origin. *J Clin Microbiol.* 2000;38(5):1990-1.
29. Jacobs RF, Schutze GE. *Bartonella henselae* as a cause of prolonged fever and fever of unknown origin in children. *Clin Infect Dis.* 1998;26(1):80-4.
30. Chomel BB, Kasten RW. Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. *J Appl Microbiol.* 2010;109(3):743-50.
31. Lin EY, Tsigrelis C, Baddour LM, Lepidi H, Rolain JM, Patel R, et al. *Candidatus Bartonella mayotimonensis* and endocarditis. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(3):500-3.
32. Maggi RG, Kosoy M, Mintzer M, Breitschwerdt EB. Isolation of *Candidatus Bartonella melophagi* from human blood. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(1):66-8.
33. Mullins KE, Hang J, Jiang J, Leguia M, Kasper MR, Maguiña C, et al. Molecular typing of "*Candidatus Bartonella ancashi*," a new human pathogen causing verruga peruana. *J Clin Microbiol.* 2013;51(11):3865-8.
34. Sanogo YO, Zeaiter Z, Caruso G, Merola F, Shpynov S, Brouqui P, et al. *Bartonella henselae* in Ixodes ricinus ticks (Acari: Ixodida) removed from humans, Belluno province, Italy. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(3):329-32.
35. Breitschwerdt EB, Maggi RG, Cadenas MB, Diniz PP. A Groundhog, a Novel *Bartonella* Sequence, and My Father's Death. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(12):2080-6.
36. Chomel BB, Boulouis HJ, Maruyama S, Breitschwerdt EB. *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(3):389-94.
37. Mogollon-Pasapera E, Otvos L, Jr., Giordano A, Cassone M. *Bartonella*: emerging pathogen or emerging awareness? *Int J Infect Dis.* 2009;13(1):3-8.
38. Berghoff J, Viezens J, Guptill L, Fabbi M, Arvand M. *Bartonella henselae* exists as a mosaic of different genetic variants in the infected host. *Microbiology.* 2007;153(Pt 7):2045-51.
39. Diniz PP, Maggi RG, Schwartz DS, Cadenas MB, Bradley JM, Hegarty B, et al. Canine bartonellosis: serological and molecular prevalence in Brazil and evidence of co-infection with *Bartonella henselae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*. *Vet Res.* 2007;38(5):697-710.
40. Velho PE, Pimentel V, Del Negro GM, Okay TS, Diniz PP, Breitschwerdt EB. Severe anemia, panseritis, and cryptogenic hepatitis in an HIV patient infected with *Bartonella henselae*. *Ultrastruct Pathol.* 2007;31(6):373-7.
41. Pitassi LH, de Paiva Diniz PP, Scorpio DG, Drummond MR, Lania BG, Barjas-Castro ML, et al. *Bartonella* spp. bacteremia in blood donors from Campinas, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(1):e0003467.
42. Janecek E, Mietze A, Goethe R, Schnieder T, Strube C. *Bartonella* spp. infection rate and *B. grahamii* in ticks. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(10):1689-90.
43. WHO. Fourth WHO report on neglected tropical diseases. 2017. p. 267.

44. Reis C, Cote M, Le Rhun D, Lecuelle B, Levin ML, Vayssier-Taussat M, et al. Vector competence of the tick *Ixodes ricinus* for transmission of *Bartonella birtlesii*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(5):e1186.
45. Tsai YL, Chang CC, Chuang ST, Chomel BB. *Bartonella* species and their ectoparasites: selective host adaptation or strain selection between the vector and the mammalian host? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2011;34(4):299-314.
46. Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB, Kasten RW, Vayssier-Taussat M, Birtles RJ, et al. Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. *Vet Res*. 2009;40(2):29.
47. Van Audenhove A, Verhoef G, Peetermans WE, Boogaerts M, Vandenberghe P. Autoimmune haemolytic anaemia triggered by *Bartonella henselae* infection: a case report. *Br J Haematol*. 2001;115(4):924-5.
48. Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins K, Chi B, Yamamoto K, Roberts-Wilson J, et al. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J Clin Microbiol*. 1996;34(8):1952-6.
49. Lin JW, Chen CM, Chang CC. Unknown fever and back pain caused by *Bartonella henselae* in a veterinarian after a needle puncture: a case report and literature review. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011;11(5):589-91.
50. Oliveira AM, Maggi RG, Woods CW, Breitschwerdt EB. Suspected needle stick transmission of *Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffii* to a veterinarian. *J Vet Intern Med*. 2010;24(5):1229-32.
51. Scolfaro C, Mignone F, Gennari F, Alfano A, Veltri A, Romagnoli R, et al. Possible donor-recipient bartonellosis transmission in a pediatric liver transplant. *Transpl Infect Dis*. 2008;10(6):431-3.
52. Velho PE. Blood transfusion as an alternative bartonellosis transmission in a pediatric liver transplant. *Transpl Infect Dis*. 2009;11(5):474.
53. Breitschwerdt EB, Maggi RG, Farmer P, Mascarelli PE. Molecular evidence of perinatal transmission of *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* and *Bartonella henselae* to a child. *J Clin Microbiol*. 2010;48(6):2289-93.
54. Psarros G, Riddell J, Gandhi T, Kauffman CA, Cinti SK. *Bartonella henselae* infections in solid organ transplant recipients: report of 5 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 2012;91(2):111-21.
55. Pons MJ, Lovato P, Silva J, Urteaga N, del Valle Mendoza J, Ruiz J. Carrion's disease after blood transfusion. *Blood Transfus*. 2016;14(6):527-30.
56. Magalhães RF, Pitassi LH, Salvadego M, de Moraes AM, Barjas-Castro ML, Velho PE. *Bartonella henselae* survives after the storage period of red blood cell units: is it transmissible by transfusion? *Transfus Med*. 2008;18(5):287-91.
57. Ruiz J, Silva W, Pons MJ, Del Valle LJ, Tinco CR, Casabona VD, et al. Long time survival of *Bartonella bacilliformis* in blood stored at 4 °C. A risk for blood transfusions. *Blood Transfus*. 2012;10(4):563-4.
58. Silva MN, Vieira-Damiani G, Ericson ME, Gupta K, Gilioli R, de Almeida AR, et al. *Bartonella henselae* transmission by blood transfusion in mice. *Transfusion*. 2016;56(6 Pt 2):1556-9.
59. Magalhães RF, Cintra ML, Barjas-Castro ML, Del Negro GM, Okay TS, Velho PE. Blood donor infected with *Bartonella henselae*. *Transfus Med*. 2010;20(4):280-2.
60. Maggi RG, Mascarelli PE, Pultorak EL, Hegarty BC, Bradley JM, Mozayani BR, et al. *Bartonella* spp. bacteremia in high-risk immunocompetent patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;71(4):430-7.
61. 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(Pt 6):743-5.

62. Parra E, Segura F, Tijero J, Pons I, Nogueras MM. Development of a real-time PCR for *Bartonella* spp. detection, a current emerging microorganism. *Mol Cell Probes*. 2017;32:55-9.
63. Dalton MJ, Robinson LE, Cooper J, Regnery RL, Olson JG, Childs JE. Use of *Bartonella* antigens for serologic diagnosis of cat-scratch disease at a national referral center. *Arch Intern Med*. 1995;155(15):1670-6.
64. Sander A, Berner R, Ruess M. Serodiagnosis of cat scratch disease: response to *Bartonella henselae* in children and a review of diagnostic methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001;20(6):392-401.
65. Guptill L. Feline bartonellosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2010;40(6):1073-90.
66. Tsuneoka H, Yanagihara M, Tanimoto A, Tokuda N, Otsuyama KI, Nojima J, et al. The utility of a country-specific *Bartonella henselae* antigen in an IgM-indirect fluorescent antibody assay for the improved diagnosis of cat scratch disease. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017;87(1):22-4.
67. Edouard S, Nabet C, Lepidi H, Fournier PE, Raoult D. *Bartonella*, a common cause of endocarditis: a report on 106 cases and review. *J Clin Microbiol*. 2015;53(3):824-9.
68. Rustandi RR, Loughney JW, Hamm M, Hamm C, Lancaster C, Mach A, et al. Qualitative and quantitative evaluation of Simon, a new CE-based automated Western blot system as applied to vaccine development. *Electrophoresis*. 2012;33(17):2790-7.
69. Duncan AW, Maggi RG, Breitschwerdt EB. A combined approach for the enhanced detection and isolation of *Bartonella* species in dog blood samples: pre-enrichment liquid culture followed by PCR and subculture onto agar plates. *J Microbiol Methods*. 2007;69(2):273-81.
70. Maggi RG, Duncan AW, Breitschwerdt EB. Novel chemically modified liquid medium that will support the growth of seven *Bartonella* species. *J Clin Microbiol*. 2005;43(6):2651-5.
71. Diaz MH, Bai Y, Malania L, Winchell JM, Kosoy MY. Development of a Novel Genus-specific Real-time PCR Assay for Detection and Differentiation of *Bartonella* Species and Genotypes. *J Clin Microbiol*. 2012; 50 (5) 1645-49.
72. Cadenas MB, Maggi RG, Diniz PP, Breitschwerdt KT, Sontakke S, Breithschwerdt EB. Identification of bacteria from clinical samples using *Bartonella* alpha-Proteobacteria growth medium. *J Microbiol Methods*. 2007;71(2):147-55.
73. Hansmann Y, DeMartino S, Piémont Y, Meyer N, Mariet P, Heller R, et al. Diagnosis of cat scratch disease with detection of *Bartonella henselae* by PCR: a study of patients with lymph node enlargement. *J Clin Microbiol*. 2005;43(8):3800-6.
74. Maggi RG, Breitschwerdt EB. Potential limitations of the 16S-23S rRNA intergenic region for molecular detection of *Bartonella* species. *J Clin Microbiol*. 2005;43(3):1171-6.
75. Kosoy M, Bai Y, Lynch T, Kuzmin IV, Niezgoda M, Franka R, et al. *Bartonella* spp. in bats, Kenya. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(12):1875-81.
76. Pennisi MG, La Camera E, Giacobbe L, Orlandella BM, Lentini V, Zummo S, et al. Molecular detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in clinical samples of pet cats from Southern Italy. *Res Vet Sci*. 2010;88(3):379-84.
77. Gutierrez R, Vayssier-Taussat M, Buffet JP, Harrus S. Guidelines for the Isolation, Molecular Detection, and Characterization of *Bartonella* Species. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2017;17(1):42-50.
78. Yang S, Rothman RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis*. 2004;4(6):337-48.
79. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63(10):3741-51.
80. Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB. Cat scratch disease and other zoonotic *Bartonella* infections.

J Am Vet Med Assoc. 2004;224(8):1270-9.

81. Jacomo V, Kelly PJ, Raoult D. Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate). Clin Diagn Lab Immunol. 2002;9(1):8-18.
82. Lamas C, Curi A, Boia M, Lemos E. Human bartonellosis: seroepidemiological and clinical features with an emphasis on data from Brazil - a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103(3):221-35.
83. da Costa PS, Brigatte ME, Greco DB. Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100(8):853-9.
84. Correa FG, Pontes CL, Verzola RM, Mateos JC, Velho PE, Schijman AG, et al. Association of *Bartonella* spp bacteremia with Chagas cardiomyopathy, endocarditis and arrhythmias in patients from South America. Braz J Med Biol Res. 2005;45(7):644-51.
85. Yilmaz C, Ergin C, Kaleli I. Investigation of *Bartonella henselae* seroprevalence and related risk factors in blood donors admitted to Pamukkale University Blood Center. Mikrobiyol Bul. 2009;43(3):391-401.
86. 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;37(2):166-7.
87. 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.
88. Lamas CC, Mares-Guia MA, Rozental T, Moreira N, Favacho AR, Barreira J, et al. *Bartonella* spp. infection in HIV positive individuals, their pets and ectoparasites in Rio de Janeiro, Brazil: serological and molecular study. Acta Trop. 2010;115(1-2):137-41.
89. Sun J, Fu G, Lin J, Song X, Lu L, Liu Q. Seroprevalence of *Bartonella* in Eastern China and analysis of risk factors. BMC Infect Dis. 2010;10:121.
90. Corrêa FG, Pontes CL, Verzola RM, Mateos JC, Velho PE, Schijman AG, et al. Association of *Bartonella* spp bacteremia with Chagas cardiomyopathy, endocarditis and arrhythmias in patients from South America. Braz J Med Biol Res. 2012;45(7):644-51.
91. Mansueto P, Pepe I, Cillari E, Arcoleo F, Micalizzi A, Bonura F, et al. Prevalence of antibodies anti-*Bartonella henselae* in western Sicily: children, blood donors, and cats. J Immunoassay Immunochem. 2012;33(1):18-25.
92. Musso D, Broult J, Parola P, Raoult D, Fournier PE. Absence of antibodies to *Rickettsia* spp., *Bartonella* spp., *Ehrlichia* spp. and *Coxiella burnetii* in Tahiti, French Polynesia. BMC Infect Dis. 2014;14:255.
93. Noden BH, Tshavuka FI, van der Colf BE, Chipare I, Wilkinson R. Exposure and risk factors to *Coxiella burnetii*, spotted fever group and typhus group *Rickettsiae*, and *Bartonella henselae* among volunteer blood donors in Namibia. PLoS One. 2014;9(9):e108674.
94. Aydin N, Bulbul R, Telli M, Gultekin B. Seroprevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* in blood donors in Aydin province, Turkey. Mikrobiyol Bul. 2014;48(3):477-83.
95. Muller A, Reiter M, Schotta 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(5):763-7.
96. Pons MJ, Urteaga N, Alva-Urcia C, Lovato P, Silva J, Ruiz J, et al. Infectious agents, *Leptospira* spp. and *Bartonella* spp., in blood donors from Cajamarca, Peru. Blood Transfus. 2015;14(6):504-8.
97. Maggi RG, Mozayeni BR, Pultorak EL, Hegarty BC, Bradley JM, Correa M, et al. *Bartonella* spp. bacteremia and rheumatic symptoms in patients from Lyme disease-endemic region. Emerg Infect Dis. 2012;18(5):783-91.
98. Oteo JA, Maggi R, Portillo A, Bradley J, García-Álvarez L, San-Martín M, et al. Prevalence of *Bartonella* spp. by culture, PCR and serology, in veterinary personnel from Spain. Parasit Vectors. 2017;10.

99. Hobson C, Le Brun C, Beauruelle C, Maakaroun-Vermesse Z, Mereghetti L, Goudeau A, et al. Detection of *Bartonella* in cat scratch disease using a single-step PCR assay kit. J Med Microbiol. 2017;66(11):1596-601.
100. Gilbert DN. Sanford Guide to Antimicrobial Therapy 2016. 46 ed: Antimicrobial Therapy, Incorporated 2016. 254 p.
101. Kawasato KH, de Oliveira LC, Velho PE, Yamamoto L, Del Negro GM, Okay TS. Detection of *Bartonella henselae* DNA in clinical samples including peripheral blood of immune competent and immune compromised patients by three nested amplifications. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2013;55(1):1-6.
102. Breitschwerdt EB. Did *Bartonella henselae* contribute to the deaths of two veterinarians? Parasit Vectors. 2015;8:317.
103. Drummond MR, Lania BG, Diniz PPVdP, Gilioli R, Demolin DMR, Scorpione DG, et al. Improvement of *Bartonella henselae* DNA Detection in Cat Blood Samples by Combining Molecular and Culture Methods. J Clin Microbiol. 2018.
104. Vieira-Damiani G, Diniz PP, Pitassi LH, Sowry S, Scorpione DG, Lania BG, et al. *Bartonella clarridgeiae* bacteremia detected in an asymptomatic blood donor. J Clin Microbiol. 2015;53(1):352-6.
105. Staggemeier R, Pilger DA, Spilki FR, Cantarelli VV. Multiplex SYBR® Green-real time PCR (QPCR) assay for the detection and differentiation of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2014;56(2):93-5.
106. Lim C, Wannapinij P, White L, Day NP, Cooper BS, Peacock SJ, et al. Using a web-based application to define the accuracy of diagnostic tests when the gold standard is imperfect. PLoS One. 2013;8(11):e79489.
107. Cohen JF, Korevaar DA, Altman DG, Bruns DE, Gatsonis CA, Hooft L, et al. STARD 2015 guidelines for reporting diagnostic accuracy studies: explanation and elaboration. BMJ Open. 2016;6(11):e012799.
108. Hajian-Tilaki K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. Caspian J Intern Med. 2013;4(2):627-35.
109. Maguina C, Guerra H, Ventosilla P. Bartonellosis. Clin Dermatol. 2009;27(3):271-80.
110. Florin TA, Zaoutis TE, Zaoutis LB. Beyond cat scratch disease: widening spectrum of *Bartonella henselae* infection. Pediatrics. 2008;121(5):e1413-25.

8. Apêndice

Padronização das reações utilizadas no projeto

A padronização foi necessária, devido à troca do termociclador e de enzimas utilizadas na PCR para a otimização da técnica. Foram testados dois termocicladores, duas diferentes enzimas (utilizada na amplificação de fragmentos de DNA por meio de PCR), dois eluentes do DNA extraído e dois corantes de DNA para realização da eletroforese.

Para a realização dos testes foram utilizadas amostras de DNA extraído a partir de 750µL de suspensão de *B. henselae* em soro fisiológico a 10^8 UFC. A partir do eluído de DNA extraído, foram feitas diluições seriadas, de modo a determinar a sensibilidade e o limite de detecção de cada reação de amplificação.

As diluições foram calculadas da seguinte maneira: a partir do número de pares de bases do genoma completo da *B. henselae* obtido pelo GenBank® foi possível calcular o seu peso molecular utilizando uma ferramenta matemática disponível no site www.changbioscience.com/genetics/mw.html. A cepa padrão de *B. henselae* teve seu DNA extraído e quantificada por espectrofotometria (NanoDrop®). A partir destes dois dados calculou-se o número de cópias de DNA de *B. henselae* por µL presente no eluído de DNA extraído da cepa padrão. Realizaram-se diluições seriadas que foram testadas em 10 reações de PCR. O menor número de cópias amplificado em todas as 10 reações foi utilizado como limite teórico.

Teste dos termocicladores

Foram testados dois termocicladores para verificar se haveria diferença de sensibilidade nas reações realizadas em dois diferentes equipamentos disponíveis. As reações foram realizadas concomitantemente para evitar outras variáveis.

Analisando-se a imagem capturada do gel depois da eletroforese realizada do DNA amplificado nos dois termocicladores testados (Figura 1), concluiu-se que não houve diferença significativa entre as máquinas. Embora o termociclador 1 tenha amplificado o DNA de interesse a partir de apenas uma

cópia, não amplificou a diluição de cinco cópias. Já o termociclador 2 não amplificou apenas a diluição de 1 cópia, o que já era esperado pois se trata de uma reação de PCR convencional cuja sensibilidade normalmente é mais baixa em relação às outras técnicas de amplificação, tais como PCR de dupla amplificação ou PCR em tempo real.

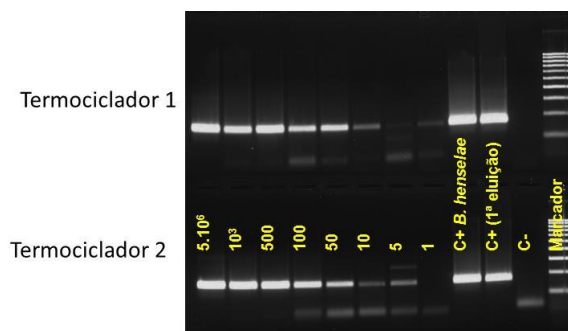


Figura 1. Imagem capturada do gel de agarose: produtos amplificados com diferentes concentrações de DNA de *B. henselae* em dois termocicladores

Desta forma, o termociclador 2 foi escolhido para realizar todas as reações do projeto pois, apesar de estar alocado em um laboratório multiusuário, oferecia maior disponibilidade de uso.

Teste das enzimas

Com o objetivo de testar a eficiência de duas diferentes marcas da enzima utilizada na PCR (Taq polimerase) foram testadas a *EasyTaq* DNA Polimerase (LGC) e a *GoTaq® Flexi* DNA Polimerase (Promega). As reações foram realizadas concomitantemente para evitar outras variáveis.

A enzima da marca Promega se mostrou muito mais eficiente, amplificando a diluição com cinco cópias de DNA de *B. henselae*, enquanto que a da marca LGC amplificou apenas a diluição com 1.000 cópias. Essa diferença pode estar relacionada ao fato da enzima da Promega ser *Hot Start*, ou seja, sua atividade é eliminada ou minimizada em temperaturas inferiores a 70°C, o que a torna mais sensível e específica (Figura 2).

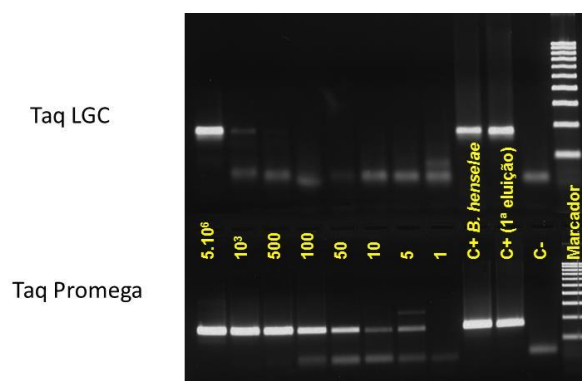


Figura 2. Imagem capturada do gel de agarose: produtos amplificados com diferentes concentrações de DNA de *B. henselae* de reações realizadas com duas enzimas de diferentes marcas

Desta forma, a enzima GoTaq® Flexi DNA Polimerase (Promega) foi escolhida para a realização do projeto.

Teste do reagente para eluição do DNA

Na última etapa da extração, os fabricantes dos *kits* recomendam a eluição do DNA na solução tampão fornecida por cada um deles ou em água deionizada e esterilizada. Os tampões de eluição contêm EDTA e este reagente já foi citado como inibidor de PCR. Para testar esta variável, as amostras em duplicata foram ressuspensas uma em água e outra no tampão do *kit*.

O DNA eluído em água apresentou resultado um pouco melhor do que o eluído no tampão do kit, amplificando até 50 cópias enquanto que, o DNA eluído com tampão amplificou apenas até 100 cópias de *B. henselae*.

Além disso, quando se utilizou água, as bandas observadas no gel de eletroforese se mostraram mais nítidas em relação às bandas formadas pelo DNA eluído em solução tampão (Figura 3).

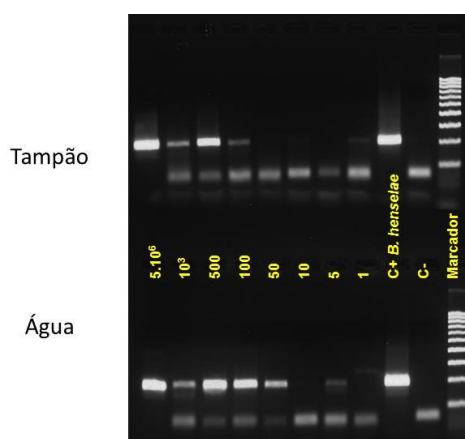


Figura 3. Imagem capturada do gel de agarose: produtos amplificados com diferentes concentrações de DNA de *B. henselae* a partir de DNA eluído com soluções diferentes (Tampão do kit X Água esterilizada ultrapura)

Assim, optou-se por eluir o DNA em água estéril, para evitar possível inibição da PCR.

Teste de coloração de ácidos nucleicos

A visualização dos amplificados gerados na PCR é feita por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com corantes de ácidos nucleicos. Estes corantes se intercalam no DNA e imitem fluorescência na presença de luz UV, permitindo a visualização do amplificado.

O brometo de etídio é o corante mais frequentemente usado, porém, ele é altamente tóxico e mutagênico. Na tentativa de reduzir a exposição a este agente, testou-se GelRedTM (Biotium Inc.), que também é um corante fluorescente de ácidos nucleicos ultrasensível, extremamente estável e ambientalmente seguro projetado para substituir o brometo de etídeo na coloração de ácidos nucleicos em géis de agarose. Como ambos têm praticamente o mesmo espectro, são visualizados no mesmo comprimento de onda, permitindo o uso do fotodocumentador já disponível em nosso laboratório.

Para testar os corantes foi realizada uma reação de PCR e a mesma amostra foi aplicada em dois géis: um corado com brometo de etídeo e o outro com GelRedTM.

No gel corado com GelRedTM as bandas visualizadas foram mais nítidas. Adicionalmente, este corante mostrar-se mais sensível, pois permitiu a

visualização nítida de 50 cópias. No gel corado com brometo de etídeo, há a presença desta banda, mas muito mais clara. Isto geraria dúvida da presença do DNA de interesse na análise final do teste por PCR.

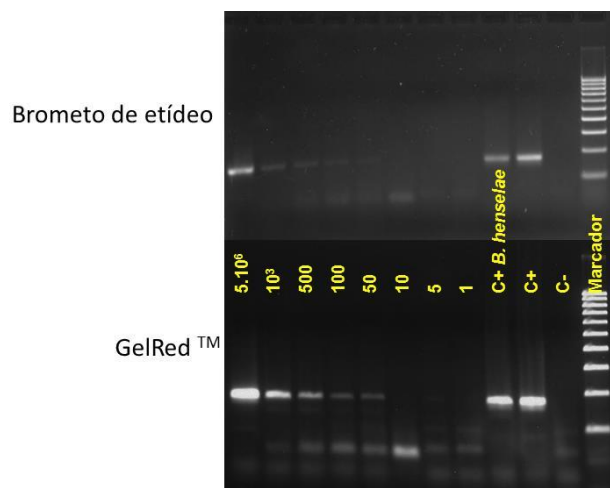


Figura 4. Imagem capturada do gel de agarose: produtos amplificados com diferentes concentrações de DNA de *B. henselae*, corados com corantes diferentes

Assim, optou-se por utilizar o GelRed™ como corante.

Após a definição desses quatro parâmetros (termociclador, enzima, eluentes e corante), foi necessária a padronização de cada uma das reações de PCR que seriam utilizadas no projeto.

Padronização da PCR convencional para *Bartonella* spp. baseada na região intergênica ITS

A primeira etapa para a padronização da PCR é ajustar a temperatura de anelamento do DNA. Para isso, foi realizado um ensaio de PCR com gradiente de temperatura. Foi utilizado DNA extraído de suspensão de *B. henselae* em soro fisiológico a 10⁸ UFC. Os resultados são mostrados na figura 5.

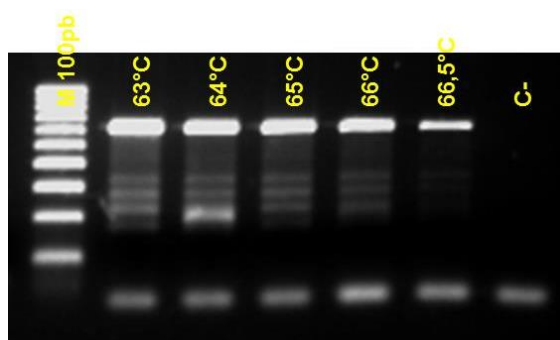


Figura 5. Imagem capturada do gel de agarose: produtos amplificados a partir de DNA de *B. henselae*, em reação realizada com gradiente de temperatura com *primers ITS*

A partir deste resultado foi escolhida a temperatura de 66°C por apresentar menos bandas inespecíficas, mas ao mesmo tempo não restringir a amplificação além do aceitável, já que se sabe que quanto maior a temperatura, maior a especificidade, porém menor a sensibilidade. Como a bactéria em estudo causa baixa bacteremia, é importante que a reação seja específica, mas também muito sensível.

Após a escolha da temperatura, era necessário investigar se esta nova reação era tão sensível quanto à anteriormente utilizada. Para isso foi realizada uma reação com as diluições da cepa padrão. Os resultados são apresentados na Figura 6.

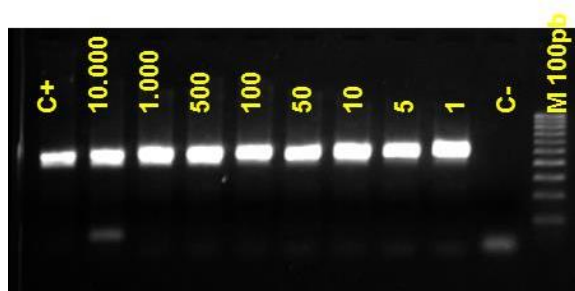


Figura 6. Imagem capturada do gel de agarose: produtos amplificados por PCR convencional para a região *ITS*, a partir de diferentes diluições do DNA extraído de cepa padrão de *B. henselae* Houston-I (ATCC 49882)

A reação se mostrou muito sensível, amplificando até a diluição com apenas uma cópia de DNA de *B. henselae*.

A próxima etapa era testar se estes *primers* não produziram bandas inespecíficas em amostras de DNA extraído de sangue. Para testar também outras fontes de DNA utilizadas no projeto (como cultura líquida e soro) foi realizada uma reação piloto com cinco amostras de cada tipo provenientes de outros projetos do laboratório que já tinham DNA extraído.

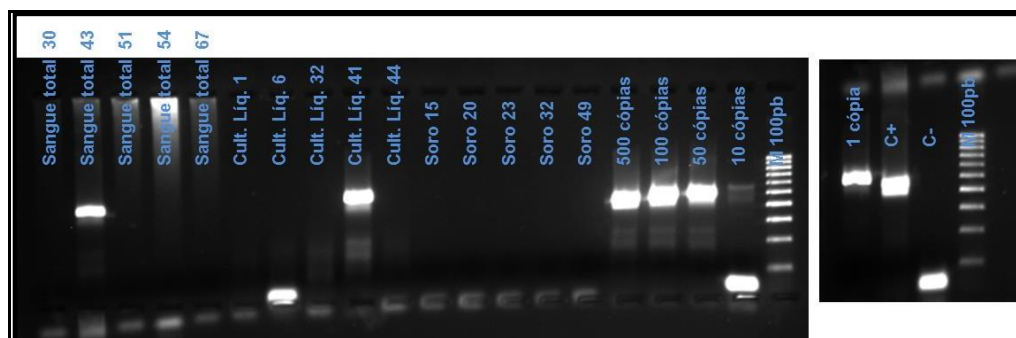


Figura 7. Imagem capturada do gel de agarose: produtos amplificados a partir de DNA extraído de diferentes amostras biológicas com *primers ITS*

Como pode ser visto na Figura 7, as amostras de DNA extraídas de sangue total, assim como as de outras fontes (cultura líquida e soro), apresentaram excelente resultado, sem a presença de bandas inespecíficas e com sensibilidade de uma cópia de DNA de *B. henselae*.

Padronização da PCR convencional para *B. henselae* baseada no gene *gltA*

Foram realizadas as mesmas etapas já descritas para a padronização da PCR convencional *ITS*: ajuste da temperatura de anelamento (Figura 8) e teste de sensibilidade da reação com 0,25µL (1,25 unidades) e com 0,125µL (0,625 unidades) de taq (enzima) (Figura 9). Foi utilizado DNA extraído de suspensão de *B. henselae* em soro fisiológico a 10⁸ UFC.

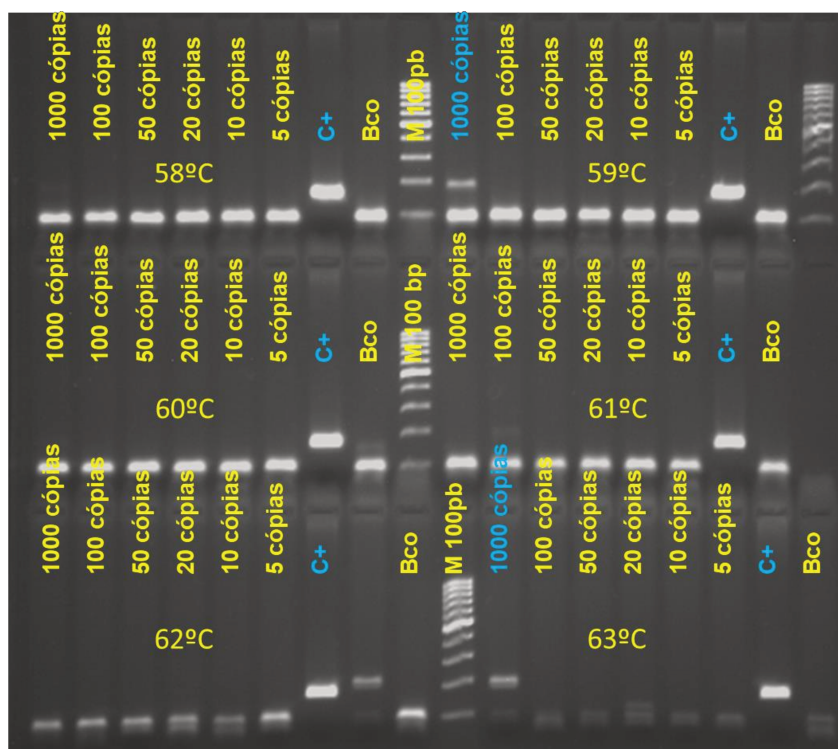


Figura 8. Imagem capturada do gel de agarose: produtos amplificados a partir de DNA de *B. henselae*, em reação realizada com gradiente de temperatura com *primers* que flanqueiam um fragmento do gene *gltA*

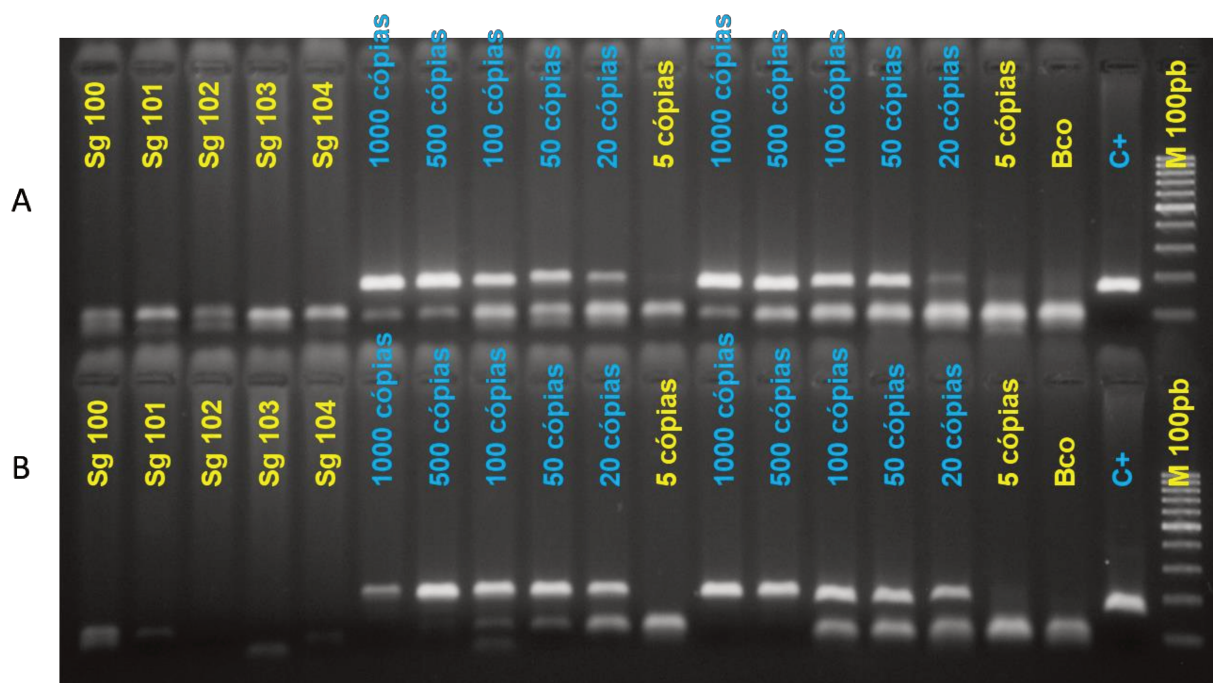


Figura 9. Imagem capturada do gel de agarose: produtos amplificados com diferentes concentrações de DNA de *B. henselae*, com *primers* que flanqueiam um fragmento do gene *gltA*, com duas concentrações de enzima (Taq). A: 0,25µL (1,25 unidades) e B: 0,125µL (0,625 unidades)

A partir destes resultados foi escolhida a temperatura de 59°C por apresentar mais sensibilidade e a condição “B” de concentração de enzima, uma vez que apresentou melhor desempenho amplificando 20 cópias quando comparado com o dobro de enzima.

Padronização da PCR de dupla amplificação (PCR *nested*) para *B. henselae* baseadas no gene *ftsZ*

Foram realizadas as mesmas etapas já descritas para a padronização das PCR convencionais: ajuste da temperatura de anelamento e teste de sensibilidade da reação. Foi utilizado DNA extraído de suspensão de *B. henselae* em soro fisiológico a 10^8 UFC. Também foi analisado se haveria alteração na reação com duas concentrações diferentes de magnésio, que atua como cofator na reação (variáveis denominadas “A” e “B”, sendo “A” 1,5mM e “B” 2mM). Como são duas reações em sequência, todas as variáveis precisam ser testadas em ambas as reações (Figura 10).

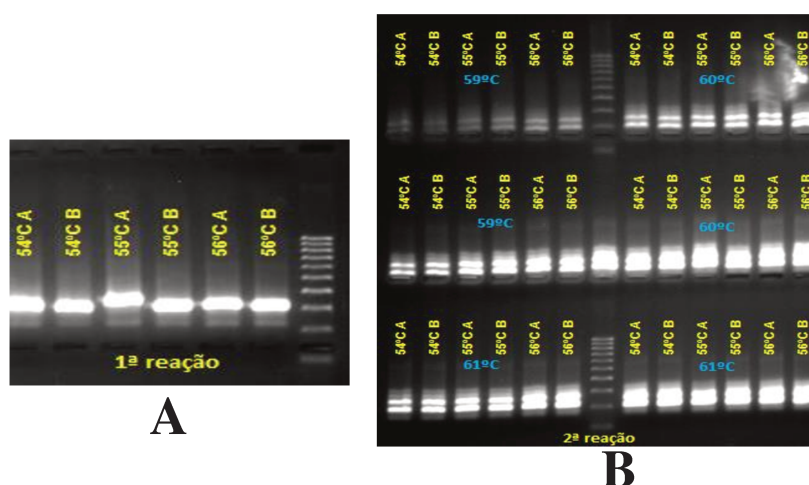


Figura 10. Imagem capturada do gel de agarose: o resultado da primeira reação pode ser visualizado na imagem “A”. Na imagem “B”, em amarelo a temperatura referente à primeira reação e em azul à segunda

A melhor condição para a 1ª reação foi 56°C “B”. Na segunda reação houve o aparecimento de duas bandas, necessitando de uma segunda padronização. Apesar disto, este teste permitiu a escolha da temperatura de anelamento: 61°C.

Na segunda padronização, testou-se aumentar a concentração de magnésio e diminuir o volume do produto amplificado na primeira PCR que era

adicionado à segunda reação. Na PCR *nested* há a utilização do produto da primeira reação, nele há, além do DNA de interesse amplificado, sobras de reagentes provenientes da primeira reação que podem interferir na reação subsequente, levando até mesmo à formação de bandas inespecíficas, como no caso mostrado anteriormente (Figura 10). As amostras foram testadas em duplicata. O resultado deste teste pode ser visto na Figura 11.

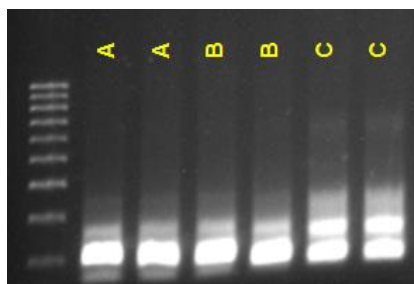


Figura 11. Imagem capturada do gel de agarose: “A”: 0,2µL do produto da PCR 1 e 2mM de MgCl₂; “B”: 0,2µL do produto da PCR 1 e 2,5mM de MgCl₂; “C”: 1µL do produto da PCR 1 e 3mM de MgCl₂

A condição “A” se mostrou melhor, pois houve a diminuição da formação da segunda banda. Esta condição foi escolhida para a realização das reações do projeto.

Padronização da PCR em tempo real (*Real-time*) para *B. henselae* baseada no gene *gltA*

A princípio foram realizados testes com *primers* para a mesma região utilizada na PCR convencional (*ITS*) para gênero *Bartonella*. Após várias tentativas, com diferentes pares de *primers* e diferentes condições de reação, não foi possível padronizar a reação para esta região. O produto amplificado apresentou bandas inespecíficas, além de vários “arrastes” visualizado em gel de agarose. Ao analisar os resultados dos gráficos gerados pelo equipamento de PCR em tempo real, estes “arrastes” foram observados como diversos picos na curva de *melting*, o que impossibilitaria o seu uso na rotina diagnóstica.

Também foram realizados testes com *primers* para a região *ftsZ*, mesma região utilizada nas PCR de dupla amplificação. A reação funcionou e não foi detectado amplificado inespecífico, porém a reação não foi sensível, amplificando apenas diluições de DNA de *B. henselae* acima de 100 cópias.

Na tentativa de padronizar uma reação para gênero e sensível, foram realizados testes com *primers* para a região *ssrA*. Apesar da boa sensibilidade da reação, ao testar com o DNA extraído de sangue apareceram amplificados inespecíficos, o que impossibilitou o uso destes *primers*.

Ao buscar na literatura científica trabalhos similares que utilizaram Sybr® Green para a realização de PCR em tempo real para o diagnóstico de *Bartonella* sp., encontramos o artigo “Multiplex Sybr® Green-Real time PCR (qPCR) assay for the detection and differentiation of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats” (Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 56(2): 93-95, 2014). Neste artigo utilizaram-se *primers* para a região do gene da citrato sintase. A reação foi muito sensível, amplificando até 10 cópias e não apresentou bandas inespecíficas quando testadas com DNA extraído do sangue. Após ajustes na reação, como tempo de anelamento e extensão, a reação foi finalmente padronizada e as amostras (tanto de sangue como de cultura líquida) foram testadas.

9. Anexos

Anexo 1 – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS													
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP													
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA													
Título da Pesquisa: Comparação de três métodos moleculares para detecção de Bartonella spp. em doadores de sangue do Hemocentro de Campinas/SP													
Pesquisador: Marina Rovani Drummond													
Área Temática:													
Versão: 1													
CAAE: 45739815.0.0000.5404													
Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP													
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio													
DADOS DO PARECER													
Número do Parecer: 1.135.941													
Data da Relatoria: 23/06/2015													
Apresentação do Projeto:													
"Bartonella spp. são organismos zoonóticos negligenciados, capazes de provocar, em humanos, desde bacteremia assintomática, doenças crônicas e até mesmo a morte. Entre as características mais marcantes destas bactérias estão o crescimento fastidioso, a necessidade de meios enriquecidos com sangue e de atmosfera com 5% de gás carbônico. Também são conhecidas por infectarem eritrócitos, células endoteliais, células dendríticas e macrófagos, geralmente causando bacteremia persistente em seus hospedeiros. Existe o risco real de que um doador de sangue, infectado por Bartonella spp., porém assintomático, tenha suas hemácias contendo estes agentes. Em 2010, foi publicado o primeiro caso de sangue doado infectado por Bartonella henselae. Em outro estudo, realizado em parceria com pesquisadores da Universidade Johns Hopkins (EUA), 3,2% dos doadores de sangue do Hemocentro da Unicamp foram positivos na PCR convencional para Bartonella spp.. Apesar dos esforços, o diagnóstico de bartonelose ainda é muito difícil e demorado. Com o objetivo de desenvolver e a identificar um diagnóstico sensível e específico, serão analisadas as amostras de sangue de 500 doadores do Hemocentro de Campinas, coletadas no período de novembro de 2009 a janeiro de 2010, durante procedimento de doação de sangue. Serão realizadas PCR de dupla amplificação (PCR nested), PCR convencional e PCR Real-time tanto no DNA extraído do sangue total como da cultura de pré-enriquecimento. A comparação dos													
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td colspan="2">Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Bairro: Barão Geraldo</td> <td></td> <td>CEP: 13.083-887</td> </tr> <tr> <td>UF: SP</td> <td>Município: CAMPINAS</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefone: (19)3521-8936</td> <td>Fax: (19)3521-7187</td> <td>E-mail: cep@fcm.unicamp.br</td> </tr> </table>		Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126			Bairro: Barão Geraldo		CEP: 13.083-887	UF: SP	Município: CAMPINAS		Telefone: (19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@fcm.unicamp.br
Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126													
Bairro: Barão Geraldo		CEP: 13.083-887											
UF: SP	Município: CAMPINAS												
Telefone: (19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@fcm.unicamp.br											

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.135.941

resultados obtidos possibilitará identificar o método mais eficiente de diagnóstico e utilizá-lo para detectar esta infecção, mesmo que subclínica, e no futuro utilizar como ferramenta diagnóstica ou mesmo de triagem dos doadores de sangue ou órgãos.

Objetivo da Pesquisa:

Comparar os três métodos moleculares (PCR convencional, PCR nested e PCR real-time) para o diagnóstico de bartonelose em doadores de sangue

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Trata-se de uma pesquisa em que serão utilizadas amostras de sangue já estocadas, pertencentes a um projeto similar. Assim, não são previstos riscos para os participantes

Benefícios: Por se tratar de um estudo retrospectivo, caso a infecção por *Bartonella* sp. seja detectada em algum dos participantes, este será contatado e poderá, se desejar, ser acompanhado neste serviço e receber o tratamento adequado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa com o objetivo de comparar os três métodos moleculares (PCR convencional, PCR nested e PCR real-time) para o diagnóstico de bartonelose em doadores de sangue. Propõe-se dispensa do TCLE argumentando-se: "As amostras de sangue total que serão utilizadas neste projeto são provenientes de outro projeto (o qual foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp sob o nº122/2005 sendo aprovado e no ano de 2000 foi reaprovaado por essa mesma comissão.). Neste projeto anterior, o objetivo foi avaliar a prevalência da *Bartonella* spp. nos doadores por meio da PCR convencional da cultura líquida de enriquecimento. Durante sua execução, foram preenchidos os TCLE que estão devidamente arquivados. O presente projeto visa utilizar estas amostras para detectar a mesma bactéria, apenas utilizando técnicas moleculares diferentes, além de extrair DNA diretamente do sangue e não somente da cultura líquida. Em vista do tamanho amostral (500 amostras) e do tempo decorrido da coleta (6 anos), seria inviável conseguir um novo consentimento dos 500 participantes. Os pesquisadores envolvidos no projeto se comprometem a tentar contato caso sejam encontrados outros doadores infectados com *Bartonella* spp.. Estes serão convocados e poderão, se desejarem, fazer acompanhamento neste centro".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados:

1. Folha de rosto assinada pela pesquisadora principal, Marina Rovani Drummond e por Ivan

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126			
Bairro: Barão Geraldo	CEP: 13.083-887		
UF: SP	Município: CAMPINAS		
Telefone: (19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@fcm.unicamp.br	

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.135.941

Felizardo Contrera Toro, diretor da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, instituição indicada como proponente;

2. Termo de transferência da guarda de material biológico armazenado, associado ao projeto "Estudo sobre a prevalência da soropositividade da Bartonella Spp em doadores do Hemocentro – Unicamp" (CAAE: xxxxx), assinado por Luiza Helena Urso Pirassi.

3. Regulamento do biorrepositório vinculado ao projeto de pesquisa "Comparação de três métodos moleculares para a detecção de Bartonella Spp em doadores de sangue do Hemocentro de Campinas", assinado pelo responsável pelo biorrepositório, Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho (membro da equipe de pesquisa).

4. Formulário da Plataforma Brasil com as informações básicas sobre o projeto.

5. Projeto completo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

- 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.

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.135.941

- 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 notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – 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 seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

CAMPINAS, 03 de Julho de 2015

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126			
Bairro: Barão Geraldo	CEP: 13.083-887		
UF: SP	Município: CAMPINAS		
Telefone: (19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@fcm.unicamp.br	

Anexo 2 – Certificado - Premiação 9ª Semana de Pesquisa da FCM (2016)





9ª SEMANA DE PESQUISA DA FCM
Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP



Certificado

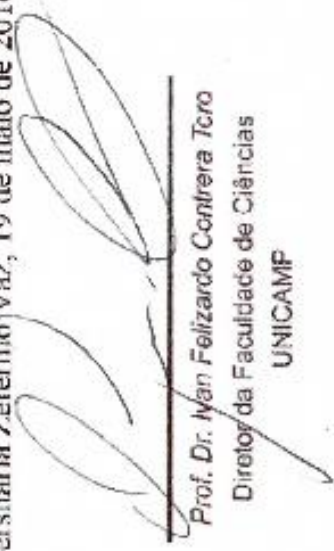
Certificamos que o trabalho intitulado: **Comparação de dois métodos moleculares para detecção de Bartonella sp. em sangue de doadores do Hemocentro/Unicamp** foi premiado em segundo lugar na 9ª Semana de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

Autores: Marina Rovani Drummond, Luciene Silva dos Santos, Bruno Grosselli Lania, Amanda Roberta de Almeida, Karina de Almeida Lins, Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho

Período das apresentações de 17 a 19 de maio de 2016.



Profa. Dra. Maria Luiza Moretti
Coordenadora da Comissão de Pesquisa
FCM-UNICAMP



Prof. Dr. Ivan Felizardo Contrera Tcro
Diretor da Faculdade de Ciências
UNICAMP

Cidade Universitária Zeferino Vaz, 19 de maio de 2016.

Anexo 3 – Certificado 100 melhores trabalhos – 72º Congresso Brasileiro de Dermatologia (2017)

7 a 10 de setembro de 2017 | Costa do Sauípe - BA



**DERMATO
BAHIA - 2017**

72º Congresso da Sociedade
Brasileira de Dermatologia

**Certificamos que o trabalho: COMPARAÇÃO DE MÉTODOS
MOLECULARES PARA DETECÇÃO EM HEMODOADORES DE
AGENTE NEGLIGENCIADO DE VÁRIAS DERMATOSES.**

**Autor(es): MARINA ROVANI DRUMMOND, LUCIENE SILVA DOS
SANTOS, BRUNO GROSSELLI LANIA, AMANDA ROBERTA DE
ALMEIDA, KARINA ALMEIDA LINS, PEDRO PAULO VISSOTO DE
PAIVA DINIZ, PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO**

foi selecionado dentre os 100 melhores trabalhos científicos e apresentado
como pôster eletrônico na categoria **DISSERTAÇÃO / TESE** durante o **72º
CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA**,
realizado de 07 a 10 de setembro de 2017 na Costa do Sauípe - BA.

Salvador, 10 de setembro de 2017

PAULO MACHADO
Presidente

VITÓRIA REGINA RÊGO
Vice-Presidente

ARIENE PAIXÃO
Secretária Geral

Mediavoto



Anexo 4 – Certificado Prêmio 2º lugar categoria dissertação/tese – 72º Congresso Brasileiro de Dermatologia (2017)

7 a 10 de setembro de 2017 | Costa do Sauípe - BA



**DERMATO
BAHIA - 2017**

72º Congresso da Sociedade
Brasileira de Dermatologia

**Certificamos que o trabalho: COMPARAÇÃO DE MÉTODOS
MOLECULARES PARA DETECÇÃO EM HEMODOADORES DE
AGENTE NEGLIGENCIADO DE VÁRIAS DERMATOSES.**

**Autor(es): MARINA ROVANI DRUMMOND, LUCIENE SILVA DOS
SANTOS, BRUNO GROSSELLI LANIA, AMANDA ROBERTA DE
ALMEIDA, KARINA ALMEIDA LINS, PEDRO PAULO VISSOTO DE
PAIVA DINIZ, PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO**

foi agraciado com o **2º lugar** na categoria **DISSERTAÇÃO / TESE** para o
Prêmio PROF. DR. NEWTON ALVES GUIMARÃES como estímulo a sua
produção científica e engrandecimento da comunidade científica associada
à SBD durante o **72º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE
DERMATOLOGIA**, realizado de 07 a 10 de setembro de 2017 na Costa do
Sauípe - BA.

Salvador, 10 de setembro de 2017

PAULO MACHADO
Presidente

VITÓRIA REGINA RÊGO
Vice-Presidente

ARIENE PAIXÃO
Secretária Geral

Associação



Anexo 5 – Certificado Apresentação e-pôster – XX Congresso Brasileiro de Infectologia (2017)



INFECTO 2017

XX Congresso Brasileiro de Infectologia

— V InfectoRio —



12 a 15 / Setembro
Centro de Convenções SulAmérica
Rio de Janeiro

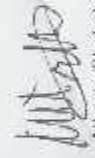
CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho "COMPARAÇÃO DE TRÊS MÉTODOS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE BARTONELLA SPP. EM DOADORES DE SANGUE", dos autores "MARINA ROYANI DRUMMOND; LUCIENE SILVA DOS SANTOS; BRUNO GROSSELLI LANIA; AMANDA ROBERTA ALMEIDA; KARINA DE ALMEIDA LINS; PEDRO PAULO VISSOTO DE PAIVA DINIZ; PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO", foi apresentado na forma de PÔSTER ELETRÔNICO, durante o XX Congresso Brasileiro de Infectologia (Infecto 2017).

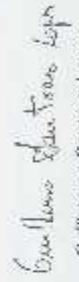


Sérgio Cirurgian
Presidente da SBI

Rio de Janeiro, 15 de setembro de 2017



Alberto Chelabado
Presidente da SBI e do Congresso



Guilherme Santoro Lopes
Presidente da Comissão Científica



GILEAD