



LUIZA HELENA URSO PITASSI

***Bartonella spp. e o risco potencial de
transmissão por transfusão sanguínea***

***Bartonella spp.* and the potential risk of
*transmission by blood transfusion***

CAMPINAS
2013



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade De Ciências Médicas

LUIZA HELENA URSO PITASSI

***Bartonella spp. e o risco potencial de
transmissão por transfusão sanguínea***

***Bartonella spp. and the potential risk of
transmission by blood transfusion***

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

Thesis of Doctorate presented to the Graduate Program of Medical Clinic from the School of Medical Sciences, University of Campinas for obtaining the title of Doctor in Medical Clinic, concentration area of Medical Clinic.

ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida por Luiza Helena Urso Pitassi, e orientada pelo Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho.

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2013**

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

P68b Pitassi, Luiza Helena Urso, 1971-
Bartonella spp. e o risco potencial de transmissão por transfusão sanguínea /
Luiza Helena Urso Pitassi. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

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

1. *Bartonella*. 2. Doadores de sangue. 3. Transfusão de sangue. 4. Infecções
por *Bartonella*. I. Velho, Paulo Eduardo Neves Ferreira, 1966-. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: *Bartonella* spp. and the potential risk of transmission by blood
transfusion

Palavras-chave em inglês:

Bartonella

Blood donor

Blood transfusion

Bartonella infection

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Clínica Médica

Banca examinadora:

Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho [Orientador]

Aparecida Machado de Moraes

Simone Cristina Olenscki Gilli

Alexsandra Rodrigues de Mendonça Favacho

Marcos Rogério André

Data de defesa: 23-05-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

LUIZA HELENA URSO PITASSI

Orientador (a) PROF(A). DR(A). PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO

2. PROF(A). DR(A). APARECIDA MACHADO DE MOARES

3. PROF(A). DR(A). SIMONE CRISTINA OLENSKI GILLI

4. PROF(A).DR(A). ALEXSANDRA RODRIGUES DE MENDONÇA FAVACHO

5. PROF(A).DR(A). MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

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

Data: 23 de maio de 2013

DEDICATÓRIA

*Ao meu marido Teco pelo amor, cuidado e dedicação.
Minha metade, fonte da minha inspiração. A estrela mais
brilhante e sublime do meu céu.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me acompanhar e iluminar os meus passos. Pela Força, Proteção e Amparo, em todos estes anos, durante as minhas longas viagens entre Minas e Campinas.

Aos meus pais, pela minha vida, pelo amor incondicional e eterno. Obrigada por me ensinarem a ter garra e coragem para persistir e enfrentar todas as dificuldades do caminho. Obrigada também por me ensinarem o respeito, a humildade, a honestidade e, sobretudo, a amar o próximo. Dedico todas as minhas conquistas a vocês!

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho, pela experiência compartilhada e orientação nesta longa caminhada, desde o Mestrado. Agradeço por me despertar o interesse para a pesquisa e por todo o aprendizado e amadurecimento vivenciados durante todos estes anos. Obrigada de coração por tudo!

Ao Prof. Dr. Rovilson Gilioli, do CEMIB, por ceder o seu precioso laboratório e por estar presente desde os primórdios desta pesquisa. Agradeço por toda a sua experiência científica, paciência e ensinamentos, essenciais na construção deste projeto.

Ao Prof. Dr. Pedro Paulo Vissoto Diniz (Western University, EUA), muito obrigada pela ajuda fundamental em todas as etapas do projeto, pelo seu profissionalismo, disposição e por trabalhar incansavelmente ao nosso lado.

À Profa. Diana Scorpio (Johns Hopkins Hospital, EUA) por ter investido na nossa pesquisa e nos apoiar com o grant que nos possibilitou a realização deste projeto. Obrigada pela sua amizade e por hoje fazer parte da minha vida. Agradeço por ter me recebido com tanto carinho no seu laboratório, me ensinando os primeiros passos da sorologia.

À Marina Rovani Drummond e ao Bruno Lania que estiveram presentes em todos os momentos. Obrigada pela amizade, convivência prazerosa e ajuda imensurável na realização das pesquisas.

A Prof^ª. Dr^ª. Maria Letícia Cintra pelo apoio, competência e por toda atenção especial nos dada, sobretudo nos ensinamentos da Microscopia Eletrônica.

À Marilúcia Ruggiero e Geralda de Pádua, funcionárias da Microscopia Eletrônica do Hospital de Clínicas da Unicamp. Obrigada pela especial convivência, carinho, e por me ajudarem demais neste projeto.

Ao Prof. Dr. Erich Vinicius de Paula, que sempre esteve ao meu lado e foi o responsável pela minha vinda para Campinas. Obrigada por estar presente na minha vida, pela sua amizade e por me ajudar de coração em todos os momentos.

À Prof^a. Dr^a. Maria Lourdes Barjas-Castro pela grande contribuição na parte hematológica da pesquisa. Obrigada por acompanhar o projeto desde o início com tanta disposição e incentivo.

Ao Prof. Dr. Wagner de Castro, Diretor do Serviço de Coleta, que nos apoiou e nos ajudou na organização da coleta de sangue do Hemocentro da Unicamp.

À Simone Nascimento e ao Márcio Pinto, que muito me ajudaram na coleta externa e interna das amostras de sangue dos doadores. A todos os funcionários do Serviço de Coleta do Hemocentro que nos deram suporte, assistência e ajuda com os doadores.

Aos quinhentos doadores de sangue que estiveram dispostos a participar deste projeto, respondendo com paciência os questionários e doando uma parte do sangue para o estudo.

Ao Prof. Dr. Carlos Emílio Levy por todo interesse neste estudo e pela ajuda na cultura das bartonelas.

À Marizete Salvadego do Laboratório de Microbiologia do Hospital de Clínicas, por cuidar do cultivo das bartonelas com tanto carinho e empenho, sempre disposta a nos ajudar em todos os momentos.

À equipe do laboratório do CEMIB: Daniele, Sílvio, Clarice, Josélia, Lenira e Amanda. Obrigada por nos ajudar em todas as horas, nos recebendo sempre com carinho e um sorriso amigo.

À Mônica Scola e à Júlia, da Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz, pelo interesse e grande ajuda ao nos ensinar a fazer as culturas sólidas.

Agradeço a todos do laboratório de Patologia, divisão Microbiologia (Jonhs Hopkins Hospital, EUA) que me receberam com tanto carinho e presteza: Diana, Kristen, Cindy, Meg, Sara, Emily, Carlos, Olga e Marcos. Em especial ao Prof. Dr. Stephen Dumler e ao Prof. Dr. Dennis Grab pela grande lição de sabedoria e humildade durante a minha convivência e por se tornarem grandes companheiros e amigos.

Aos preciosos colaboradores e amigos do Instituto Adolfo Lutz: Silvia Colombo, Elvira Nascimento e Fabiana dos Santos. Muito obrigada por me ajudarem na realização da sorologia do projeto. Eu não tenho como agradecer todo o apoio, profissionalismo e paciência em tão poucas palavras.

À Prof^ª. Dr^ª. Aparecida Machado de Moraes e à Prof^ª. Dr^ª. Renata Ferreira Magalhães por terem participado da banca de qualificação. Obrigada pela contribuição e pelo grande estímulo.

Aos professores que participaram da banca examinadora da defesa: Prof^ª. Dr^ª. Aparecida Machado de Moraes, Prof^ª. Dr^ª. Simone Cristina Olenscki Gilli, Prof^ª. Dr^ª. Alexandra Rodrigues de Mendonça Favacho e Prof. Dr. Marcos Rogério André, agradeço por contribuírem com as suas experiências para o enriquecimento deste trabalho.

À Adriana Peredo, secretária da Pós Graduação de Clínica Médica, por toda ajuda e atenção em todos os momentos.

Aos meus amados irmãos Rita e Júnior, que sempre vibraram com as minhas vitórias, por todo amor e dedicação. Aos meus queridos Lu, Laísa, Yago, Iury, Maria Clara, Manuela e tia Jô, e a toda a minha família, meu alicerce para felicidade.

Aos meus amigos de coração e alma, companheiros em cada passo trilhado. Obrigada por estarem sempre presentes me estimulando neste projeto.

À Faepex (Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão) e ao Center for Global Health da Universidade Johns Hopkins, EUA, pelo suporte financeiro para a realização do projeto.

O gênero *Bartonella* constitui um grupo de patógenos zoonóticos re-emergentes e negligenciados que têm sido associados a um amplo espectro de doenças humanas graves. As *Bartonella* spp. são bacilos gram-negativos que infectam hemácias e células endoteliais, que podem causar infecção crônica ou mesmo fatal. As bartoneloses humanas mais conhecidas são a doença de Carrión, febre das trincheiras, doença da arranhadura do gato e angiomatose bacilar. Como existem espécies de *Bartonella* intraeritrocitárias e que podem causar infecção persistente e assintomática em humanos, objetivou-se avaliar o risco potencial de transmissão de *Bartonella* spp. por transfusão sanguínea. No primeiro estudo, os eritrócitos humanos foram infectados com *B. henselae* em 30 min e 1, 5, 10, e 72 h para a avaliação ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão (ME). A *B. henselae* foi vista aderida a eritrócitos humanos 10 h após a inoculação e no interior de eritrócitos após 72 h. A localização intraeritrocitária de *B. henselae* havia sido mostrada em eritrócitos de gatos, mas nunca antes identificada em eritrócitos humanos. Foi realizado um segundo estudo para determinar as características ultraestruturais da *Bartonella* spp. nas células do sangue, pois estas informações eram muito limitadas. Este trabalho definiu os parâmetros para se caracterizar a bactéria no interior de células sanguíneas à ME. Um terceiro estudo, utilizando a ME e cultura de bactérias, demonstrou a capacidade da *B. henselae* sobreviver em uma unidade de concentrado de hemácias armazenada a 4° C durante 35 dias. A viabilidade de *B. henselae* em unidades de células vermelhas do sangue define o potencial de infecção associada à transfusão de doadores de sangue assintomáticos. Os receptores de transfusão de sangue muitas vezes são ou podem tornar-se imunodeficientes, apresentando o risco de desenvolver formas graves de bartonelose. Utilizando-se parâmetros ultraestruturais da infecção por *Bartonella* sp., relatou-se um caso de bartonelose como causa de morte 72h após uma transfusão. Um jovem com anemia aplástica, após receber várias transfusões sanguíneas, apresentou estado de choque e morreu após transfusão de um

concentrado de hemácias. Os achados da ME permitiram o diagnóstico de infecção por *Bartonella* sp.. Foi investigada nesta tese a prevalência da *Bartonella* spp. em uma amostra de 500 doadores de sangue voluntários de Campinas, estado de São Paulo, Brasil, utilizando sorologia, cultura líquida e sólida, PCR e sequenciamento como métodos de identificação destes patógenos. Os anticorpos contra *B. henselae* e *B. quintana* foram detectados em 16,2% e 32%, respectivamente. O DNA das *Bartonella* spp. foi sequenciado e demonstrado em 3,2% do sangue doado (*B. henselae* em 15 amostras e *B. clarridgeiae* em uma) e em 1,2% foi documentada, por meio do isolamento do agente, bacteremia por *B. henselae*. Este estudo revelou a presença de patógenos no sangue de doadores assintomáticos que não estão sendo rastreados no sangue doado e que podem ser responsáveis por doenças não diagnosticadas em pacientes imunodeficientes. Os resultados apresentados estabelecem a necessidade de uma reavaliação por autoridades de saúde pública dos riscos e do impacto da transmissão da *Bartonella* spp. através de transfusões sanguíneas, especialmente para os pacientes imunodeficientes. Esforços devem ser feitos para a melhoria dos métodos de diagnóstico com sensibilidade suficiente para excluir a *Bartonella* spp. em doadores de sangue e para proteger os receptores de transfusão de sangue.

Palavras-Chave: *Bartonella*, Doadores de sangue, Transfusão de sangue, Infecções por *Bartonella*.

The genus *Bartonella* is a group of re-emerging zoonotic and neglected pathogens that have been associated with a wide range of serious human diseases. *Bartonella* spp. are gram-negative bacilli that infect red blood cells and endothelial cells, which can cause chronic infection or even fatal. In humans, *Bartonella* spp. are known causative agents of Carrion's disease, trench fever, cat scratch disease and bacillary angiomatosis. As they are intra-erythrocytic bacteria and can cause persistent infection and asymptomatic in humans, our objective for this proposal was evaluate the potential risk of transmission of *Bartonella* spp. by blood transfusion. In the first study, human erythrocytes were infected with *B. henselae* in 30 min and 1, 5, 10, and 72h for ultrastructural evaluation by transmission electron microscopy (TEM). *B. henselae* was seen adhering to human erythrocytes 10h after inoculation and inside the erythrocyte after 72 h. Intraerythrocytic localization of *B. henselae* has been demonstrated in cat erythrocytes, but never before identified in human erythrocytes. A second study was conducted to determine the ultrastructural features of the *Bartonella* spp. on blood cells because this information was very limited. This paper set the parameters to characterize the bacteria within the blood cell using TEM. A third study using TEM and bacterial culture demonstrated the ability of *B. henselae* to survive in a unit of red blood cells stored at 4°C for 35 days. The viability of *B. henselae* in units of red blood cells defines the potential for infection associated with transfusion in asymptomatic blood donors. Recipients of blood transfusions often are or may become immunodeficient, with the risk of developing severe forms of bartonellosis. Using the ultrastructural findings for the diagnosis of *Bartonella* sp. infection, we reported a case of bartonellosis as cause of death 72 h after transfusion. A young man with aplastic anemia who had received multiple blood transfusions went into shock and died after transfusion of a red blood cell. The findings of TEM allowed the diagnosis of infection with *Bartonella* sp.. Was investigated in this thesis the prevalence of *Bartonella* spp. in 500 volunteer blood donors from Campinas, São Paulo State, Brazil, using serology, solid and liquid culture, PCR and sequencing

as methods for identifying these pathogens. Antibodies against *B. henselae* and *B. quintana* were detected in 16.2% and 32%, respectively. *Bartonella* sp. DNA was demonstrated in 3.2% of donated blood (15 infected with *B. henselae* and one with *B. clarridgeiae*) and 1.2% had *B. henselae* documented bacteremia by isolation of the agent. This study reveals the presence of pathogens in asymptomatic blood donors who are not being screened in donated blood and may be responsible for undiagnosed diseases in immunodeficient patients. The results presented establish the need for re-evaluation by public health officials of the risks and impact of *Bartonella* spp. transmission through blood transfusions, especially to immunocompromised patients. Efforts should be made towards improve diagnostic tests with sufficient sensitivity to rule out *Bartonella* spp. infection in blood donors to protect transfusion recipients.

Keywords: *Bartonella*, Blood donor, Blood transfusion, *Bartonella* infections.

ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	- Angiomatose bacilar
BHI	- <i>Brain Heart Infusion</i>
CDC	- <i>Centers for Diseases Control and Prevention</i>
CH	- Concentrado de hemácias
CO₂	- Dióxido de carbono
DAG	- Doença da arranhadura do gato
DC	- Doença de Carrión
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DP	- Desvio padrão
FDA	- Food and Drug Administration
FT	- Febre das trincheiras
g	- grama
°C	- Grau Celsius
HEMOCENTRO	- Centro de Hematologia e Hemoterapia (UNICAMP)
HIV	- Vírus da imunodeficiência humana
IFI	- Imunofluorescência indireta
IgG	- Imunoglobulina G
µm	- micrômetro
ME	- Microscopia eletrônica
mL	- mililitro
nm	- nanômetros
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
PBH	- Peliose bacilar hepática
RNA	- Ácido ribonucleico
sp.	- espécie
spp.	- espécies
subsp.	- subespécie

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação taxonômica de <i>Bartonella</i> spp.	30
Quadro 2. Principais espécies de <i>Bartonella</i> patogênicas ao homem.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Coloração de Gram de isolado da <i>Bartonella henselae</i>	30
Figura 2. Granuloma anular – lesões anulares de bordas pápulo-eritematosas e descamativas em paciente com linfadenomegalia persistente (Ambulatório de Dermatologia do Hospital de Clínicas da Unicamp).....	33
Figura 3. Reação de Imunofluorescência Indireta positiva para <i>Bartonella henselae</i> (Laboratório de Patologia/Microbiologia, Johns Hopkins Hospital, EUA) (Aumento de 1000x).	37
Figura 4. (A, B e C). Culturas líquidas de enriquecimento semeadas em meio sólido de Ducrey (Laboratório de Bartonelose da Unicamp).	38
Figura 5. (A, B e C). Culturas sólidas – Placas de ágar chocolate e sangue semeadas mostrando o crescimento das colônias de <i>Bartonella</i> spp. (Laboratório de Bartonelose da Unicamp).....	39
Figura 6. Fotomicrografia da eletroforese em gel de agarose a 2% de uma reação de PCR (Laboratório de Bartonelose da Unicamp).	40
Figura 7. Cerâmicas peruanas correspondentes à fase crônica da doença de Carrión, a verruga peruana (Pachas, 2001).	49
Figura 8. Verrugas peruanas – fase crônica da doença (Maguiña C <i>et al.</i> , 2009).	50
Figura 9. Linfadenopatia regional em paciente com doença da arranhadura do gato (Arquivo pessoal Dr. Paulo Velho).	55
Figura 10. Pápulas angiomatosas características de angiomatose bacilar em paciente do Hospital de Clínicas da Unicamp.	58

RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xv
ABREVIATURAS E SIGLAS	xvii
LISTA DE QUADROS	xix
LISTA DE FIGURAS	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	27
1.2 AS BARTONELAS	29
1.3 TRANSMISSÃO.....	41
1.4 EPIDEMIOLOGIA	44
1.5 BARTONELOSES.....	46
1.5.1 Doença de Carrión	48
1.5.2 Febre das Trincheiras	52
1.5.3 Doença da Arranhadura do Gato	53
1.5.4 Angiomatose Bacilar	57
1.6 OUTRAS DOENÇAS	59
1.7 INFECÇÃO DE ERITRÓCITOS E RISCO TRANSFUSIONAL	61
2. OBJETIVOS.....	69
2.1 OBJETIVO GERAL	71
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	71
3. CAPÍTULOS.....	73
3.1- Capítulo I	77
3.2- Capítulo II	81
3.3- Capítulo III	87
3.4 Capítulo IV	93
3.5 Capítulo V	97
4. DISCUSSÃO GERAL.....	115
5. CONCLUSÃO GERAL.....	127
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
7. ANEXOS	169
ANEXO I.- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp.	171
ANEXO II. - Carta convite (<i>Invitation Letter</i>) – <i>Jonhs Hopkins University</i>	173
ANEXO III. - Autorização dos periódicos (<i>Copyright</i>) para inclusão dos artigos publicados na tese.....	175

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Bartonella é um gênero de bactérias consideradas de alta prevalência. Infecta tanto pacientes imunodeficientes como imunocompetentes. São patógenos negligenciados envolvidos em infecções crônicas, assintomáticas ou sintomáticas e que podem causar infecção fatal (Breitschwerdt *et al.*, 2000; Boulouis *et al.*, 2005; Fouch & Coventry, 2007; Maguiña *et al.*, 2009; Magalhães *et al.*, 2009; Bai *et al.*, 2011; Kosoy *et al.*, 2012).

Durante as duas últimas décadas, o número de espécies do gênero *Bartonella* expandiu rapidamente e hoje são descritas mais de 40 espécies e subespécies responsáveis por um grande número de doenças infecciosas emergentes e re-emergentes em humanos e animais (Breitschwerdt *et al.*, 2010a; Pérez-Martínez *et al.*, 2010; Kaiser *et al.*, 2011; Kosoy *et al.*, 2012).

Considera-se que essas bactérias sejam transmitidas por mordeduras de animais, arranhões ou por uma variedade de vetores (artrópodes sugadores de sangue), incluindo mosquitos, piolhos do corpo, carrapatos e pulgas. Animais de estimação, especialmente gatos e cães, são reservatórios para infecção humana (Skerget *et al.*, 2003; Lamas *et al.*, 2008; Chomel *et al.*, 2009). Os gatos são o reservatório primário para *Bartonella henselae* e são considerados os principais responsáveis pela transmissão da infecção aos humanos (Boulouis *et al.*, 2005; Breitschwerdt *et al.*, 2010a).

Atualmente, com o aumento significativo do número publicações, constata-se a relevância das bartoneloses na área médica (Kaiser *et al.*, 2011). Há pouco mais de uma década, a doença passou a receber mais atenção por parte de pesquisadores e a ser estudada com mais interesse em humanos, devido ao melhor conhecimento clínico e epidemiológico e também pelo aumento significativo do número de novas espécies descritas, em função dos avanços das técnicas de biologia molecular empregadas. Mas, infelizmente, pelo desconhecimento da doença e pela limitação de métodos diagnósticos com alta

sensibilidade e especificidade, os profissionais de saúde muitas vezes não fazem o diagnóstico correto das bartoneloses, o que contribui para a subnotificação da doença (Liu *et al.*, 2012).

As espécies de *Bartonella* são relacionadas a quatro doenças bem conhecidas: doença de Carrión, febre das trincheiras, doença da arranhadura do gato e angiomatose bacilar (Dehio, 2004; Liu *et al.*, 2012). Porém, especialmente na última década, estas bactérias têm sido relacionadas a um crescente número de manifestações clínicas (Lamas *et al.*, 2008; Maggi *et al.*, 2011).

No Brasil, existem poucos estudos sobre a ocorrência de infecções por bartonelas em humanos. Trabalhos publicados por este grupo de pesquisadores, utilizando microscopia eletrônica de transmissão e cultura da bactéria, demonstraram a aderência e a invasão da *B. henselae* em eritrócitos humanos maduros e também a capacidade da *B. henselae* sobreviver no sangue armazenado por 35 dias, ilustrando o potencial da infecção associado à transfusão sanguínea (Velho, 2001; Velho *et al.*, 2002; Velho *et al.*, 2003; Velho *et al.*, 2006; Velho *et al.*, 2007; Pitassi *et al.*, 2007; Magalhães *et al.*, 2008; Magalhães *et al.*, 2009; Pitassi *et al.*, 2010).

Considerando que o homem pode apresentar bacteremia assintomática por espécies intraeritrocitárias de *Bartonella*, a possibilidade de transfusão sanguínea por estas bactérias deve ser considerada. Como os receptores muitas vezes são ou podem tornar-se imunodeficientes, apresentam um risco maior de desenvolver formas graves de bartonelose.

Na Medicina Transfusional, infecções emergentes têm sido identificadas como uma constante ameaça para a saúde humana e são definidas como aquelas cuja incidência tem aumentado nas últimas duas décadas. Muitas destas infecções são conhecidas por serem transmissíveis por transfusão de sangue. A primeira infecção então emergente a ter um grande impacto sobre a segurança do sangue foi o vírus da imunodeficiência humana (HIV), além de outros exemplos de

agentes potencialmente transmissíveis por transfusão, como *Plasmodium* spp., *Babesia* spp., o *Trypanosoma cruzi* e a *B. henselae* (Stramer *et al.*, 2009).

A transmissão transfusional de espécies de *Bartonella* já foi documentada em gatos (Kordick *et al.*, 1999) e há relatos de transmissão sanguínea por agulhas contaminadas entre veterinários (Oliveira *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011). Esta possibilidade faz da infecção por estas bactérias um relevante problema em Saúde Pública e exige avaliação dos riscos e do impacto da transmissão da *Bartonella* spp. por meio de transfusões, especialmente para os pacientes imunodeficientes.

1.2 AS BARTONELAS

As bartonelas são pequenas bactérias gram-negativas de crescimento lento, cocobacilares, intracelulares, que necessitam para crescer de meios enriquecidos com sangue (coelho, carneiro ou cavalo) a 37 ° C e atmosfera com 5% de gás carbônico, sendo altamente adaptadas a um ou mais hospedeiros mamíferos (Slhessarenko, 1998; Maggi *et al.*, 2005a; Chomel *et al.*, 2011) (Figura 1). Como são organismos fastidiosos, o isolamento pela cultura se torna difícil, pois requerem um período de incubação prolongado e condições especiais de crescimento. O isolamento primário aparece após 12 a 14 dias em média e pode demorar até 45 dias (Maurin *et al.*, 1994; Jacomo *et al.*, 2002; Blanco & Raoult, 2005; Duncan *et al.*, 2007). O crescimento lento produz pouco CO₂ e os sistemas de hemocultivos automatizados utilizados na rotina hospitalar não detectam a multiplicação das bartonelas, além das culturas bacterianas serem desprezadas com 7 dias (Blanco *et al.*, 2008). Assim, a cultura sanguínea ou tecidual não se aplica à rotina dos laboratórios de patologia clínica, pois as tentativas de isolamento da *Bartonella* sp. são na maioria das vezes mal sucedidas (Bergmans *et al.*, 1997; Dorbecker *et al.*, 2006; Lynch *et al.*, 2011).

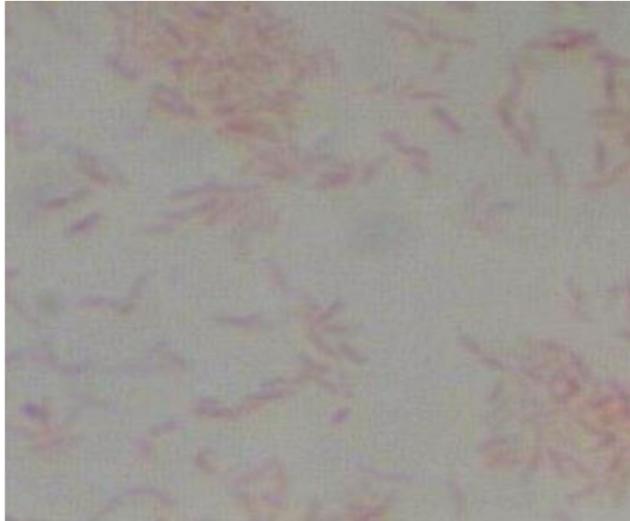


Figura 1. Coloração de Gram de isolado da *Bartonella henselae*

As *Bartonella* spp. são bactérias classificadas no subgrupo alfa-2 da classe *Proteobacteria* e pertencentes à ordem *Rhizobiales*. Fazem parte da família das *Bartonellaceae* e mantêm uma relação filogenética remota com os membros da ordem *Rickettsiales* (Chomel *et al.*, 2003; Dehio, 2004; Raoult *et al.*, 2005; Boulouis *et al.*, 2005;. Blanco *et al.*, 2008).

Quadro 1. Classificação taxonômica de *Bartonella* spp.

Classe <i>Proteobacteria</i>
Ordem <i>Rhizobiales</i>
Família <i>Bartonellaceae</i>
Gênero <i>Bartonella</i>

Por muitos anos, o gênero *Bartonella* foi formalmente reconhecido apenas com uma única espécie: *Bartonella bacilliformis*, o agente causador da doença de Carrión, também conhecida como bartonelose, e que compreende a febre de Oroya e verruga peruana.

No ano de 1991, pesquisadores observaram uma estreita relação filogenética entre a então chamada *Rochalimaea quintana* e a *B. bacilliformis* (O'Connor *et al.*, 1991). Em 1993, o gênero foi reclassificado considerando-se a semelhança existente entre o DNA das bactérias dos gêneros *Rochalimaea* e *Bartonella*, a homologia entre as sequências da subunidade 16S rRNA (região comum entre as bactérias gram-negativas) e o conteúdo de guanina-citosina de cada uma, além das suas características fenotípicas. Foi proposto que o gênero *Rochalimaea* fosse transferido da família *Rickettsiaceae* para a família *Bartonellaceae*, com a união dos gêneros *Bartonella* e *Rochalimaea*, mantendo-se o primeiro nome por ser este o mais antigo. Assim, as quatro espécies do gênero extinto passaram a ser chamadas de *B. quintana*, *B. vinsonii*, *B. henselae* e *B. elizabethae* (Brenner *et al.*, 1993). Dois anos após esta reclassificação foi proposto que o gênero *Grahamella* também deveria ser incluído nesta família (Birtles *et al.*, 1995).

Estudos indicam que *Bartonella* spp. têm algum grau de parentesco com outras proteobactérias incluindo *Brucella* spp., *Afipia* spp., *Agrobacterium tumefaciens*, *Bradyrhizobium* spp. e *Bosea* spp. (Houpikian & Raoult, 2001; Greub & Raoult, 2002; Jacomo *et al.*, 2002, Pretorius *et al.*, 2004; Rolain *et al.*, 2004; Duncan *et al.*, 2007).

A classificação das bartonelas se baseia essencialmente em estudos genéticos. Diferentes métodos moleculares têm sido utilizados na detecção e diferenciação das espécies de *Bartonella*, através das regiões do gene 16S rRNA, a região intergênica (ITS) 16S-23S rRNA, o gene da citrato sintase (*gltA*) ou da riboflavina sintase (*ribC*), o gene da proteína de choque térmico (*groEL*), o gene de uma proteína de divisão celular (*FtsZ*) ou o gene da subunidade beta da RNA

polimerase (rpoB) e um antígeno de 17kDa (Roux & Raoult, 1995; La Scola *et al.*, 2003; Boulouis *et al.*, 2005; Chomel *et al.*, 2009).

Com o isolamento e a caracterização parcial de novas espécies de bartonelas em mamíferos, muitas cepas destas bactérias ainda estão sendo reivindicadas como novas espécies, sendo chamadas de '*Candidatus*' (Maggi *et al.*, 2009; Saisongkorh *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2010; Inoue *et al.*, 2010; Kaewmongkol *et al.*, 2011). Atualmente, o número de novas espécies propostas é difícil de ser mensurado, especialmente se o nome das espécies publicadas nos periódicos *Journal of Clinical Microbiology* e *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* são comparados com as que aparecem no *GenBank*. Esta mudança taxonômica se torna especialmente evidente entre as bartonelas por causa da alta diversidade genética e plasticidade ecológica deste gênero (Kosoy *et al.*, 2012).

Alguns destes agentes emergentes têm sido associados a doenças humanas, mas o potencial de patogenicidade destes ainda é desconhecido (Kosoy *et al.*, 2012), sendo crescente o número de espécies consideradas patogênicas ao homem. Hoje, pelo menos 17 espécies de *Bartonella* são associadas a doenças humanas (Breitschwerdt *et al.*, 2010a) (Quadro 2). O espectro inclui doenças graves como encefalopatia, endocardite, neuropatias motoras e sensoriais, derrame pleural e pericárdico, pneumonia e anemia hemolítica (Van Audenhove *et al.*, 2001; Maggi *et al.*, 2011). Há também evidências de envolvimento de espécies de *Bartonella* em pacientes com disfunção neurológica e neuro-cognitiva, transtorno bipolar, demência, hepatite criptogênica, eritema nodoso, granuloma anular (Figura 2), eritema multiforme, exantemas, púrpura trombocitopênica, uveítes, adenopatia crônica, febre de origem indeterminada, síndrome da fadiga crônica e bacteremia assintomática (Anderson & Neuman, 1997; Jacobs & Schutze, 1998; Cunningham & Koehler, 2000; Tsukahara *et al.*, 2000; Van Audenhove *et al.*, 2001; Jacomo *et al.*, 2002; Gerber *et al.*, 2002; Levy *et al.*, 2003; Dehio, 2004; Drancourt *et al.*, 2004; Blanco & Raoult, 2005; Fouch & Coventry,

2007; Velho *et al.*, 2007; Billeter *et al.*, 2008; Breitschwerdt *et al.*, 2008; Curi *et al.*, 2010, Maggi *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011).



Figura 2. Granuloma anular – lesões anulares de bordas pápulo-eritematosas e descamativas em paciente com linfadenomegalia persistente (Ambulatório de Dermatologia do Hospital de Clinicas da Unicamp).

Quadro 2. Principais espécies de *Bartonella* patogênicas ao homem.

Espécies de <i>Bartonella</i>	Vetores	Reservatórios	Doenças no homem
<i>B. bacilliformis</i>	<i>Lutzomyia verrucarum</i>	Homem	DC, BAC
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>vinsonii</i>	Desconhecido	Roedores	Desconhecido
<i>B. quintana</i>	Piolho do corpo (<i>Pediculus humanus corporis</i>), pulga gatos (<i>Ctenocephalides felis</i>), carrapato (<i>Ixodes pacificus</i>)	Homem	FT, DAG, AB, LC, BAC, END, SEP
<i>B. henselae</i>	Pulga dos gatos (<i>Ctenocephalides felis</i>) e carrapatos (<i>Ixodes pacificus</i> e <i>Ixodes ricinus</i>)	Gato, cão, homem e outros	DAG, AB, PBH, LC, BAC, END, SEP, ENC
<i>B. elizabethae</i>	Pulga dos roedores (<i>Ctenophthalmus nobilis</i>)	Rato	END, Neurorretinite
<i>B. grahamii</i>	Pulgas dos roedores (<i>Ctenophthalmus nobilis</i>)	Camundongo	Neurorretinite
<i>B. doshiae</i>	Pulga dos ratos (<i>Xenopsylla cheopis</i>)	Roedores	DAG, Neurorretinite
<i>B. clarridgeiae</i>	Pulga dos gatos (<i>Ctenocephalides felis</i>), pulga dos roedores (<i>Ctenophthalmus nobilis</i>)	Gato	DAG, END, SEP
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	Carrapato (<i>Ixodes pacificus</i>)	Cão	END, artralgia, mialgia, cefaléia, fadiga
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i>	Carrapato (<i>Ixodes pacificus</i>)	Cão, camundongo, homem	BAC, END, febre, valvulopatia
<i>B. chomelii</i>	Desconhecido	Gado	BAC
<i>B. koehlerae</i>	Gato, pulga dos roedores	Gato	END, DAG
<i>B. alsatica</i>	Pulgas?	Coelho	END, linfadenite
<i>B. washoensis</i>	Carrapato (<i>Ixodes pacificus</i>), esquilos	Roedores	Miocardite, febre
<i>B. tamiiae</i>	Rato?	Rato	Febre
<i>B. rochalimae</i>	Desconhecido (provavelmente <i>L. verrucarum</i>)	Desconhecido	BAC, febre, lesões cutâneas
' <i>Candidatus B. melophagi</i> '	Desconhecido	Ovelha	BAC

DC, doença de Carrión; FT, febre das trincheiras; DAG, doença da arranhadura do gato; AB, angiomatose bacilar; PBH, peliose bacilar hepática; LC, linfadenopatia crônica; BAC, bacteremia; END, endocardite; SEP, septicemia; ENC, encefalopatia.

A fisiopatologia da infecção pelas diferentes espécies de *Bartonella* é bastante complexa. Algumas espécies desta bactéria têm capacidade de invadir células vermelhas do sangue, causar bacteremia persistente e induzir vasoproliferação nas células endoteliais (Benson *et al.*, 1986; Garcia *et al.*, 1990; Batterman *et al.*, 1995; Kordick & Breitschwerdt, 1995; Brouqui & Raoult 1996; Mehock *et al.*, 1998; Rolain *et al.*, 2001; Resto-Ruiz *et al.*, 2003; Pitassi *et al.*, 2007; Pulliainen & Dehio, 2012). Esta última característica nos humanos é única no gênero *Bartonella* (Anderson & Neuman, 1997; Mosepele *et al.*, 2012; Pulliainen & Dehio, 2012).

Outras células que as *Bartonella* spp. colonizam são as células endotélias (Hill *et al.*, 1992; Dehio *et al.*, 1997) os monócitos, macrófagos e células dendríticas (Musso *et al.*, 2001; Resto-Ruiz *et al.*, 2002; Schulte *et al.*, 2006; Vermi *et al.*, 2006; Pulliainen & Dehio, 2012). As *Bartonella* spp. também podem infectar culturas de células epiteliais, no entanto, a relevância deste modelo de infecção *in vitro* ainda não foi confirmada *in vivo* (Hill *et al.*, 1992; Batterman *et al.*, 1995; Kempf *et al.*, 2005; Truttmann *et al.*, 2011).

A bactéria pode persistir no sangue de hospedeiros naturais, de forma assintomática e por longos períodos, causando uma bacteremia intraeritrocitária persistente como marca da infecção. Isto permite uma maior oportunidade para ocorrer a transmissão da bartonela entre os hospedeiros (Jacomo *et al.*, 2002; Dehio, 2004; Rolain *et al.*, 2004; Boulouis *et al.*, 2005; Eicher & Dehio, 2012; Harms & Dehio, 2012; Pulliainen & Dehio, 2012).

A própria infecção por estes agentes é imunossupressora como bem estudada na doença de Carrión onde há, inclusive, inversão na relação CD4/CD8 (Chian *et al.*, 2002; Huarcaya *et al.*, 2011). Os imunodeficientes são os mais susceptíveis à infecção por *B. henselae* ou *B. quintana*, resultando num quadro clínico mais grave em comparação com o hospedeiro imunocompetente (Mosepele *et al.*, 2012).

Inúmeras perguntas sobre a patogênese molecular das *Bartonella* spp. permanecem ainda sem resposta, visto que o conhecimento disponível muitas vezes parece ser fragmentado. A investigação microbiológica, molecular e celular *in vitro* e *in vivo* nas infecções por bartonela é essencial para compreender a patogênese da doença em humanos (Harms & Dehio, 2012).

Uma das características das bartonelas é que uma mesma espécie pode produzir diferentes manifestações clínicas, fazendo com que a abordagem do diagnóstico e a terapêutica sejam diferentes dependendo das apresentações. Não existe um diagnóstico laboratorial padrão para as infecções causadas por bartonelas, sendo atualmente baseado na sorologia por Imunofluorescência Indireta (IFI), Ensaio Imunoenzimático Ligado à Enzima (ELISA), *Western blot*, culturas ou PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase) (La Scola & Raoult, 1996; Blanco & Raoult, 2005; Guptill, 2010; Breitschwerdt *et al.*, 2010b; Vermeulen *et al.*, 2010) (Figuras 3 a 6). A falta de padronização destas técnicas e a inexistência de um teste com sensibilidade e especificidade adequadas têm gerado inconstância nos resultados diagnósticos (Houpikian & Raoult, 2003; Olarte *et al.*, 2012).

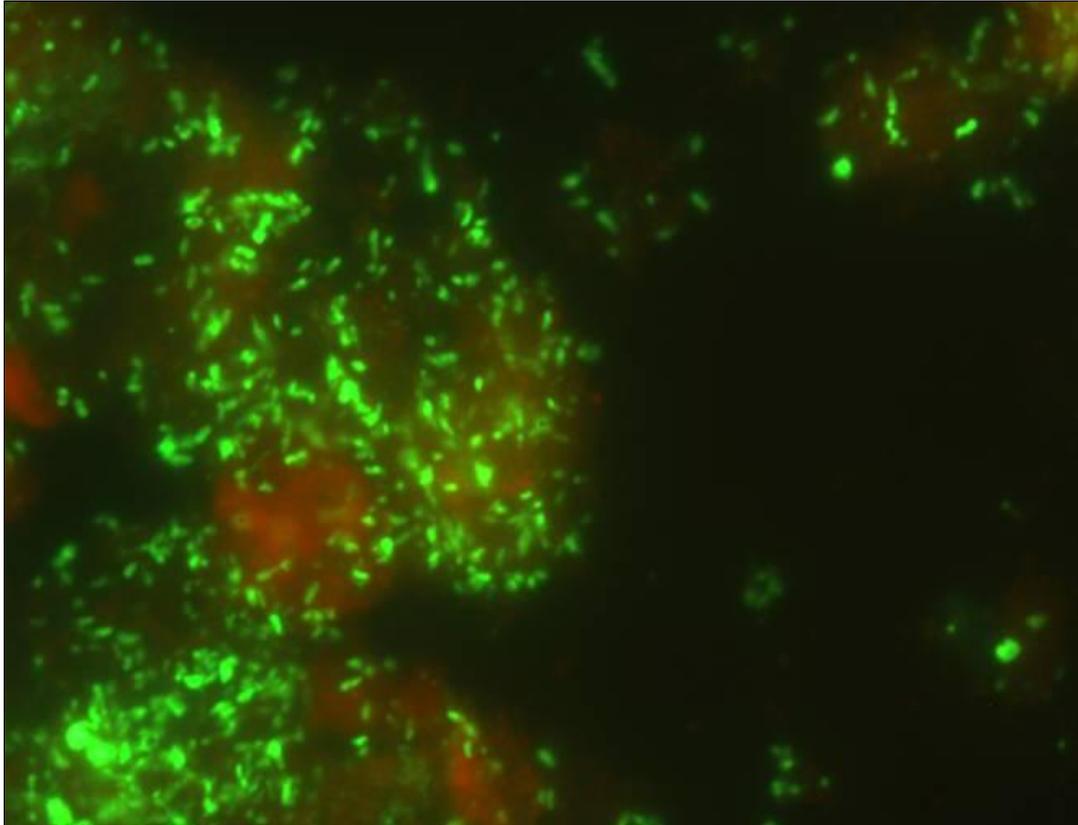


Figura 3. Reação de Imunofluorescência Indireta positiva para *Bartonella henselae* (Laboratório de Patologia/Microbiologia, Johns Hopkins Hospital, EUA) (Aumento de 1000x).



Figura 4. (A, B e C). Culturas líquidas de enriquecimento semeadas em meio sólido de Ducrey (Laboratório de Bartonelose da Unicamp).

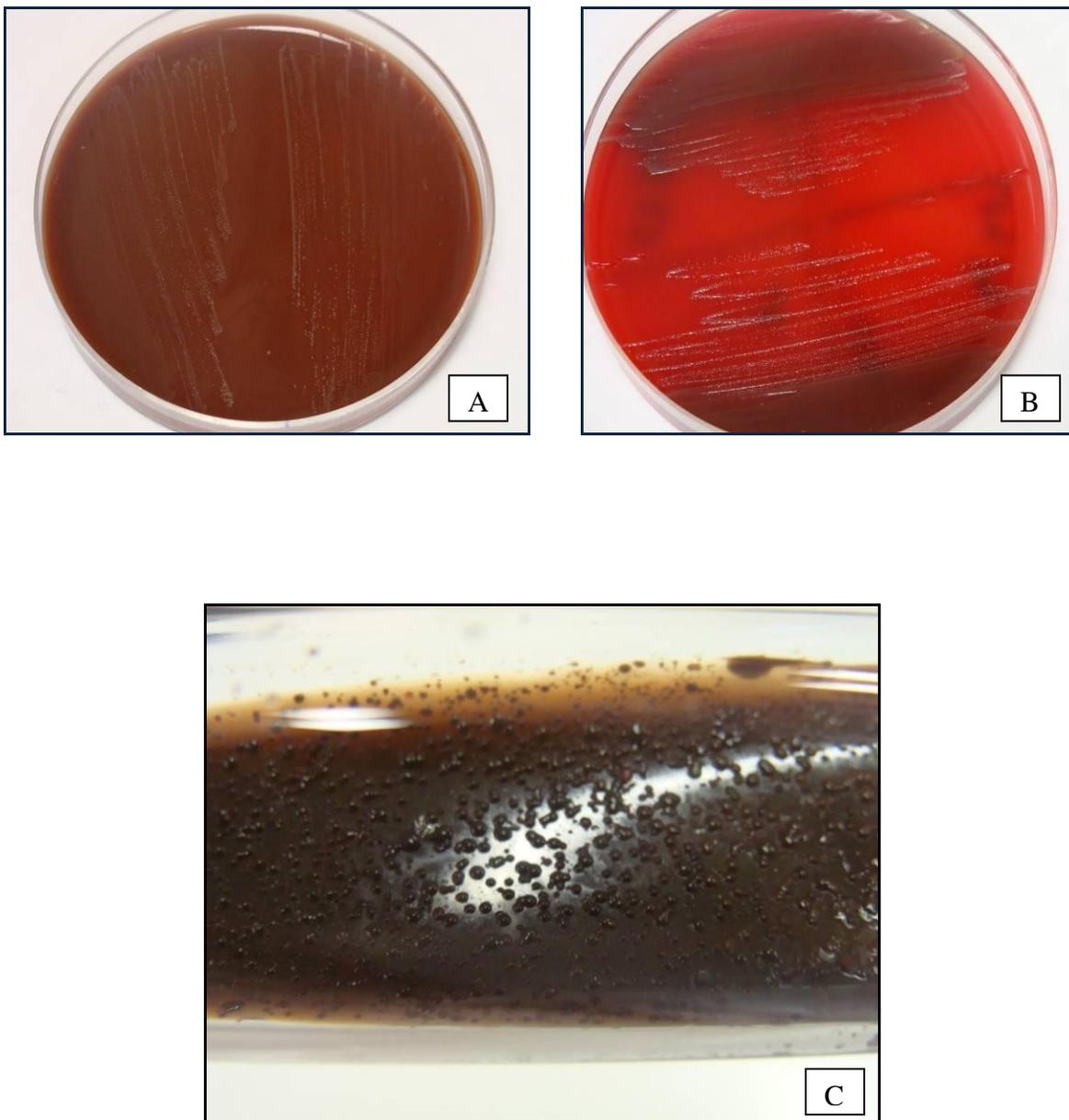


Figura 5. (A, B e C). Culturas sólidas – Placas de ágar chocolate e sangue semeadas mostrando o crescimento das colônias de *Bartonella* spp. (Laboratório de Bartonelose da Unicamp).

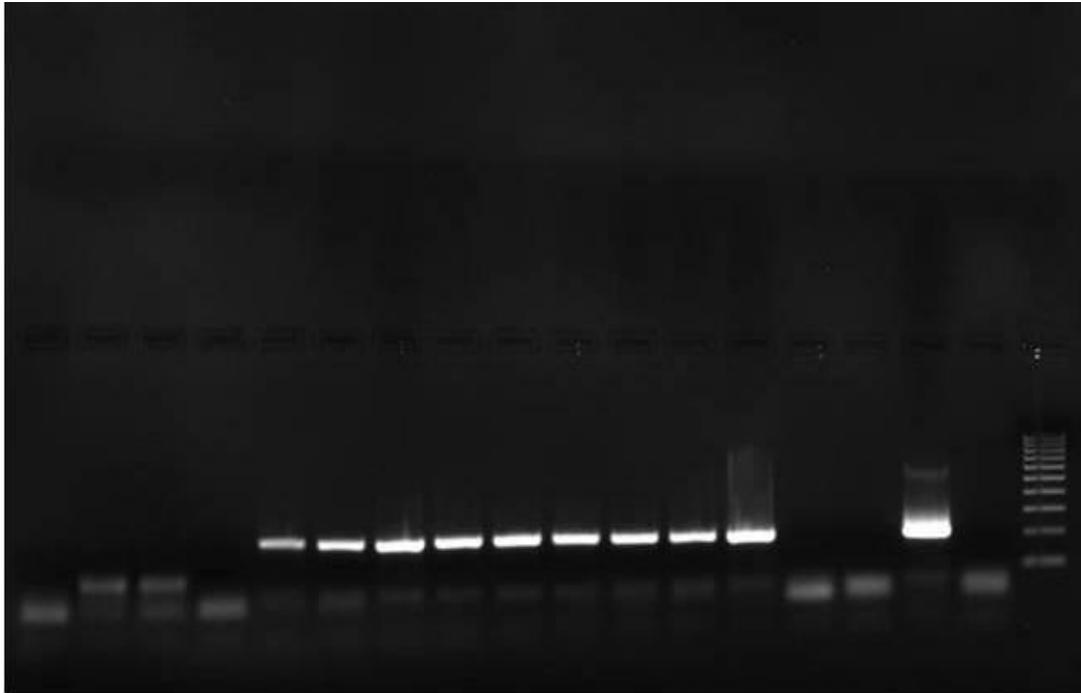


Figura 6. Fotomicrografia da eletroforese em gel de agarose a 2% de uma reação de PCR (Laboratório de Bartonelose da Unicamp).

Na prática médica, o método de escolha é o teste sorológico para detecção de anticorpos anti-*B. henselae* e anti-*B. quintana*. Mas, a IFI pode sofrer uma alta porcentagem de resultados falso-negativos (Sekeyova *et al.*, 2012) e falso-positivos por reação cruzada com outros patógenos intracelulares, por exemplo, *Chlamydia* spp. (Maurin *et al.*, 1997; Brouqui & Raoult, 2006; Maggi *et al.*, 2012), *Coxiella burnetii* (La Scola & Raoult, 1996; Blanco & Raoult, 2005; Rahimian *et al.*, 2006), *Ehrlichia* spp., *Mycoplasma pneumoniae*, *Rickettsia* spp., *Treponema pallidum* (McGill *et al.*, 1998), *Bordetella pertussis* e *Borrelia* spp. (McGill *et al.*, 2005). Além disso, os resultados dos testes de IFI podem ser influenciados pela variação antigênica das cepas (Riess *et al.*, 2007).

Sabe-se hoje que várias técnicas precisam ser utilizadas concomitantemente para evitar resultados falso-negativos (Maggi *et al.*, 2011).

1.3 TRANSMISSÃO

As bartoneloses humanas têm como vetores ectoparasitas sugadores de sangue e são transmitidas aos seres humanos por uma variedade de artrópodes, incluindo os flebotomíneos (*Lutzomyia verrucarum*), piolhos do corpo (*Pediculus humanus corporis*), pulgas (*Ctenocephalides felis*), pulgas dos roedores (*Ctenophthalmus nobiles*) e carrapatos (Chang *et al.*, 2001; Breitschwerdt *et al.*, 2007; Podsiadly *et al.*, 2009; Chomel *et al.*, 2009; Breitschwerdt *et al.*, 2010a; Tsai *et al.*, 2011). Nos últimos 15 anos, um número crescente de espécies de *Bartonella* foi isolado de novos artrópodes hematófagos, incluindo várias espécies de carrapatos, tais como *Ixodes* spp., *Dermacentor* spp., *Rhipicephalus sanguineus*, *Haemaphysalis* spp., pulgas de humanos (*Pulex irritans*), além de moscas de veados (*Lipoptena cervi*, *Lipoptena mazamae*) (Kruszewska *et al.*, 1996; Dehio *et al.*, 2004; Halos *et al.*, 2004; Reeves *et al.*, 2006; Sreter-Lancz *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2008; Tsai *et al.*, 2011).

A *Lutzomyia verrucarum*, um mosquito flebotomíneo nativo do Peru, é o vetor natural da *B. bacilliformis*, agente da doença de Carrión. A *L. verrucarum* e a *L. noguchii* foram capazes de causar bacteremia por *B. bacilliformis* e induzir verruga peruana em macacos sob condições experimentais (Noguchi *et al.*, 1929). A distribuição do *L. verrucarum* ocorre entre latitudes específicas e a ocorrência da doença em outras áreas em que este vetor não está presente sugere a existência de vetores secundários envolvidos na transmissão da doença (Caceres, 1993; Maguiña & Gotuzzo, 2000; Chomel *et al.*, 2009; Clemente *et al.*, 2012).

O papel dos piolhos na transmissão da doença foi relatado em 1919 (Byam *et al.*, 1919). Estudos recentes detectaram, por meio da PCR, *B. quintana* em piolhos (*Pediculus humanus humanus*) de pessoas desabrigadas no Zimbábue, França, Rússia e Japão, pessoas em campos de refugiados no Burundi e em comunidades rurais no Peru (Tsai *et al.*, 2011). Em Marselha, França, os piolhos do corpo coletados de pessoas desabrigadas eram mais

propensos a ser *B. quintana*-PCR positivos, sendo este fato associado com a ocorrência de bacteremia (Foucault *et al.*, 2002).

A *B. quintana* foi isolada de humanos, de piolhos do corpo e também de mamíferos naturalmente infectados (um macaco cynomolgus, dois gatos e dois cães) (O'Rourke *et al.*, 2005; Kelly *et al.* 2006; Breitschwerdt *et al.*, 2007), além de pulgas *Ctenocephalides felis* (Rolain *et al.*, 2003c) e carrapatos (Chang *et al.*, 2001). Estes dados sugerem que o ciclo epidemiológico da *B. quintana* pode ser mais complexo do que se pensava, com vários vetores e mamíferos reservatórios envolvidos na transmissão desta bactéria (Chomel *et al.*, 2009).

As pulgas desempenham um papel importante na manutenção e na transmissão de espécies de *Bartonella* entre os gatos e roedores (Marié *et al.*, 2006; Rolain *et al.*, 2003c; Telfer *et al.*, 2007; Kosoy *et al.*, 2012). As *Bartonella* spp. também têm sido detectadas em pulgas humanas (*Pulex* spp.) que infestavam pessoas no Peru (Parola *et al.*, 2002). Uma das espécies identificadas foi *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* que é associada a arritmias cardíacas, endocardite e miocardite em humanos e cães (Breitschwerdt *et al.*, 1995; Roux *et al.*, 2000; Chomel *et al.*, 2009; Tsai *et al.*, 2011). A *B. henselae* foi isolada primeiramente de pulgas (*Ctenocephalides felis*) coletadas de gatos bacterêmicos (Koehler *et al.*, 1994). Demonstrou-se experimentalmente que a transmissão da bactéria entre os gatos acontecia somente se houvesse pulgas infectadas pela *B. henselae* (Chomel *et al.*, 1996; Chomel *et al.*, 2009).

Recentemente, os carrapatos foram incluídos como vetores para as espécies de *Bartonella* (Reis *et al.*, 2011), além de moscas identificadas com o DNA de *Bartonella* também serem consideradas vetores para a transmissão da bactéria entre os ruminantes (Chomel *et al.*, 2009).

Em geral, verifica-se que a diversidade do DNA das espécies da *Bartonella* identificadas em ectoparasitas é muito maior do que nos hospedeiros mamíferos, sugerindo um mecanismo de adaptação da bactéria ao ecossistema do hospedeiro vetor (Chomel *et al.*, 2009; Tsai *et al.*, 2011).

Os seres humanos e outros mamíferos são os principais reservatórios para espécies de *Bartonella*. Embora as bartonelas possam parasitar uma ampla variedade de mamíferos, é demonstrada a existência de uma associação entre espécies de *Bartonella* e seus hospedeiros (Houpikian & Raoult, 2001; Chomel *et al.*, 2009; Kosoy *et al.*, 2012). Como exemplo, a *B. alsatica* é isolada em coelhos (Heller *et al.*, 1999), a *B. henselae*, *B. koehlerae* e *B. clarridgeiae* são comuns entre os gatos (Heller *et al.*, 1997; Kordick *et al.*, 1997). Os cães representam um reservatório para *B. henselae* (Keret *et al.*, 1998, Tsukahara *et al.*, 1998; Kaiser *et al.*, 2011) e também para *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* (Breitschwerdt *et al.*, 1995). O homem serve como reservatório natural para a *B. bacilliformis* e para a *B. quintana* (Jacomio *et al.*, 2002; Chomel *et al.*, 2004; Mosepele *et al.*, 2012).

São considerados reservatórios destas bactérias os gatos, cães, veados, leões, bovinos, coelhos, roedores, golfinhos, ruminantes, tartarugas marinhas e o homem (Maggi *et al.*, 2005b; McGill *et al.*, 2005; Manfredi & Sabbatani, 2006; Eremeeva *et al.*, 2007; Valentine *et al.*, 2007; Mosepele *et al.*, 2012). Na verdade, relatórios e descrições de novos genótipos de espécies de *Bartonella* continuam a surgir em muitos outros grupos de mamíferos, incluindo os morcegos insetívoros e carnívoros, ruminantes domésticos e selvagens, mamíferos marinhos e primatas (Kosoy, 2010; Kosoy *et al.*, 2012).

Há uma forte associação entre cepas específicas de *Bartonella* spp. com hospedeiros roedores: *B. elizabethae* em ratos no sul da China (Ying *et al.*, 2002) e na Tailândia (Castle *et al.*, 2004) e *B. vinsonii* subsp. *arupensis* em ratos *Peromyscus* sp. no sudeste dos Estados Unidos (Kosoy *et al.*, 1997; Bai *et al.*, 2011).

Bartonella spp. foram detectadas em morcegos insetívoros no Reino Unido (Concannon *et al.*, 2005) e América Central (Bai *et al.*, 2011) e em morcegos frutívoros na África (Kosoy *et al.*, 2010).

A estratégia de infecção das bartonelas é um mecanismo específico de adaptação aos hospedeiros e é compartilhada pela maioria das espécies de

Bartonella. A exceção conhecida à regra é a *B. bacilliformis*, que pode provocar hemólise maciça em eritrócitos humanos, originando uma anemia hemolítica fatal (Maguiña *et al.*, 2009; Harms & Dehio, 2012). A anemia grave também foi descrita em pacientes com infecção por *B. henselae* (Van Audenhove *et al.*, 2001; Velho *et al.*, 2007).

1.4 EPIDEMIOLOGIA

Sabe-se hoje que a prevalência de espécies de *Bartonella* é extremamente elevada, apresentando uma enorme diversidade genética nos mamíferos infectados, especialmente em espécies de morcegos e roedores em todo o mundo, com constante reconhecimento do número dos seus respectivos hospedeiros (Anderson & Neuman, 1997; Kosoy *et al.*, 1997; Breitschwerdt & Kordick, 2000; Ying *et al.*, 2002; Castle *et al.*, 2004; Jardine *et al.*, 2005; Boulouis *et al.*, 2005; Bai *et al.*, 2011). Este fato propiciou novos estudos e resultou na descrição de espécies de *Bartonella* em roedores de vários países da África (Pretorius *et al.*, 2004; Bitam *et al.*, 2009), das Américas do Norte e do Sul (Kosoy *et al.*, 1997; Birtles *et al.*, 1999; Ellis *et al.*, 1999a; Jardine *et al.*, 2005; Bai *et al.*, 2008), da Ásia (Ying *et al.*, 2002; Castle *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2007a,b; Bai *et al.*, 2009), da Austrália (Gundi *et al.*, 2009) e da Europa (Heller *et al.*, 1998, Heller *et al.*, 1999, Gundi *et al.*, 2004).

Com relação à diversidade das espécies de *Bartonella*, a *B. bacilliformis* seria a única espécie sobrevivente de uma antiga linhagem bacteriana, todas as outras bartonelas seriam derivadas de uma mesma linhagem moderna (Saenz *et al.*, 2007; Eicher & Dehio, 2012).

Em estudos mais recentes, pesquisadores demonstraram o DNA da *B. quintana* na polpa dentária de uma pessoa originária do sudeste da França que morreu há 4000 mil anos atrás (Drancourt *et al.*, 2005) e nos restos mortais de soldados do Grande Exército de Napoleão em Vilnius, na Lituânia, enterrados em 1912 (Raoult *et al.*, 2006). A febre das trincheiras é uma das mais antigas doenças

bacterianas registradas em seres humanos, tal como a tuberculose, que também foi detectada nos restos mortais de uma pessoa que faleceu há 5.400 anos no Egito conforme citado por Drancourt *et al.*, 2005.

Em determinadas regiões, a soroprevalência das bartonelas em humanos é encontrada em mais de 50% da população (Wagner *et al.*, 2008; Pandak *et al.*, 2009). Em populações normais a soropositividade foi de 2 a 6% nos Estados Unidos, 19% na Alemanha, 23% na Áustria, 48% na Suíça (Pandak *et al.*, 2009). Kosek e colaboradores (2000) mostraram alta soroprevalência (77,5%) para *B. bacilliformis* no Peru em 554 indivíduos testados, sendo que a maioria dos pacientes sororreativos eram assintomáticos. Entre os doadores de sangue, alguns estudos revelam alta soropositividade anti-*B. henselae*. Em Creta, Grécia, a soroprevalência foi de 21,6% (Minadakis *et al.*, 2008), na Croácia foi de 57,4% (Pandak *et al.*, 2009), na Turquia foi de 6% (Yilmaz *et al.*, 2009), na Itália foi de 11.4% (Mansueto *et al.*, 2012).

Um estudo soroepidemiológico brasileiro realizado em população saudável para *B. quintana* e para *B. henselae*, na região de Minas Gerais, evidenciou taxas de soroprevalência na população estudada, respectivamente de 13,7% e 12,8% (Costa *et al.*, 2005). Em pacientes HIV soropositivos e em populações humanas saudáveis, a soroprevalência para *Bartonella* spp. foi de 38,4% e de 34%, respectivamente, em Jacarepaguá, RJ (Lamas *et al.*, 2010).

Não existem dados suficientes para determinar a incidência ou prevalência da infecção por *Bartonella* spp. em humanos.

A prevalência de *Bartonella* spp. entre animais brasileiros tem sido estudada. Na cidade de Botucatu, São Paulo, os anticorpos de *B. henselae* e *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* foram detectados em 2% (4/197) e 1,5% (3/197) dos cães estudados, respectivamente (Diniz *et al.*, 2007). Entre os felinos selvagens, Filoni e colaboradores (2006) demonstraram uma prevalência de 95% (20/21) de *B. henselae*. Um estudo realizado sobre a soroprevalência em gatos recolhidos nas ruas da cidade de São Paulo revelou 46% soropositividade para espécies de

Bartonella (Slhessarenko *et al.*,1996). No estado do Rio de Janeiro, a taxa de sororeatividade para *Bartonella* spp. foi de 35,7% entre os gatos pertencentes a indivíduos HIV soropositivos (Lamas *et al.*, 2010). Em dois outros estudos realizados em gatos na cidade do Rio de Janeiro, Souza e colaboradores (2010) demonstraram 25% de soropositividade para *Bartonella* spp. nas amostras analisadas e Crissiuma e colaboradores (2011) revelaram 47,5% de soropositividade para *B. henselae*. Em São Paulo, na cidade de Campinas foi realizado um estudo, usando a associação de cultura líquida, cultura sólida, PCR e nested PCR, que detectou o DNA de *B. henselae* em 90% dos gatos estudados em pelo menos um dos testes realizados (Drummond, 2012).

Estudos moleculares realizados em 200 gatos, testados para vários genes, na cidade de São Luiz, Maranhão, revelaram nove gatos (4,5%) positivos para *Bartonella* spp: seis gatos para *B. henselae* e três para *B. clarridgeiae* (Braga *et al.*, 2012).

1.5 BARTONELOSES

Clinicamente, as espécies de *Bartonella* mais importantes e que são associadas ao maior número de doenças em seres humanos são a *B. bacilliformis* (agente da febre de Oroya e da verruga peruana), a *B. henselae* (agente da doença da arranhadura do gato, da angiomatose bacilar, da peliose bacilar hepática, de endocardite e de septicemia) e a *B. quintana* (agente da febre das trincheiras, da angiomatose bacilar, de bacteremia e de endocardite) (Anderson & Neuman, 1997; Dehio, 2004; Liu *et al.*, 2012). A *B. henselae* e a *B. quintana* estão relacionadas com a maioria das taxas de morbidade e mortalidade em indivíduos imunodeficientes e a *B. henselae* é a espécie mais frequentemente associada a doenças humanas (Fournier *et al.*, 2001; Koehler *et al.*, 2003; Mosepele *et al.*, 2012; Harms & Dehio, 2012). Estas espécies causam um espectro de doenças específicas em hospedeiros imunodeficientes, como nos pacientes com aids e nos etilistas crônicos, causando febre de origem desconhecida, endocardite com

cultura negativa, osteomielite e lesões angioproliferativas mais frequentes na pele, fígado e baço (Mosepele *et al.*, 2012).

As manifestações clínicas mais comuns da infecção por *B. henselae* e *B. quintana* encontradas nos pacientes HIV soropositivos são as lesões de angiomatose bacilar, peliose hepática e bacteremia recorrente e a febre (Koehler *et al.*, 2003, Mosepele *et al.*, 2012).

Em pacientes submetidos a transplante de fígado, a infecção por *B. henselae* pode causar massas hepáticas (Thudi *et al.*, 2007), granulomas hepáticos (Humar & Salit, 1999) ou doença disseminada (Bonatti *et al.*, 2006).

A infecção por *B. quintana* e também por *B. henselae* (esta última menos frequente), entre os pacientes sem domicílio e que apresentam etilismo crônico, tem como manifestação clínica mais comum a endocardite subaguda com cultura negativa, além de quadros de angiomatose bacilar, endocardite e bacteremia assintomática crônica (Spach *et al.*, 1995a; Raoult *et al.*, 1996; Martín *et al.*, 2009; Bibhuti *et al.*, 2009; Dimopoulos *et al.*, 2012; Olarte *et al.*, 2012).

Como a gravidade da infecção está relacionada com o estado imunológico, as pessoas imunodeficientes podem desenvolver manifestações sistêmicas e também são susceptíveis à bacteremia por *Bartonella* spp. e à disseminação da doença para outros órgãos. Já foram descritas manifestações respiratórias (nódulos pulmonares e massas cervicais) (Manfredi & Sabbatani, 2006), gastrointestinais (hepatoesplenomegalia, hepatite granulomatosa, peliose bacilar hepática e abscesso hepático) (Thudi *et al.*, 2007; Bonatti *et al.*, 2006; Humar & Salit, 1999), cardíacas (derrame pericárdico, miocardite e endocardite) (Levy *et al.*, 2003; Blanco & Raoult, 2005), hematológicas (anemia hemolítica e trombocitopenia) (Van Audenhove *et al.*, 2001; Breitschwerdt *et al.*, 2010a), neurológicas (cefaléia crônica, abscesso cerebral, encefalite, convulsão, meningite asséptica e mielite) (Gerber *et al.*, 2002; Fouch & Coventry, 2007; Breitschwerdt *et al.*, 2009), oftalmológicas (síndrome de Parinaud, neuropatia óptica, retinite aguda, uveíte e endoftalmite) (Cunningham & Koehler, 2000; Drancourt *et al.*, 2004) e

dermatológicas (eritema nodoso, granuloma anular, eritema polimorfo, exantema e púrpura) (Velho *et al.*, 2003; Florin *et al.*, 2008). Febre persistente de origem indeterminada (Jacobs & Schutze, 1998; Tsukahara *et al.*, 2000), fadiga crônica e bacteremia assintomática também têm sido detectadas em pessoas infectadas pela *B. henselae* (Blanco & Raoult, 2005; Chomel *et al.*, 2006; Magalhães *et al.*, 2010; Harms & Dehio, 2012).

O tratamento das bartoneloses depende da expressão clínica, do sistema imune do hospedeiro e da gravidade da doença. Algumas doenças causadas por *Bartonella* spp. podem ter resolução espontânea, mas, em outros casos, a doença pode ser fatal sem o uso de antibióticos adequados (Rolain *et al.*, 2004; Fouch & Coventry, 2007). A experiência de tratamento em bartoneloses humanas é vista em uma das três principais categorias: (1) indivíduos com DAG (Margileth, 1992; Bass *et al.*, 1998; Rolain *et al.*, 2004), (2) indivíduos imunodeficientes (receptores de transplantes, quimioterapia imunossupressora e infectados com o HIV) (Koehler *et al.*, 2003) e (3) pacientes com endocardite por *B. quintana* e *B. henselae* (Dorbecker *et al.*, 2006; Breitschwerdt *et al.*, 2010a). Entretanto, a terapêutica das *Bartonella* spp. não é padronizada, há falta de dados microbiológicos em estudos clínicos terapêuticos e os resultados publicados são baseados na experiência clínica e em estudos de sensibilidade *in vitro* (Pérez-Martínez *et al.*, 2010).

1.5.1 Doença de Carrión

A bartonelose de Carrión, causada pela *B. bacilliformis*, foi descrita há milhares de anos causando doença debilitante e morte desde os tempos da era pré-Inca, sendo documentada através de desenhos da verruga peruana reproduzidos em estatuetas de cerâmica feitas por índios pré-colombianos. A doença era restrita a certas regiões da Cordilheira dos Andes no Peru, sendo o gênero *Bartonella* representado por apenas esta espécie por mais de 80 anos (Kosek *et al.*, 2000; Chamberlin, 2002) (Figura 7).



Figura 7. Cerâmicas peruanas correspondentes à fase crônica da doença de Carrión, a verruga peruana (Pachas, 2001).

A bartonelose peruana é chamada de doença de Carrión após Daniel Alcides Carrión, um estudante de medicina peruano, provar em 1885 que a febre de Oroya e a verruga peruana eram fases da mesma doença. Depois de inocular-se com sangue proveniente de uma lesão cutânea de verruga peruana, ele desenvolveu a forma aguda da doença e morreu 21 dias mais tarde. Carrión é considerado um mártir da medicina peruana sendo designado no Peru o dia 05 de outubro como o “Dia da Medicina” em sua homenagem (Pamo, 2012).

A doença tem um curso clínico bifásico, sendo que a fase aguda da doença, chamada febre Oroya, foi descrita durante um surto, em 1870, associado com a construção de uma estrada de ferro de Lima a La Oroya. Nesta época, mais de 7000 trabalhadores morreram, causando grande preocupação na comunidade local e científica, com o registro de valiosas observações sobre a doença (Cueto, 1996; Pamo, 2012).

A primeira fase, aguda ou febril anêmica, é caracterizada por uma bacteremia intraeritrocitária, que ocorre após um período de incubação média de duas semanas. A mortalidade está em torno de 44-88% em indivíduos não tratados, sendo as crianças pequenas as mais afetadas nas comunidades

endêmicas, supostamente devido à imunidade protetora que se desenvolve com as infecções repetidas (Brenã Chávez *et al.*, 2006).

Características da fase aguda incluem febre, mal estar e um rápido início de anemia hemolítica, sendo que esta fase pode ser fatal (Maguiña *et al.*, 2009). Aqueles que sobrevivem à fase aguda, mesmo após tratamento com antibióticos, podem desenvolver uma doença crônica, caracterizada pelo aparecimento de lesões angiomasas (tumores vasculares) na pele que se originam de células endoteliais colonizadas pelas bactérias, conhecidas como verrugas peruanas (Figura 8). Estas são caracterizadas pela presença de uma ou múltiplas lesões cutâneas angiomasas papulosas e pruriginosas, que sangram com facilidade e que se acompanham de dor óssea, desaparecendo em semanas (Ihler, 1996; Maguiña & Gotuzzo, 2000; Blanco & Raoult, 2005; Maguiña *et al.*, 2009).



Figura 8. Verrugas peruanas – fase crônica da doença (Maguiña C *et al.*, 2009).

À medida que a doença progride, a anemia hemolítica pode ser acompanhada por linfadenopatia generalizada e hepatoesplenomegalia. Em casos

mais graves, derrame pericárdico, miocardite, endocardite, delírio, convulsões, coma, insuficiência respiratória aguda e insuficiência múltipla dos órgãos pode ocorrer. Por tratar-se de infecção que promove imunossupressão, a maioria das mortes está associada com a presença de infecção secundária, principalmente por salmonelose, sendo esta a complicação fatal mais frequente em pacientes hospitalizados. Se a infecção ocorrer durante a gravidez pode haver infecção transplacentária, morte fetal, aborto e morte materna (Maguiña *et al.*, 2009).

O agente causador da doença de Carrión ficou muitos anos sem ser identificado até a criação de Institutos de Bacteriologia no Peru. Em 1909, o médico argentino Alberto Barton identificou o agente etiológico da doença de Carrión no sangue dos pacientes com febre de Oroya, a *B. bacilliformis*, a primeira espécie de *Bartonella* a ser descrita na literatura. A doença é restrita à cordilheira andina no Peru, Equador e Colômbia, com relatos de casos esporádicos na Bolívia, Chile, Guatemala e Brasil (Gray *et al.*, 1990; Alexander, 1995; Bass *et al.*, 1997; Maguiña & Gotuzzo, 2000; Cesario & Cesario, 2005; Cesario *et al.*, 2011; Clemente *et al.*, 2012).

A *B. bacilliformis* é transmitida aos seres humanos através da picada de um mosquito do gênero *Lutzomyia*. A distribuição geográfica limitada de espécies de flebótomos específicos, *Lutzomyia verrucarum*, foi responsável pela aparente distribuição da doença humana dentro de uma faixa de altitude específica. No entanto, estudos recentes têm demonstrado que a doença de Carrión pode ocorrer em áreas onde o *L. verrucarum* não é o dominante (Ellis *et al.*, 1999b; Karem *et al.*, 2000; Clemente *et al.*, 2012).

Nos pacientes com febre de Oroya, na fase aguda não complicada, adultos e crianças devem ser tratados com ciprofloxacina. Esta é a nova recomendação do Ministério da Saúde do Peru devido ao encontro de cepas já resistentes ao cloranfenicol. No caso de complicações, o tratamento deve ser ciprofloxacina associada à ceftriaxona ou ceftazidima por 10 dias. Para o tratamento da verruga peruana emprega-se a rifampicina como monoterapia (Pérez-Martínez, *et al.*, 2010).

Na fase aguda, a maioria dos pacientes tratados se recupera, alguns morrem e menos de 5%, após algumas semanas ou meses, desenvolvem as lesões eruptivas e sangrantes características da fase crônica da doença. Este último fato sugere haver infecção crônica, mesmo após a antibioticoterapia, capaz de mudar o curso clínico da manifestação inicial da doença (Maguiña, 2001).

1.5.2 Febre das Trincheiras

Em 1915, a febre das trincheiras (FT) foi reconhecida como entidade clínica durante uma epidemia ocorrida na Primeira Grande Guerra. Neste período, foi estimado que mais de um milhão de pessoas tivessem sido afetadas, predominando a doença em militares (Maurin & Raoult, 1996; Foucault, *et al.*, 2006). Também denominada de febre dos cinco dias (quintana), a FT é causada pela *B. quintana*, encontrada na saliva e nas fezes dos piolhos do corpo humano (*Pediculus humanus corporis*), infectando o homem quando a pele está lesada. O homem é considerado o hospedeiro primário da *B. quintana*, mas há estudos recentes que demonstraram a presença desta bactéria em cães e em macacos *Rhesus cynomolgus* (O'Rourke *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013).

O agente causador foi identificado pelo microbiologista brasileiro Enrique da Rocha Lima quando investigava o tifo para o governo alemão durante a guerra. Com um período de incubação entre 15 a 25 dias, a infecção é caracterizada por episódios recorrentes de febre alta que duram entre 1 a 5 dias, podendo ser autolimitada e, entre os surtos febris, os pacientes apresentam infecção assintomática. A doença apresenta uma evolução clínica cíclica, associada à febre recorrente, mal-estar, calafrios, anorexia, sudorese, cefaléia, conjuntivite, mialgias e artralgias. Também pode ser acompanhada de dor pré-tibial, tontura e bacteremia crônica ou evoluir para doenças graves, como angiomatose bacilar e endocardite (Raoult, 1999; Brouqui *et al.*, 1999; Ohl *et al.*, 2000; Jacomo *et al.*, 2002; Greub *et al.*, 2002; Boulouis *et al.*, 2005; Blanco & Raoult, 2005; Piérard-Franchimont *et al.*, 2010).

Após a Segunda Guerra Mundial a doença deixou de ser epidêmica, mas durante as últimas décadas a *B. quintana* foi associada a quadros de bacteremia crônica nos indigentes e etilistas em áreas urbanas, sobretudo em populações com prevalente infestação por piolhos do corpo, com más condições de higiene pessoal e de saneamento (Spach *et al.*, 1995b; Ehrenborg *et al.*, 2008; Brouqui & Raoult, 2006; Piérard-Franchimont *et al.*, 2010). Atualmente, este quadro clínico reemergente foi renomeado de “febre das trincheiras urbana dos dias modernos”, e pode estar associado à bacteremia crônica e cursar com endocardite (Maurin & Raoult, 1996; Anderson & Neuman, 1997; Džupová *et al.*, 2013).

A epidemiologia é a chave para se fazer um diagnóstico presumível de FT. O diagnóstico é confirmado pelo isolamento e identificação de *B. quintana* em cultura nas amostras de tecido e sangue de pacientes infectados e pela sorologia através da IFI (Maguiña *et al.*, 2009).

Apesar de não haver estudos controlados, o tratamento de eleição da FT e da bacteremia crônica consiste na associação de doxiciclina e gentamicina por no mínimo duas semanas e em imunodeficientes deverá ser prolongado por meses. Os pacientes assintomáticos também deverão ser tratados pelo alto risco de desenvolverem endocardite. Para o tratamento da endocardite por *B. quintana* recomenda-se a associação de gentamicina com a ceftriaxona na tentativa de melhorar o prognóstico da doença (Rolain *et al.*, 2004; Pérez-Martínez *et al.*, 2010).

1.5.3 Doença da Arranhadura do Gato

Em 1950, Robert Debré, professor de pediatria na Universidade de Paris, fez a primeira publicação da doença da arranhadura do gato (DAG), a qual já era conhecida como entidade clínica. Mas somente em 1992, Dolan e seus colaboradores fizeram o isolamento da *B. henselae* nos linfonodos dos pacientes infectados (Jacomó *et al.*, 2002; Eymin *et al.*, 2006). A DAG é descrita na maioria dos países do mundo e é a expressão clínica mais freqüente da infecção por

bartonelas. É uma doença comum e autolimitada, sendo a principal causa de linfonodomegalia benigna em crianças e adultos jovens (Dehio & Sander, 1999; López & Andraca, 2008; Piérard-Franchimont *et al.*, 2010; Klotz *et al.*, 2011).

O gato doméstico é o principal reservatório, mas o cão também foi associado à transmissão da doença (Chung *et al.*, 2005; Kaiser *et al.*, 2011). Em 90% dos casos existe um antecedente de contato com gatos através da arranhadura e/ou mordedura, com uma maior incidência nos pacientes que possuem gatos menores do que um ano de idade, pois os gatos jovens são mais susceptíveis à bacteremia (Blanco & Raoult, 2005; Chomel *et al.*, 2006; Guptill, 2010).

A *B. henselae* é o principal agente causador da doença, mas foram descritos casos isolados relacionados com a *B. clarridgeiae*, *B. quintana*, *Afipia felis*, um outro bacilo gram-negativo e um caso com a *B. alsatica* (Kordick *et al.*, 1997; Azevedo *et al.*, 2000; Velho, 2001; Angelakis *et al.*, 2008; Saisongkorh *et al.*, 2009).

As manifestações clínicas dependem do estado imunológico do paciente. O quadro clínico típico que acomete os indivíduos imunocompetentes caracteriza-se pela presença de linfadenopatia regional (Figura 9) precedida por uma pápula eritematosa, não pruriginosa, que surge no local do trauma 3 a 10 dias após a inoculação. Em 85% dos casos as adenopatias são únicas, ocorrendo com maior frequência nas regiões axilar e epitrocleares (46%), cabeça e pescoço (26%) e virilha (17,5%). O período de incubação é de poucos dias a várias semanas (Carithers, 1985; Eymin *et al.*, 2006; Florin *et al.*, 2008).



Figura 9. Linfadenopatia regional em paciente com doença da arranhadura do gato (Arquivo pessoal Dr. Paulo Velho).

São descritas outras manifestações menos comuns da doença em 5 a 14% dos indivíduos infectados. Estas incluem a síndrome óculo-glandular de Parinaud, febre prolongada, fadiga, perda de peso, mialgia, artralgia, esplenomegalia, encefalites, sintomas neurológicos, além de manifestações cutâneas, como púrpura trombocitopênica, exantema, eritemas anular, multiforme e nodoso (Werner *et al.*, 2006; Florin *et al.*, 2008; Piérard-Franchimont *et al.*, 2010; Hobot-Wilner *et al.*, 2011).

O diagnóstico da DAG pode ser realizado através dos testes de IFA, ELISA, cultura de tecidos e PCR de linfonodo aspirado ou de material de biópsia. A orientação diagnóstica é feita através de critérios epidemiológicos (antecedentes de contato com gatos), manifestações clínicas (presença de febre prolongada, adenopatias regionais, microabscessos hepáticos e/ou esplênicos) e sorologia

(Florin *et al.*, 2008; Mãguina *et al.*, 2009; Olaso *et al.*, 2011). O diagnóstico sorológico mais utilizado é a detecção de títulos de IgG por meio da IFI. Os títulos menores que 1:64 podem representar infecção antiga. Os pacientes com DAG frequentemente apresentam títulos iguais ou maiores que 1:256 (Eymin *et al.*, 2006; Klotz *et al.*, 2011). O exame anatomopatológico, embora característico por demonstrar um típico granuloma com necrose central, não é patognomônico da DAG. A coloração de Whartin-Starry revela os bacilos pleomórficos nas zonas de necrose (Olaso *et al.*, 2011).

O tratamento é questionável nos pacientes imunocompetentes pelo fato da DAG ser uma doença benigna e autolimitada. Foi realizado um único estudo prospectivo, duplo-cego, com azitromicina em pacientes imunocompetentes com DAG não complicada. Após 30 dias, os pacientes tratados com este antibiótico apresentaram uma redução significativa no volume do linfonodo em comparação com o grupo placebo. Mas, não foi demonstrada nenhuma eficácia da azitromicina para o tratamento da DAG disseminada, nem para a prevenção da evolução da DAG localizada para a doença disseminada ou para a prevenção de complicações (Bass *et al.*, 1998).

Várias associações de antibióticos têm sido usadas para tratar os pacientes imunodeficientes e aqueles que apresentam complicações da DAG, como retinite, encefalopatias, endocardite e hepatite. A resposta clínica ao tratamento é melhor observada quando se utiliza a associação de rifampicina com claritromicina, gentamicina, ciprofloxacina, sulfametoxazol/trimetoprim ou doxiciclina. O tratamento com um regime de azitromicina oral de 500 mg no primeiro dia, seguido de 250 mg uma vez por dia nos próximos 5 dias deve ser considerado para os pacientes com linfadenopatia volumosa. A bartonelose ocular é tratada com doxiciclina por causa da sua excelente penetração ocular. Em casos complicados, utiliza-se a associação de doxiciclina e rifampicina por um período mínimo de 4 semanas (Margileth *et al.*, 1992; Maurin *et al.*, 1995; Rolain *et al.*, 2004; Maguiña *et al.*, 2009; Pérez-Martínez *et al.*, 2010; Klotz *et al.*, 2011).

1.5.4 Angiomatose Bacilar

A angiomatose bacilar (AB) foi descrita pela primeira vez, em 1983, durante o aparecimento da aids. A AB é causada pela *B. henselae* e pela *B. quintana*, sendo mais frequente em pacientes imunodeficientes, especialmente os soropositivos para o HIV, transplantados, e em pacientes sob terapia imunossupressora, mas raramente pode comprometer indivíduos imunocompetentes (Regnery *et al.*, 1992; Tappero *et al.*, 1995; Anderson & Neuman, 1997; Rolain *et al.*, 2004; Mosepele *et al.*, 2012; Moulin *et al.*, 2012).

A patogenia da AB relaciona-se com uma proliferação vascular anômala de células endoteliais e dos capilares na derme reticular, que afeta principalmente a pele e os linfonodos. As manifestações mucocutâneas são as mais frequentes (55% a 90%) e podem ser papulosas, tumorais ou nodulares, solitárias ou múltiplas, sendo a pápula eritemato-violácea a lesão mais característica (Figura 10) (Tappero *et al.*, 1993; Uribe *et al.*, 2012). Pode haver lesões praticamente em todo o corpo e o principal diagnóstico diferencial é o sarcoma de Kaposi, com o qual pode co-existir (Cockerell & LeBoit, 1990; Maurin & Raoult, 1996; Spach & Koehler, 1998). Por este motivo, toda lesão de aspecto vascular ou tumoração cutânea de causa desconhecida deverá ser biopsiada para ser realizado o exame histopatológico (Pérez-Martínez *et al.*, 2010). Outros diagnósticos diferenciais das lesões cutâneas devem incluir: granuloma piogênico, hemangioma, tumores subcutâneos, angiossarcoma e verruga peruana (Schwartz *et al.*, 1997; Cornejo & Vizcarra, 1999; Rolain *et al.*, 2004; Koehler & Duncan, 2005; Moulin *et al.*, 2012).



Figura 10. Pápulas angiomatosas características de angiomatose bacilar em paciente do Hospital de Clínicas da Unicamp.

A AB pode apresentar manifestações extracutâneas, afetando a mucosa respiratória e gastrointestinal, fígado, baço, medula óssea, linfonodos, músculos e sistema nervoso central (Maurin *et al.*, 1997; Cornejo & Vizcarra, 1999; Margileth, 2000). A disseminação da doença tende a ocorrer principalmente em condições de imunodeficiência como nos pacientes com aids com contagem de CD4 abaixo de 200 células/mm³ e transplantados (Bonatti *et al.*, 2006; Uribe *et al.*, 2012). Sinais e sintomas sistêmicos incluem emagrecimento, febre, suores noturnos, mal-estar e anorexia (Zarraga *et al.*, 2011).

Quando compromete o fígado, o baço ou a medula óssea a AB é chamada de peliose bacilar e caracteriza-se por lesões angioproliferativas associadas a dilatações capilares com formação de espaços cavernosos cheios de sangue (Perkocha *et al.*, 1990; Loutit, 1997; Raoult, 1999; Uribe *et al.*, 2012). Tanto a AB como a peliose bacilar são diferentes manifestações clínicas de um processo de proliferação vascular secundárias à infecção pelo gênero *Bartonella* e que ocorrem

principalmente nos pacientes com imunodeficiência adquirida (Vasquez *et al.*, 2007).

Embora o diagnóstico possa ser ajudado por exames microbiológicos, sorológicos e por técnicas moleculares, na prática clínica é o exame histológico que mais facilmente possibilita o diagnóstico com critérios já bem definidos (Velho *et al.*, 2002; Zarraga *et al.*, 2011). A biópsia cutânea mostra as estruturas cocobacilares agrupadas visualizadas pela coloração de Whartin Starry (Piérard-Franchimont *et al.*, 2010). Existem três principais características histológicas das lesões cutâneas de AB: (1) proliferações lobulares dos vasos sanguíneos, (2) infiltração de neutrófilos e (3) depósito bacilar no interstício (Zarraga *et al.*, 2011). Para a identificação da espécie envolvida na AB, a PCR é o método de eleição para a identificação da bactéria diretamente no sangue ou no tecido (Uribe *et al.*, 2012).

A AB tem evolução potencialmente fatal se não tratada, sendo a eritromicina ou doxiciclina drogas de escolha, mas ciprofloxacina, azitromicina, tetraciclina e aminoglicosídeos também podem ser eficazes. O tratamento deve ser prolongado, durante 3 a 4 meses, para diminuir o risco de recorrências. O prognóstico dos pacientes é favorável e as lesões geralmente se reverterem em curto prazo. Nos pacientes intolerantes à eritromicina ou naqueles que apresentam falha terapêutica pode-se utilizar a doxiciclina que é bem tolerada durante períodos maiores de tratamento (Cockerell *et al.*, 1987; Maurin & Raoult, 1996; Gasquet *et al.*, 1998; Pérez-Martínez *et al.*, 2010; Uribe *et al.*, 2012).

1.6 OUTRAS DOENÇAS

As bartoneloses merecem atenção devido ao número crescente de espécies conhecidamente patogênicas ao homem e pela existência de espécies já documentadas, mas com patogenicidade ainda não comprovada.

Sabe-se hoje que as bartonelas representam de 1% a 17% de todos os casos de endocardite com cultura negativa (Lamas & Eykyn, 2003). A endocardite

por *B. quintana* é a mais comum, principalmente em pacientes que apresentam bacteremia crônica, etilistas e naqueles que vivem em condições desfavoráveis de higiene. Febre, anorexia, perda de peso, anemia e hepatoesplenomegalia são as manifestações clínicas mais comuns da endocardite. Esta, às vezes, pode evoluir com grave e progressiva lesão valvular (predominantemente da válvula aórtica) exigindo a substituição da válvula (Stein & Raoult, 1995; Anderson & Neuman, 1997; Brouqui *et al.*, 1999; Fournier *et al.*, 2010; Dimopoulos *et al.*, 2012; Olarte *et al.*, 2012). Embora a *B. quintana* possa causar doença aguda e grave em pessoas sem moradia, muitas vezes a bactéria produz uma doença crônica e inespecífica que não desperta a suspeita clínica de infecção por *Bartonella* (Foucault, 2002; Vitale *et al.*, 2009).

As espécies mais envolvidas nos quadros de endocardite são: *B. quintana*, *B. henselae*, *B. elizabethae*, *B. alsatica*, *B. koehlerae*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* e *B. vinsonii* subsp. *arupensis* (Daly *et al.*, 1993, Roux *et al.*, 2000; Avidor *et al.*, 2004; Houpijian & Raoult, 2005; Fenollar *et al.*, 2005; Raoult *et al.*, 2006; Dreier *et al.*, 2008; Jeanclaude *et al.*, 2009; Fournier *et al.* 2010). Recentemente, uma nova espécie chamada de '*Candidatus Bartonella mayotimonensis*' foi descrita em um caso de endocardite (Lin *et al.*, 2010).

Um amplo espectro de doenças oculares tem sido associado com as espécies de *Bartonella*. A síndrome oculoglandular de Parinaud é a manifestação ocular mais comum causada pela *B. henselae*, podendo também estar associada às espécies *B. quintana* e *B. grahamii* causando inflamação e neurorretinite (Jawad & Amen,1990; Ormerod & Dailey, 1999; Cunningham & Koehler, 2000; Curi *et al.*, 2010).

A *B. henselae* pode causar manifestações incomuns nos humanos como encefalopatia, encefalite, púrpura trombocitopênica, osteomielite, septicemia, febre de origem indeterminada e doenças hepatoesplênicas (Margileth, 1993; Graveleau *et al.*, 2011; Chi *et al.*, 2012). Doenças ósseas, neurológicas e até psiquiátricas também foram relacionadas a estes agentes. Manifestações atípicas da DAG como meningoencefalite, retinite, abscessos hepatoesplênicos e osteomielite

foram relatadas e é provável que muitas dessas manifestações ainda possam passar despercebidas (Jacomino *et al.*, 2002; Hajjaji *et al.*, 2007; Breitschwerdt *et al.*, 2007; Roubaud-Baudron *et al.*, 2009; Edouard & Raoult, 2010).

Hepatite granulomatosa e/ou esplenite (historicamente chamada de “doença da arranhadura do gato atípica”) foram descritas em alguns pacientes, principalmente em crianças infectadas com *B. henselae* (Gerber *et al.*, 2002; Giladi *et al.*, 2005; Psarros *et al.*, 2012; VanderHeyden *et al.*, 2012). Linfadenite granulomatosa causada pela infecção da *B. alsatica* foi encontrada em pacientes com linfadenopatia generalizada (Angelakis *et al.*, 2008).

A *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* é um importante patógeno intravascular emergente que tem sido isolado de pacientes com endocardite, artrite, doenças neurológicas e neoplasias vasculoproliferativas (Roux *et al.*, 2000; Breitschwerdt *et al.*, 2008; Breitschwerdt *et al.*, 2009). A *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* e *B. henselae* foram isoladas do sangue de pessoas imunocompetentes que apresentavam artralguas, fadiga e sintomas neurológicos (Breitschwerdt *et al.*, 2010c).

São descritos casos de infecção por *B. henselae* simulando linfoma. Sintomas como febre, perda de peso, suores noturnos, linfadenomegalia e esplenomegalia, sem evidência de infecção disseminada, são comumente encontrados. A DAG com envolvimento esplênico é uma manifestação incomum da doença em adultos e pode ser facilmente confundida com um linfoma esplênico, conduzindo assim a uma esplenectomia desnecessária (Luddy *et al.*, 1992; Ghez *et al.*, 2001; Czauderna *et al.*, 2005).

1.7 INFECÇÃO DE ERITRÓCITOS E RISCO TRANSFUSIONAL

Apesar do amplo conhecimento sobre algumas doenças causadas por espécies de *Bartonella* em humanos, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos humorais e celulares envolvidos na persistência da infecção (Mosepele *et al.*, 2012). Espécies de *Bartonella* compartilham uma estratégia de infecção por meio

de persistência intraeritrocitária, permitindo assim a transmissão contínua por artrópodes sugadores de sangue e estabelecendo um santuário protegido de ataque do sistema imunológico do hospedeiro (Harms & Dehio, 2012).

O gênero *Bartonella* é o único entre os agentes patogênicos bacterianos que infectam os eritrócitos humanos. A *B. henselae* e a *B. quintana* são as espécies que mais estabelecem bacteremia intraeritrocitária crônica. Em contraste, a *B. bacilliformis* apresenta uma bacteremia relativamente curta, mas potencialmente fatal, devido à destruição seletiva no baço de quase todos os eritrócitos infectados circulantes (Rolain *et al.*, 2004; Boulouis *et al.*, 2005; Minnick & Battisti, 2009; Pulliainen & Dehio, 2012; Harms & Dehio, 2012).

Entre os fatores que contribuem para o tropismo eritrocitário das bactérias estão a motilidade mediada pelos flagelos e as proteínas de superfície associadas com o sistema de secreção de tipo IV TRW (T4SS). Estas proteínas estão envolvidas na aderência aos eritrócitos e no estabelecimento da bacteremia crônica (Saenz *et al.*, 2007; Dehio, 2008; Franz & Kempf, 2011; Harms & Dehio, 2012).

Os genes para a motilidade baseada nos flagelos são exclusivos para a *B. bacilliformis*, sendo esta considerada uma linhagem “ancestral” das espécies de *Bartonella* devido à ausência do sistema de secreção TRW. A *B. quintana* e a *B. henselae*, são chamadas de “bactérias modernas”, não possuem flagelo e possuem o sistema de secreção TRW como um dos fatores de virulência (Saenz *et al.*, 2007; Dehio, 2008). Os primeiros trabalhos mostraram que a *B. bacilliformis* morta ou sem motilidade não era capaz de aderir aos eritrócitos (Walker & Winkler, 1981; Benson *et al.*, 1986).

As proteínas hemolíticas das *Bartonella* spp. desempenham um papel importante no hemotropismo. Foi demonstrado em cultura de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) incubada com a *B. henselae* e com a *B. bacilliformis* que os eritrócitos apresentam alteração na superfície da membrana devido a um fator de deformação (proteína deformina), produzido por

estas bactérias (Iwaki-Egawa & Ihler, 1997). A *B. bacilliformis* produz uma proteína hemolítica chamada de hemolisina que é dependente de contato (Hendrix, 2000) e é expressa exponencialmente durante a fase de crescimento bacteriano, sendo utilizada pela bactéria para escapar dos vacúolos das células hospedeiras durante o parasitismo intracelular (Minnick & Battisti, 2009).

A adesão à célula do hospedeiro é um dos mais importantes passos durante o processo de infecção. Os fatores patogênicos mais descritos são o sistema de secreção VirB/D4 IV, *Bartonella* adesina A (BadA) e o sistema de TRW. As adesinas autotransportadoras triméricas BadA asseguram o contato da bactéria às células hospedeiras e à matriz extracelular. Devido à falta das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) na superfície, os eritrócitos seriam incapazes de apresentar os antígenos dos seus invasores ao sistema imune e, desta forma, continuariam a realizar as suas funções (Pulliainen & Dehio, 2012; Harms & Dehio, 2012).

Em 2002, Jacomo e colaboradores sugeriram que a observação de Koch, de que o sangue deveria ser livre de bactérias, não poderia ser aplicável ao gênero *Bartonella* (Jacomo *et al.*, 2002). Hoje, já foi demonstrado que pode haver infecção intraeritrocitária em humanos por protozoários *Plasmodium* sp. e *Babesia* sp. e por bactérias do gênero *Bartonella* (Ihler, 1996; Dehio, 2001; Rolain *et al.*, 2003a,b).

A capacidade de invasão da *B. henselae* foi documentada em células endoteliais, células epiteliais, monócitos, macrófagos e eritrócitos (Batterman *et al.*, 1995; Dehio *et al.*, 1997; Kempf *et al.*, 2000; Kempf *et al.*, 2001; Resto-Ruiz *et al.*, 2002; Kempf *et al.*, 2005; Pitassi *et al.*, 2007). Sabe-se que a inoculação intravenosa da bactéria não conduz à infecção imediata dos eritrócitos, esta persiste em um nicho primário antes da fase de infecção do sangue, fato este que explica o tempo de incubação extremamente longo da febre de Oroya (60 dias em média) (Maguiña *et al.*, 2009). A natureza deste nicho ainda permanece desconhecida, mas estudos *in vivo* apontam as células endoteliais como um alvo

importante das *Bartonella* spp. No entanto, é provável que outras células estejam envolvidas na participação deste nicho (Harms & Dehio, 2012).

Existem poucos estudos *in vivo* disponíveis que permitam traçar um quadro preciso da infecção entre a fase de inoculação de *Bartonella* sp. na pele ou na corrente sanguínea e o início da bacteremia. A inoculação da *B. tribocorum* em um modelo de rato imunocompetente demonstrou que logo após a inoculação ocorre uma breve bacteremia. Esta é seguida por um período de 3 a 5 dias sem a detecção da bactéria no sangue antes do ressurgimento da bacteremia intraeritrocitária persistente que dura em torno de 8 a 11 semanas (Schulein *et al.*, 2001; Koesling *et al.*, 2001; Jacomo *et al.*, 2002; Mosepele *et al.*, 2012).

Antes do relato deste modelo desenvolvido em roedor, a bacteremia já havia sido documentada em gatos experimentalmente infectados com *B. henselae* através da transfusão sanguínea (Guptill *et al.*, 1997; Kordick *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 2002).

As *Bartonella* spp. podem apresentar infecções assintomáticas. Lucey e colaboradores descreveram o caso de pacientes imunocompetentes que apresentaram bacteremia persistente com recaídas clínicas após vários cursos de antibióticos. Os pacientes apresentavam febre recorrente e sintomas constitucionais e após o tratamento tornaram-se assintomáticos. A hemocultura positiva foi obtida antes da introdução da terapia antibiótica (Lucey *et al.*, 1992). Sabe-se que 10 a 15% das populações em áreas endêmicas para a doença de Carrión são portadores assintomáticos de *B. bacilliformis* (Garcia-Caceres & Garcia, 1991).

A bacteremia em humanos foi detectada no sangue de pessoas imunocompetentes que tiveram contato frequente com gatos e exposição a alguns artrópodos (pulgas, carrapatos, mosquitos, piolhos). A soroprevalência foi encontrada em 57% das pessoas testadas e estas foram sororeagentes em pelo menos um dos antígenos testados para as espécies de *Bartonella* estudadas, concluindo que a *B. henselae* pode induzir infecção oculta em pessoas

imunocompetentes (Breitschwerdt *et al.*, 2007). Um estudo anterior identificou uma soroprevalência de 3% para *B. henselae* em doadores de sangue saudáveis e 7,1% de soroprevalência para os antígenos de *B. henselae* e *B. quintana* entre os profissionais de saúde animal (Chomel *et al.*, 2003).

O DNA da *B. koehlerae* também foi demonstrado no sangue de 1,8% de pessoas testadas que tiveram contato com animais. A bacteremia nesta espécie ocorre mais frequentemente em imunocompetentes, principalmente em veterinários devido ao alto risco de exposição ocupacional (Billeter *et al.*, 2008; Breitschwerdt *et al.*, 2010b).

Pesquisas mais recentes relataram a transmissão sanguínea de *Bartonella sp.* por agulhas contaminadas entre veterinários, fato este que faz com que a possibilidade da infecção por *Bartonella spp.* nas transfusões sanguíneas seja um relevante problema de saúde pública que precisa ser priorizado (Oliveira *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011).

Considerando estas informações de que algumas espécies de *Bartonella* podem ser encontradas em eritrócitos humanos, os doadores de sangue podem apresentar uma bacteremia assintomática e mesmo assim qualificar-se como um doador de sangue. A infecção poderá não manifestar-se nos dias subsequentes à transfusão, além de causar manifestações clínicas diversas (Velho *et al.*, 2003).

A rotina de alguns laboratórios nacionais oferecem testes para a detecção da infecção para apenas 2 espécies de *Bartonella*, mas estes ainda não são realizados nos bancos de sangue. Mesmo que houvesse testes sorológicos de triagem disponíveis para esta bactéria, a sorologia prévia à doação não excluiria o diagnóstico de bartonelose, pois esta pode apresentar resultados falso-negativos ou mesmo baixos títulos de anticorpos nos doadores (Bergmans *et al.*, 1997).

Há relatos de infecção por *B. bacilliformis* através do contato direto com sangue e/ou tecidos infectados de forma experimental ou acidental e um caso de uma eventual transmissão pós-transfusional (Maguiña, 1998; Pachas, 2001). Ruiz e colaboradores mencionaram um estudo que relatou a capacidade da *B.*

bacilliformis em sobreviver nas amostras de sangue de macacos experimentalmente infectados e estas foram mantidas a 4 °C por pelo menos 152 dias. Segundo estes autores, há apenas um caso documentado de transmissão transfusional por *B. bacilliformis* a um recém-nascido que morreu por febre Oroya após o recebimento de uma transfusão de sangue de um membro da família que residia em uma área endêmica (Ruiz *et al.*, 2012). A transmissão vertical já foi descrita em diferentes casos pela *B. bacilliformis* (Maguiña *et al.*, 1998) e foi sugerida ocorrer por *B. henselae* e *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* após amplificação e sequenciamento do DNA no sangue de membros da mesma família (Breitschwerdt *et al.*, 2010c).

Trabalho recente realizado com 55 amostras de sangue periférico de pacientes com diagnóstico clínico da doença de Carrión mostrou o crescimento da *B. bacilliformis* após as amostras serem mantidas a 4º C por 30 meses. Este resultado mostra a capacidade de sobrevivência da *B. bacilliformis* em sangue humano armazenado a 4 ° C e, portanto, o risco de infecção por transfusão, especialmente quando nenhum teste específico para a detecção desta bactéria em doadores de sangue é realizado em áreas endêmicas (Ruiz *et al.*, 2012).

A infecção por *Bartonella* spp. tem sido relatada em receptores de transplante de fígado (Thudi *et al.*, 2007; Bonatti *et al.*, 2006; Humar & Salit, 1999). Estudo relatou um caso de possível transmissão de *B. henselae* após um transplante de fígado em paciente pediátrico que logo após o transplante desenvolveu lesões granulomatosas no fígado e em linfonodos (Scolfaro *et al.*, 2008). Como a *B. henselae* sobrevive nos glóbulos vermelhos após o período de estocagem (Magalhães *et al.*, 2008) e o receptor do fígado transplantado havia recebido hemoderivados durante e depois do transplante, estes fatos levantaram a hipótese de transmissão transfusional (Velho, 2009).

Um estudo revisou 29 casos de receptores de órgãos sólidos transplantados que desenvolveram infecção por *B. henselae* após o transplante (Psarros *et al.*, 2012). O maior número de pacientes infectados ocorreu após transplantes de rim e de fígado. Dois terços dos pacientes transplantados

apresentaram infecção disseminada em média 3 anos logo após o transplante. A imunossupressão é um fator de risco conhecido para angiomatose bacilar e peliose hepática e a febre de origem desconhecida é um diagnóstico diferencial de bartonelose nestes pacientes (Koehler *et al.*, 1997). A Sociedade Americana de Transplante sugere que os receptores de transplante devam evitar a aquisição de animais de estimação durante o primeiro ano pós-transplante. Outra possível fonte para bartonelose em receptores de transplante seria a reativação de uma infecção prévia (Psarros *et al.*, 2012).

As febres podem ser o primeiro sintoma de uma bacteremia pós-transfusão, ocorrendo principalmente por bactérias gram-negativas que resistem às temperaturas de refrigeração. As unidades de concentrado de hemácias são armazenadas por 35 dias em temperaturas de 1 a 6°C. O resfriamento não inviabiliza a multiplicação das bartonelas que suportam congelamento até - 80° C (Velho *et al.*, 2002; Magalhães *et al.*, 2008).

As bactérias gram-negativas podem se proliferar rapidamente em produtos do sangue, considerados meios ricos em nutrientes, mesmo durante o período de estocagem. A contaminação dos produtos hemoterápicos é rara e, se houver, espera-se que seja relativamente baixa, provavelmente na ordem de 1-10 UFC/mL ou menos. A possibilidade de infecção nos componentes sanguíneos depende de vários fatores, tais como a quantidade e o tipo de componente transfundido, da cepa parasitária, da presença de bacteremia durante a doação e do estado imunológico do receptor (Hillyer *et al.*, 2003).

Como o sangue é um produto biológico, é pouco provável que o risco de infecções transmitidas por transfusão seja reduzido à zero. Um risco residual sempre permanece como, por exemplo, pode ocorrer para a transmissão do vírus da hepatite C (HCV), do HIV e do *Trypanosoma cruzi*. O elevado nível de segurança do fornecimento de sangue é o resultado de estudos contínuos e melhorias na triagem dos doadores e dos testes empregados nos bancos de sangue. É necessária uma vigilância contínua para proteger o sangue de agentes

patogênicos conhecidos e para detectar o aparecimento de novos agentes infecciosos (Chamberland & Khabbaz, 1998).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o risco potencial da transmissão por transfusão sanguínea da *Bartonella* spp.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Artigos publicados

- Artigo I – Avaliar a capacidade de invasão da *B. henselae* em eritrócitos humanos por meio da microscopia eletrônica de transmissão.
- Artigo II – Descrever as alterações ultraestruturais, à microscopia eletrônica de transmissão, encontradas nos exames do sangue de pacientes com suspeita de bartonelose.
- Artigo III - Avaliar a capacidade da *B. henselae* permanecer viável em uma unidade de concentrado de hemácias experimentalmente infectada após 35 dias de estocagem a 4°C.
- Artigo IV – Relatar o caso clínico de um jovem com anemia aplástica que apresentou choque hemodinâmico e morreu após receber transfusão de concentrado de hemácias.

Artigo a publicar (referente ao trabalho apresentado na “7th International Conference on *Bartonella* as Animal and Human Pathogens, 2012; Raleigh, North Carolina, USA”) (Pitassi *et al.*, 2012).

- Artigo V- Investigar a prevalência de espécies de *Bartonella* em uma amostra de doadores de sangue de Campinas, Brasil.

3. CAPÍTULOS

Esta tese de doutorado está estruturada conforme Formato Alternativo, normatizado pela Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas, 2008), sob o parecer PG nº 1985/96.

3.1- Capítulo I

Ultrastructural Pathology, 31:369–372, 2007
Copyright © Informa Healthcare USA, Inc.
ISSN: 0191-3123 print/1521-0758 online
DOI: 10.1080/01913120701696510

informa
healthcare

Bartonella henselae Infects Human Erythrocytes

Luiza Helena Urso Pitassi, MD and Renata Ferreira Magalhães, MD

Department of Dermatology, Medical School, State University of Campinas (UNICAMP), Sao Paulo, Brazil

Maria Lourdes Barjas-Castro, MD, PhD and Erich Vinicius de Paula, MD, PhD

Department of Hematology, Medical School, State University of Campinas (UNICAMP), Sao Paulo, Brazil

Marilucia Ruggiero Martins Ferreira, MSc

Department of Pathology, Medical School, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil

Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho, MD, PhD

Department of Dermatology, Medical School, State University of Campinas (UNICAMP), Sao Paulo, Brazil

Received 11 June 2007; accepted 22 August 2007.

Address correspondence to Luiza Helena Urso Pitassi, Department of Internal Medicine (Dermatology), Medical School, State University of Campinas—UNICAMP. Cidade Universitária Zeferino Vaz, s/n, 13.081-970, Campinas, Sao Paulo, Brazil. E-mail: pitassi@yahoo.com; lpitassi@fcm.unicamp.br

ABSTRACT *Bartonella henselae*, a facultative intracellular bacterium, has been known as the agent of cat scratch disease, bacillary angiomatosis, peliosis hepatis, endocarditis, and bacteremic syndrome in humans. *Bartonella* species can cause intraerythrocytic infections and have been isolated from the bloodstream of patients by several methods. It was demonstrated that *B. bacilliformis* and *B. quintana* infect human endothelial cells and human erythrocytes and *B. henselae* infects erythrocytes of cats. The aim of this study was to investigate through transmission electron microscopy whether *B. henselae* infects mature human erythrocytes. One red blood cell (RBC) unit received an experimentally standard strain of *B. henselae*. Blood aliquots were collected from the infected unit immediately after inoculation, at 30 min and 1, 5, 10, and 72 h for ultrastructural evaluation. *B. henselae* was seen adhering to human erythrocytes 10 h after inoculation and inside the erythrocyte after 72 h. This study demonstrates that *B. henselae* adheres to and invades mature human erythrocytes. The results favor the possibility that erythrocytes can serve as a primary target in *Bartonella* spp. infections. From this observation, further studies are warranted to prevent *Bartonella* spp. transfusional transmission.

KEYWORDS *Bartonella henselae*, electron microscopy, erythrocytes

Bacteria of the genus *Bartonella* are fastidious, gram-negative, aerobic bacilli that comprise numerous species [1]. The extreme diversity of disease manifestations is dependent on the infecting of *Bartonella* spp. and on the immune status of the patient [2].

Three *Bartonella* species are associated with an increasing number of clinical manifestations in human beings. *B. bacilliformis* causes Oroya fever and veruga peruana; *B. henselae* causes cat-scratch disease, bacillary angiomatosis, peliosis hepatis, endocarditis, and septicemia; and *B. quintana* causes trench fever, bacillary angiomatosis, bacteremia and endocarditis [3, 4].

Erythema nodosum, granuloma annulare, erythema multiforme, exanthemas, thrombocytopenic purpura, chronic adenopathy, and chronic fatigue syndrome have been associated with *Bartonella* spp. infection [4, 5].

Each *Bartonella* species appears to be highly adapted to one or few mammalian reservoir hosts, in which *Bartonella* causes a long-lasting intra

erythrocytic bacteremia as a hallmark of infection [6, 7]. The bacteria can persist in the bloodstream of the host as the result of intraerythrocytic parasitism [2, 8].

The primary intracellular niche in *Bartonella* sp. infections remains unclear [9].

Intraerythrocytic localization of *B. henselae* has been demonstrated in cat erythrocytes and *B. bacilliformis* have been observed within erythrocytes during the acute phase of Carrion disease (Oroya fever) [10, 11]. Trench fever and “modern-day trench fever” are a manifestation of infection with *B. quintana* that is observed in the erythrocytes of bacteremic homeless people [2, 4, 12]. *Bartonella* sp. has a tropism for endothelial cells, and intracellular *B. henselae* can be identified in endothelial cells infected in vitro [7]. Recently, it has been shown that *B. tribocorum* occurs in the erythrocytes of rats and does not cause hemolysis [6, 8].

In the present report, our objective was to demonstrate that *B. henselae* adheres to and invades mature human erythrocytes.

STUDY DESIGN

The *B. henselae* strain (Houston 1, American Type Culture Collection, Rockville, MD, ATCC 49882^T) used in this study was supplied by the bacteria bank of Adolpho Lutz Institute, São Paulo, SP, Brazil. The bacteria was grown on 5% sheep blood agar plates and incubated at 37°C in 5% CO₂-enriched atmosphere.

Bacterial suspension was performed by mixing bacteria colonies obtained from sheep blood agar plates with brain and heart infusion (BHI). This suspension of *B. henselae* colonies was used to obtain equivalence with tube 10 of the McFarland scale, which determined an initial suspension with approximately 3×10^9 colony-forming units (CFU)/mL [13].

One red blood cell (RBC) unit from healthy blood donor was collected in CPDA1 (Fresenius, Asem-NPBI, Itapeverica da Serra, São Paulo, Brazil). Blood was centrifuged (3500 g, 10 min) for component preparation and no additive/preservative solution was added. A total of 9 mL of RBC was collected using a sterile connecting sampling site coupler (Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, USA) and was infected with 1 mL of the bacterium suspension. Then, 50 µL of RBC was collected at

minute 0 (immediately after infection) and the remaining of the infected RBC was kept incubated at 37°C. Five other aliquots were collected at minute 30 and hours 1, 5, 10, and 72 for electron microscopy evaluation, after conservation in Karnovsky medium [13].

Briefly, the samples were then fixed in 2% osmium tetroxide for 2 h and left overnight in uranyl acetate 0.5%. Dehydration was performed with acetone solutions; inclusion was made in epoxy resin, which was heated to 60°C for 48 h. The semi-thin sections were made around 300 nm with a glass razor in the MT-6000 XL-RMC ultramicrotome and stained with toluidine blue 2% for better area selection. Ultrathin sections of approximately 90 nm were obtained with a diamond razor (Diatome), with the Leica Ultracut UCT ultramicrotome, laid on copper mesh, stained with lead citrate, and examined in the Zeiss LEO-906 electron microscope.

RESULTS AND DISCUSSION

Bartonella typical structures could be seen adhering to human erythrocytes in samples collected 10 h after infection (Figure 1) and inside erythrocytes after 72 h (Figure 2). They presented the trilaminar

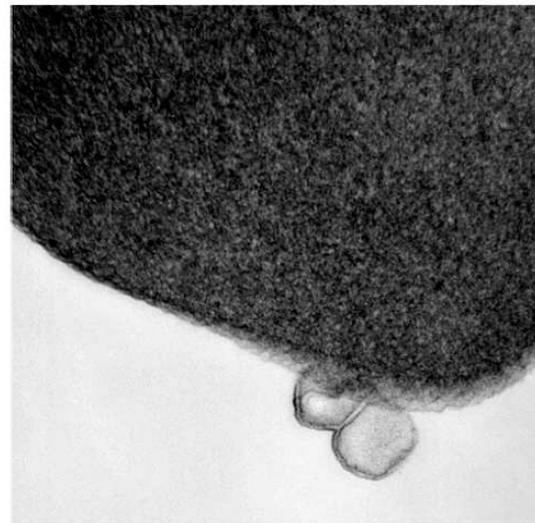


FIGURE 1 Adherence of *B. henselae* in human erythrocytes. Samples of infected RBC were analyzed by transmission electron microscopy (TEM). *B. henselae* could be observed adhering to human erythrocytes in samples collected 10 h after infection. TEM analysis demonstrates the typical trilaminar wall bacilli (original magnification, $\times 20,000$).

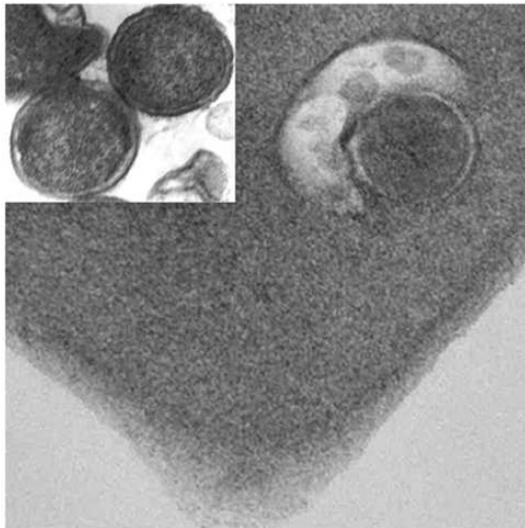


FIGURE 2 Invasion of human red blood cell (RBC) with *B. henselae*. Erythrocytes were infected with *B. henselae* strain ATCC 49882. Transmission electron microscopy (TEM) analysis showed intracellular *B. henselae* inside an erythrocyte 72 h after infection (original magnification, $\times 35,970$). In detail, TEM photography of the original culture of *B. henselae* used in infection studies.

wall, which has been previously shown to be specific of gram-negative bacteria [13, 14].

Bartonella species are closely associated with erythrocytes in their natural hosts. There is evidence that *B. henselae* can infect endothelial cells [15, 16, 17], epithelial cells [18, 19], and monocytes or macrophages [20, 21], but there is controversy about its capability to invade red blood cells [22–25].

Species of *Bartonella* can live inside red blood cells, as was demonstrated for *B. quintana* and *B. bacilliformis*. Intraerythrocytic localization of *B. henselae* has been demonstrated in cat erythrocytes [7, 10, 12].

Previous studies have shown that *B. henselae* can infect freshly isolated human CD34 hematopoietic progenitor cells but not human erythrocytes [22].

Man is a reservoir of *Bartonella* sp. and the risk for blood transmission should be considered. In a previous study at the State University of Campinas (UNICAMP) it was demonstrated that *B. henselae* remains viable in red blood cell units after standard storage period (data not shown). These data reinforce the possibility of infection through blood units collected from asymptomatic blood carriers. Furthermore, the tests that are usually carried out

for triage of donated blood bags do not detect these agents, including the routine hemoculture.

Human erythrocytes were infected with *B. henselae* and invasion of erythrocytes was demonstrated by TEM. In conclusion, our study favors the possibility that erythrocytes can serve as the primary target in *Bartonella* spp. infections. From this observation, further studies are warranted to evaluate the potential of *Bartonella* sp. transfusional transmission.

REFERENCES

1. Maggi RG, Duncan AW, Breitschwerdt EB. Novel chemically modified liquid medium that will support the growth of seven *Bartonella* species. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2651–2655.
2. 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;48:1921–1933.
3. Dehio, C. Molecular and cellular basis of *Bartonella* pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 2004;58:365–390.
4. Anderson B, Neuman M. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10:203–219.
5. Raoult D, Drancourt M, Carta A, Gastaut JA. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* isolation in patient with chronic adenopathy, lymphopenia, and a cat. *Lancet.* 1994;343:977.
6. Schulein R, Seubert A, Gille C, et al. Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes: a unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. *J Exp Med.* 2001;193:1077–1086.
7. Dehio, C. *Bartonella* interactions with endothelial cells and erythrocytes. *Trends Microbiol.* 2001;9:279–285.
8. Jacomo V, Kelly PJ, Raoult D. Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate). *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9:8–18.
9. Kyme PA, Haas A, Schaller M, Peschel A, Iredell J, Kempf VA. Unusual trafficking pattern of *Bartonella henselae*-containing vacuoles in macrophages and endothelial cells. *Cell Microbiol.* 2005;7:1019–1034.
10. Rolain JM, La SB, Liang Z, Davoust B, Raoult D. Immunofluorescent detection of intraerythrocytic *Bartonella henselae* in naturally infected cats. *J Clin Microbiol.* 2001;39:2978–2980.
11. Rolain JM, Novelli S, Ventosilla P, et al. Immunofluorescence detection of *Bartonella bacilliformis* flagella in vitro and in vivo in human red blood cells as viewed by laser confocal microscope. *Ann NY Acad Sci.* 2003;990:581–584.
12. Rolain JM, Maurin M, Mallet MN, Parzy D, Raoult D. Culture and antibiotic susceptibility of *Bartonella quintana* in human erythrocytes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:614–619.
13. Velho PEN, Moraes AM, Cintra ML, Uthida-Tanaka AM, Gigliogi R. Ultrastructural changes in a standard strain of *Bartonella henselae* after passages through BALB/cAn mice. *Ultrastruct Pathol.* 2002;26:161–169.
14. Guptill L, Wu CC, Glickman L, Turek J, Slater L and HogenEsch H. Extracellular *Bartonella henselae* and artifactual intra erythrocytic pseudo inclusions in experimentally infected cats. *Vet Microbiol.* 2000;76:283–290.
15. Kempf VA, Schaller M, Behrendt S, et al. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in rapid bacterial rRNA synthesis and replication. *Cell Microbiol.* 2000;2:431–441.
16. Riess T, Andersson SG, Lupas A, et al. *Bartonella* adhesion mediates a proangiogenic host cell response. *J Exp Med.* 2004;200:1267–1278.
17. Dehio C, Meyer M, Berger J, Schwarz H, Lanz C. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial

- aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalization of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. *J Cell Sci.* 1997;110:2141–2154.
18. Kempf VA, Volkmann B, Schaller M, et al. Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations. *Cell Microbiol.* 2001;3:623–632.
 19. Batterman HJ, Peek JA, Loutit JS, Falkow S, Tompkins LS. *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* adherence to and entry into cultured human epithelial cells. *Infect Immun.* 1995;63:4553–4556.
 20. Kempf VA, Schairer A, Neumann D, et al. *Bartonella henselae* inhibits apoptosis in Mono Mac 6 cells. *Cell Microbiol.* 2005;7:91–104.
 21. Resto-Ruiz SI, Schmiederer M, Sweger D, et al. Induction of potential paracrine angiogenic loop between human THP-1 macrophages and human microvascular endothelial cells during *Bartonella henselae* infection. *Infect Immun.* 2002;70:4564–4570.
 22. Mandle T, Einsele H, Schaller M, et al. Infection of human CD34+ progenitor cells with *Bartonella henselae* results in intraerythrocytic presence of *B. henselae*. *Blood.* 2005;106:1215–1222.
 23. Iwaki-Egawa S, Ihler GM. Comparison of the abilities of proteins from *Bartonella bacilliformis* and *Bartonella henselae* to deform red cells membranes and to bind to red cells ghost proteins. *FEMS Microbiol Lett.* 1997;157:207–217.
 24. Benson LA, Kar S, McLaughlin G, Ihler M. Entry of *Bartonella bacilliformis* into erythrocytes. *Infect Immun.* 1986;54:347–353.
 25. Tarantolo SR, Landmark JD, Iwen PC, et al. *Bartonella*-like erythrocyte inclusions in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Lancet.* 1997;350:1602.

3.2- Capítulo II

Ultrastructural Pathology, 34:1-5, 2010
Copyright © Informa Healthcare USA, Inc.
ISSN: 0191-3123 print/1521-0758 online
DOI: 10.3109/01913120903372761

informa
healthcare

Blood Cell Findings Resembling *Bartonella* spp.

Luiza Helena Urso Pitassi, MD
Department of Dermatology,
Medical School, State University
of Campinas (UNICAMP),
Campinas, Brazil

Maria Letícia Cintra, MD, PhD and
Marilúcia Ruggiero Martins
Ferreira, MSc
Department of Pathology, Medical
School, State University of
Campinas (UNICAMP),
Campinas, Brazil

Renata Ferreira Magalhães, MD and
Paulo Eduardo Neves Ferreira
Velho, MD, PhD
Department of Dermatology,
Medical School, State University
of Campinas (UNICAMP),
Campinas, Brazil

ABSTRACT

Some *Bartonella* species are able to invade red blood cells (RBC) and may cause persistent infection in the susceptible host. Use of transmission electron microscopy (TEM) demonstrates, inside erythrocytes, the typical triple-walled agents. However, when examining ultrathin sections of blood cells, the authors have, on several occasions, detected intraerythrocytic abnormalities that mimic but are not typical of *Bartonella* spp. Small endovesicles, pseudo-inclusions, cavities, and irregular hemoglobin granules distribution, resulting in regions of increased or decreased electron density, may be observed in the erythrocytes and platelets, which may be confused with bartonellas. So far, detailed ultrastructural findings of *Bartonella* spp. in blood cells have not yet been described. Aiming to improve TEM interpretation of blood cells changes, in routine examination of blood sections of patients with suspected bartonellosis, the authors studied the morphological findings they have observed, and present their putative nature, according to information in the literature.

Keywords: artifacts, bartonella, diagnosis, electron, erythrocytes, microscopy, pathology, transmission

Bartonella henselae, very small gram-negative bacteria, are capable of infecting human endothelial and epithelial cells, monocytes or macrophages, and erythrocytes [1-7]. Knowledge of the spectrum of human diseases the bartonellas cause has expanded rapidly over the past two decades. They are cat scratch disease, bacillary angiomatosis, peliosis hepatis, endocarditis, relapsing fever with bacteremia, and septicemia [8, 9]. Bartonellas have also been associated, especially in immunodeficient individuals, with neurological, psychiatric, ophthalmological, osseous, hematological, rheumatologic, and cutaneous disorders [10-12].

Bartonella spp. infection is transmitted from their natural reservoirs (cats, rats, humans, deer, and other mammals) by arthropods such as fleas and ticks [13].

The severity of the clinical presentation correlates well within the status of the host's immune system [8, 9]. *Bartonella* spp. are fairly unique among bacterial pathogens in terms of their ability to sustain prolonged periods of parasitism within red blood cells (RBC). These bacteria have been shown to invade, multiply within, and persist for the lifetime of the infected host cell [14].

Previous studies using TEM and bacteria culture have shown the ability of *B. henselae* to survive in stored blood for more than 35 days and, illustrate the potential for transfusion-associated infection [15]. They were shown to adhere to human erythrocytes, 10 h after inoculation, and were demonstrated inside erythrocytes after 72 h [6]. Also, intraerythrocyte findings of uncertain nature,

Received 25 August 2009; accepted 17 September 2009.

Address correspondence to Luiza Helena Urso Pitassi, MD, Department of Internal Medicine (Dermatology), Medical School, State University of Campinas-UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz, s/n, 13.081-970, Campinas, SP, Brazil. E-mail: pitassi@yahoo.com, lpitassi@fcm.unicamp.br

This study received financial support from FAEPEX-229/06 (Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão-UNICAMP).

resembling bartonellas, but lacking their typical morphology, have been described, [16, 17].

Our purpose was to describe TEM morphological abnormalities that were found during routine examination of blood sections of patients with suspected bartonellosis.

STUDY DESIGN

Blood samples were obtained from 10 healthy blood donors (Campinas Blood Bank) and from 10 inpatients from State University of Campinas Hospital, Brazil. Of these, 8 had anemia (6 out of 8 presented with cholestatic hepatitis), 1 had angioproliferative lesions, and 1 had lymphadenopathy.

Samples of RBC units from healthy blood donors were collected in CPDA1 (Fresenius, Asem-NPBI, Itapeceira da Serra, São Paulo, Brazil). Blood from the inpatients was collected in a sodium heparin tube. Then, a drop (50 μ L) of RBC was preserved separately in Karnovsky fixative solution [6].

The samples were then fixed in 2% osmium tetroxide for 2 h and left overnight in uranyl acetate 0.5%. They were then dehydrated in acetone solutions, and embedded in epoxy resin, which was heated to 60°C for 48 h. The semithin sections (around 300 nm) were obtained with a glass razor in the MT-6000 XL-RMC ultramicrotome and stained with toluidine blue 2% to select the cut area. Ultrathin sections (approximately 90 nm) were obtained with a diamond razor (Diatome), by the Leica Ultracut UCT ultramicrotome, laid on copper mesh, stained with lead citrate, and examined using the Zeiss LEO-906 electron microscope. Photographs were taken of the most representative images for later evaluation.

RESULTS AND DISCUSSION

Human erythrocytes are well-known hosts for protozoan parasites (genera *Plasmodium* and *Babesia*). They also serve as targets for *Bartonella* spp. [18]. Some *Bartonella* species are able to infect and survive inside RBC, resulting in a long-lasting hemotropic infection [19]. Use of TEM allows finding the bacteria inside erythrocytes, with their trilaminar cell wall, specific of gram-negative bacteria [20]. Three aspects must be studied: the bartonellas themselves, host erythrocytes, and other blood cells.

1. *B. henselae* is one of the most studied species of this genus. When using an electron microscopy, a clear cell wall structure is seen, including the outer membrane, peptidoglycan layer, and the inner cell wall [17]. The organisms are seen as short and pleomorphic rods.

Vacuoles, whose exact nature remains unclear, can be present within a small number of the organisms, [18,21] (Figure 1). The cytoplasm, sometimes limited by a thin membrane, is composed of a material of varying density, filling almost the entire space enclosed by the cell wall. *B. henselae* colonies, both in the semithin and ultrathin sections, display light and dark areas. In the darker areas, there is a more homogeneous distribution of the bacterium cytoplasmic protein. If dark spots appear, which correspond to compacted DNA, the remaining cytoplasm appears clear [22, 23]. Occasionally, the microorganisms are seen to be incompletely or completely segmented [22].

2. A normal red blood cell is 6–8 μ m in diameter and does not contain inclusions in its cytoplasm. RBCs, in thin sections, stand out because of their great uniformity, lacking any particular structure and little evidence of cell membrane. The homogeneity of red cells is a criterion for ruling out defects in the fixation or cutting steps [24]. In previous studies using TEM, it has been found *Bartonella*-like structures within erythrocytes that did not show the typical trilaminar wall specific of gram-negative bacteria [16, 17]. Aberrant bacillary forms are sometimes seen, but the absence of the typical trilaminar wall reinforces their artifactual nature. Pathologic changes of erythrocyte membrane may be demonstrated in several diseases [25]. Microorganisms may be present within vesicles in RBC; however, pseudovesicles may be due to folds

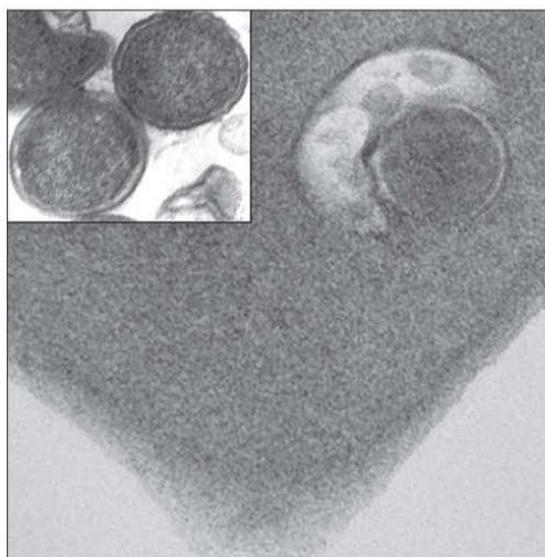


Figure 1. *B. henselae* inside an erythrocyte with the typical trilaminar wall; it is surrounded by a vacuole. Inset: For comparison, an electronmicrography of an ATCC 49882^T *B. henselae* colony, at the same magnification (original magnification, $\times 80,000$).

Blood Cell Findings Resembling *Bartonella* spp.

of red cell surfaces. Occasionally, small vesicles, pseudoinclusions, and more or less dense areas are seen in erythrocytes [24]. Rounded or bacillus-like particles, resembling the electron microscopic appearance of bacteria, are seen several times within red cells, usually near the cell surface. Spicules from polar ends of condensed hemoglobin mass can cause extrusion of cell surface and resemble bacillary forms when they are cut in cross sections (Figure 2). Morphological signs of erythrocyte stromal disorganization include irregular distribution of hemoglobin granules with spots of increased and decreased electron density, loosening of the internal structure causing the formation of cavities, as well as endovesicles, partially containing small or large osmiophilic particles [25, 26] (Figure 3). Artifacts can also be due to the fixative procedure itself, and care must be taken in the interpretation of images [24, 26]. Membrane destruction may be followed by the formation of micro- and macrovesicles, some of which may lose contact with the erythrocyte [25]. Formation of vesicles can be a specific mechanism for secretion of envelope components of the bacteria and offers the cell an effective method for the elimination and remodeling of these, particularly during times of stress [27] (Figure 4). Frequently, pseudoinclusions result when fixed erythrocytes are sectioned through an irregular border viewed in two dimensions and are often surrounded by a single lipid bilayer. These artifacts of preparation are pleomorphic and may resemble bacteria [28] (Figure 5).

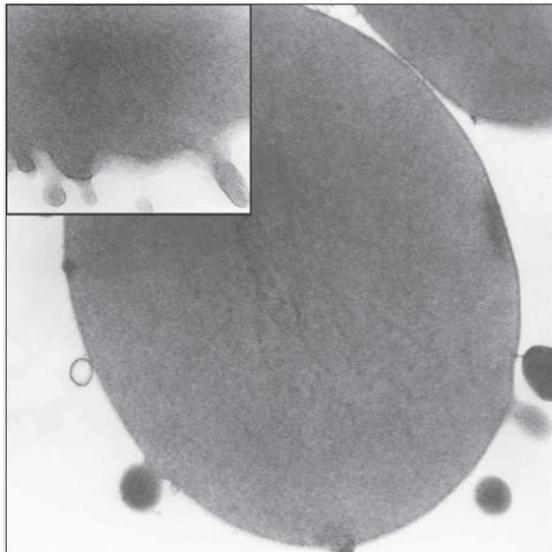


Figure 2. Dense core rounded and ovoid forms on the erythrocytes surface are similar to bacteria. *Inset:* Superficial erythrocyte cytoplasmic buds can resemble bacilli when they are seen in cross section (original magnification, $\times 40,000$; *inset*, $\times 12,500$).

3. Finally, platelets are seen, as revealed by TEM, alpha-granules, which are their main secretory

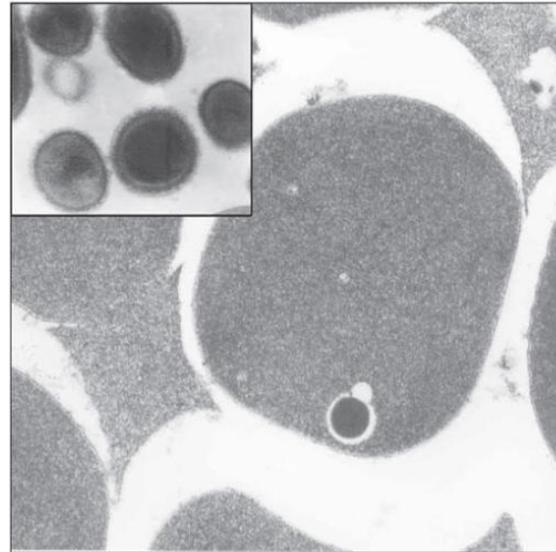


Figure 3. Intraerythrocytic hemoglobin granules may resemble bacteria; the absence of the trilaminate wall helps to differentiate them from *B. henselae*. *Inset:* For comparison, *B. henselae* may also have a very electron-dense cytoplasmic content; notice their trilaminate wall (TEM, original magnification, $\times 10,000$; *inset*, $\times 80,000$).

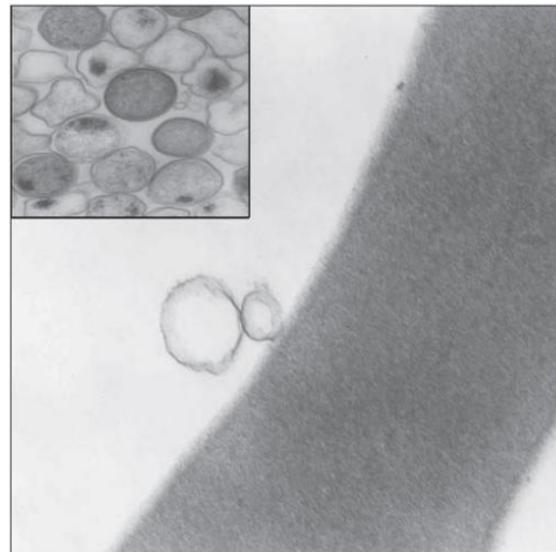


Figure 4. Two vesicles near the erythrocyte surface. *Inset:* For comparison, an electronmicrography of an ATCC 49882^T *B. henselae* colony showing predominance of electron-lucid bacteria, similar to the vesicles derived from erythrocyte membrane (original magnification, $\times 25,000$; *inset*, $\times 16,000$).

organelles. They are usually round or oval in shape and their electron dense material may be very similar to bacteria (Figure 6).

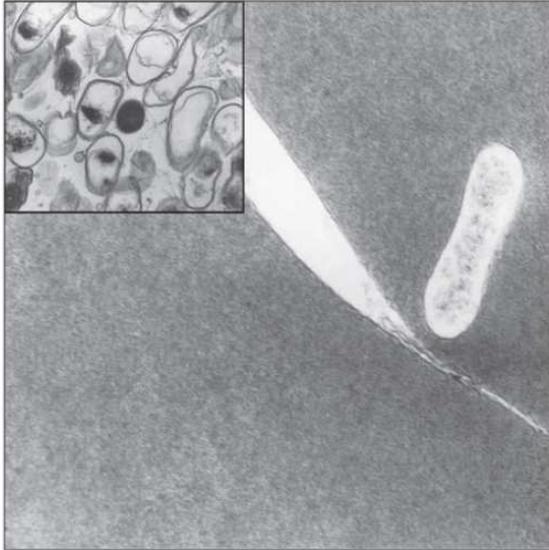


Figure 5. Intraerythrocytic pseudoinclusions. *Inset*: For comparison, an electronmicrography of an old (35 days) ATCC 49882^T *B. henselae* colony, demonstrates translucent content bacteria, similar to the pseudoinclusions (original magnification, $\times 20,000$; *inset*, $\times 80,000$).

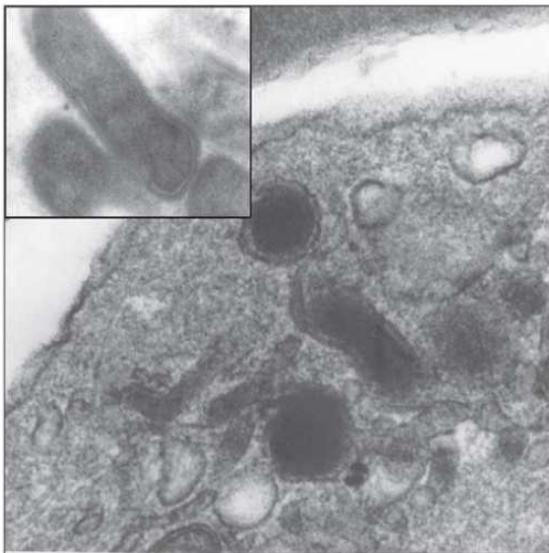


Figure 6. Varying density structures are seen inside a platelet; there are also vacuoles and alpha-granules, very similar to bacteria. *Inset*: For comparison, in a section of a bacillary angiomatosis lesion, notice the typical trilaminar bacteria wall (original magnification, $\times 40,000$; *inset*, $\times 80,000$).

There is limited information on the ultrastructural features of the *Bartonella* spp. on blood and no comparative study is available. The bartonella-like ultrastructures were observed in both the patient and donor groups.

We report TEM blood cell features that resemble *Bartonella* spp. Additional studies are necessary to improve understanding about the nature of these changes and improve diagnostic accuracy.

Declaration of Interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

1. Dehio C, Meyer M, Berger J, Schwarz H, Lanz C. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalization of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. *J Cell Sci.* 1997;110:2141–2154.
2. Batterman HJ, Peek JA, Loutit JS, Falkow S, Tompkins LS. *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* adherence to and entry into cultured human epithelial cells. *Infect Immun.* 1995;63:4553–4556.
3. Dehio C. Bartonella interactions with endothelial cells and erythrocytes. *Trends Microbiol.* 2001;9:279–285.
4. Kempf VA, Schairer A, Neumann D, et al. *Bartonella henselae* inhibits apoptosis in Mono Mac 6 cells. *Cell Microbiol.* 2005;7:91–104.
5. Resto-Ruiz SI, Schmiederer M, Sweger D, et al. Induction of a potential paracrine angiogenic loop between human THP-1 macrophages and human microvascular endothelial cells during *Bartonella henselae* infection. *Infect Immun.* 2002;70:4564–4570.
6. Pitassi LHU, Magalhães RF, Barjas-Castro ML, De Paula EV, Velho PENF. *Bartonella henselae* infects human erythrocytes. *Ultrastruct Pathol.* 2007;31:369–372.
7. Velho PENF, Pimentel V, Del Negro GMB, Okay TS, Diniz PPVP, Breitschwerdt EB. Severe anemia, panseritis, and cryptogenic hepatitis in an HIV patient infected with *Bartonella henselae*. *Ultrastruct Pathol.* 2007;31:373–377.
8. Anderson BE, Neuman MA. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10:203–219.
9. Dehio C. Molecular and cellular basis of bartonella pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 2004;58:365–390.
10. Boulouis HJ, Chang CC, Henn JB, Kasten RW, Chomel BB. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet Res.* 2005;36:383–410.
11. Lamas C, Curi A, Lemos ERS. Human bartonellosis: seroepidemiological and clinical features with an emphasis on data from Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103:221–235.
12. Spach DH, Koehler JE. *Bartonella*-associated infections. *Emerg Infect Dis.* 1998;12:137–155.
13. Jacomo V, Kelly PJ, Raoult D. Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate). *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9:8–18.
14. Schulein R, Seubert A, Gille C, et al. Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes: a unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. *J Exp Med.* 2001;193:1077–1086.
15. 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;18:287–291.

Blood Cell Findings Resembling *Bartonella* spp.

16. Kordick DL, Breitschwerdt EB. Intraerythrocytic presence of *Bartonella henselae*. *J Clin Microbiol*. 1995;33:1655-1656.
17. Guptill L, Slater L, Wu CC, et al. Immune response of neonatal specific pathogen-free cats to experimental infection with *Bartonella henselae*. *Vet Immunol Immunopathol*. 1999;71:233-243.
18. Ihler GM. *Bartonella bacilliformis*: dangerous pathogen slowly emerging from deep background. *FEMS Microbiol Lett*. 1996;144:1-11.
19. Schulein R, Seubert A, Gille C, et al. Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes: a unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. *J Exp Med*. 2001;193:1077-1086.
20. Merrell BR, Weiss E, Dasch GA. Morphological and cell association characteristics of *Rochalimaea quintana*: comparison of the Vole and Fuller strains. *J Bacteriol*. 1978;135:633-640.
21. Kempf VA, Schairer A, Neumann D, et al. *Bartonella henselae* inhibits apoptosis in Mono Mac 6 cells. *Cell Microbiol*. 2005;7:91-104.
22. Cuadra M, Takano J. The relationship of *Bartonella bacilliformis* to the red blood cell as revealed by electron microscopy. *Blood*. 1969;33:708-716.
23. Velho PE, de Moraes AM, Uthida-Tanaka AM, Cintra ML, Gigliogi R. Ultrastructural changes in a standard strain of *Bartonella henselae* after passages through BALB/cAn mice. *Ultrastruct Pathol*. 2002;26:161-169.
24. Goodman JR, Reilly EB, Moore RE. Electron microscopy of formed elements of normal human blood. *Blood*. 1957;12:428-442.
25. Riazantseva NV, Novitskii VV, Stepovaia EA, Tkachenko SB. Erythrocyte ultrastructure in norm and pathology: morphological phenomena and clinical correlations. *Morfologija*. 2004;126:48-51.
26. White JG. Ultrastructural features of erythrocyte and hemoglobin sickling. *Arch Intern Med*. 1974;133:545-562.
27. McBroom AJ, Kuehn MJ. Release of outer membrane vesicles by gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol Microbiol*. 2007;63:545-558.
28. Guptill L, Wu CC, Glickman L, Turek J, Slater L, HogenEsch H. Extracellular *Bartonella henselae* and artifactual intraerythrocytic pseudoinclusions in experimentally infected cats. *Vet Microbiol*. 2000;76:283-290.

3.3- Capítulo III

Transfusion Medicine, 2008, 18, 287–291

doi: 10.1111/j.1365-3148.2008.00871.x

ORIGINAL ARTICLE

Bartonella henselae survives after the storage period of red blood cell units: is it transmissible by transfusion?

R. F. Magalhães,* L. H. U. Pitassi,* M. Salvadego,† A. M. de Moraes,* M. L. Barjas-Castro‡ & P. E. N. F. Velho* *Department of Medical Clinic, Dermatology Division, †Department of Clinical Pathology, and ‡Department of Hematology, Transfusion Center, Hemocentro, School of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

Received 17 June 2007; accepted for publication 03 June 2008

SUMMARY. *Bartonella henselae* is the agent of cat scratch disease and bacillary angiomatosis. Blood donors can be asymptomatic carriers of *B. henselae* and the risk for transmission by transfusion should be considered. The objective of this study was to demonstrate that *B. henselae* remains viable in red blood cell (RBC) units at the end of the storage period. Two RBC units were split into two portions. One portion was inoculated with *B. henselae* and the other was used as a control. All units were stored at 4 °C for 35 days. Aliquots were collected on a weekly basis for culture in a dish with chocolate agar, ideal for the cultivation of this agent. Samples were collected on days 1 and 35 and taken for culture in Bact/Alert^R blood culture bottles.

Aliquots taken simultaneously were fixed in Karnovsky's medium for subsequent electron microscopy evaluation. Samples from infected bags successfully isolated *B. henselae* by chocolate agar culture, although Bact/Alert^R blood culture bottles remained negative. *Bartonella* spp. structures within erythrocytes were confirmed by electron microscopy. The viability of *B. henselae* was demonstrated after a storage period of RBC units. These data reinforce the possibility of infection by transfusion of blood units collected from asymptomatic blood donors.

Key words: *Bartonella henselae*, Bartonella infection, erythrocyte transfusion, iatrogenic disease.

The clinical spectra of manifestations because of *Bartonella* spp. are interesting and these bacteria have been increasingly gaining importance as emerging pathogens. Carrión's bartonellosis, with Oroya's fever and verruga peruana, trench fever, cat scratch disease and bacillary angiomatosis are well-known examples (Carithers, 1985; LeBoit *et al.*, 1989; Birtles *et al.*, 1991; Garcia-Caceres & Garcia, 1991; Maurin & Raoult, 1996; Bass *et al.*, 1997; Velho *et al.*, 2007).

Dermatological manifestations due to *Bartonella henselae* and lymphadenopathy have been described (Carithers, 1985; Eidlitz-Markus & Zeharia, 2006). Bone, neurological and psychiatric manifestations were related to these agents (Schwartzman *et al.*, 1994), as well as septicaemia, endocarditis (Spach & Koehler, 1998; Mylonakis & Calderwood, 2001) and

acute and chronic hepatopathies (Liston & Koehler, 1996; Estrella & Cosgrove, 2002).

Cats may transmit the organism to man via inoculation of infected fluids through broken skin, and fleas are important to transmission among cats (Carithers, 1985; Chomel *et al.*, 1996).

Bartonella spp. are small and fastidious Gram-negative bacilli. They require blood-enriched media and environments with high CO₂ levels in order to grow and are rarely cultivated in microbiology laboratories (Dörbecker *et al.*, 2006). These bacteria cause angiogenesis in immunodeficient patients but also foster granulomatous reactions, mainly in those who are immunocompetent (Piémont & Heller, 1999).

Bartonella spp. infections may be symptomless. Lucey *et al.* (1992) described a case of an asymptomatic patient from whom positive blood cultures were obtained before antibiotic therapy was introduced.

Man is a reservoir host of *Bartonella* species. Ten per cent to 15% of the populations in areas that are hyperendemic for Carrión's disease are asymptomatic carriers of *Bartonella bacilliformis*. Positive serologies

Correspondence: Dr Renata Ferreira Magalhães, Dermatology Division, Department of Internal Medicine, School of Medical Sciences, UNICAMP, Rua Tessália Vieira Camargo, 126 Barão Geraldo, Campinas, SP 13084-971, Brazil.
Tel.: 55-19-35217602; fax: 55-19-32894107;
e-mail: renatafmagalhaes@uol.com.br

for *B. bacilliformis* were found in 60% of the inhabitants of endemic areas for Carrion's disease (Carithers, 1985). Positive serologic tests for *B. henselae* were found in 19% of Germans and 13.7% of Brazilians (Rath *et al.*, 1997; Da Costa *et al.*, 2005).

The risk for infection by transfusion has been underestimated, but among cats, the transfusional transmission of *B. henselae* has already been described (Kordick & Breitschwerdt, 1997; Kordick *et al.*, 1999).

MATERIAL AND METHODS

Two red blood cell (RBC) units from healthy blood donors were collected in CPDA₁ (Fresenius, Asem-NPBI; Itapeceira da Serra, São Paulo, Brazil) (American Association of Blood Banks, 2005) and each one split into two portions via a sterile connecting device (Terumo Medical Corporation, Elkton, MD, USA). One bag from each split unit was inoculated with *B. henselae* and the second one served as a control.

A brain and heart infusion suspension of *B. henselae* colonies (Houston 1; American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA; ATCC 49882^T) was used (equivalent to tube 10 of McFarland scale) to determine an initial suspension with approximately 3×10^9 colony-forming units (CFU) mL⁻¹. The *B. henselae* was supplied by the bacteria bank of the Adolpho Lutz Institute, Sao Paulo, Brazil.

This bacterial suspension (0.33 mL of the initial suspension) was inoculated in the other split RBC unit using a Sampling Site Coupler (Fenwal; Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL, USA). Thus, approximately 5.5×10^6 CFU of *B. henselae* were obtained per mL of total blood. The minimal concentration necessary to have a positive *B. henselae* culture after RBC storage is unknown, but to avoid a false-negative result, we preferred to use a high concentration of CFU mL⁻¹ in this initial experiment.

The bags of infected and control RBC units were stored at 4 °C for 35 days (American Association of Blood Banks, 2005).

Samples were collected from a connecting sampling site coupler following gentle mixing and after aseptic alcohol 70% treatment to obtain contamination-free material.

Samples (3 mL) were inoculated into Bact/Alert^R blood culture bottles (Culture Bottles for Bact/ALERT Microbial Detection System, BioMérieux, Inc., Rio de Janeiro, Brazil) and a 50 µL aliquot was separately preserved in Karnovsky's medium for future evaluation by means of transmission electron microscopy on days 1 and 35.

A sample was taken weekly, placed into a Petri dish with chocolate agar culture medium and incubated at

37 °C in a 5% CO₂ environment. The Bact/Alert^R bottles were incubated for 7 days and so were the chocolate agar plates.

Control units were submitted to sample collection and the same procedures were followed. The study was previously authorized by the Research Ethics Committee of the School of Medical Science, State University of Campinas (UNICAMP).

RESULTS

Negative hemocultures in Bact/Alert^R bottles were obtained from samples collected on the day of inoculation and on the 35th day, either from the infected or the control bags.

All the dishes with chocolate agar culture medium where blood samples from the infected bags were seeded (on D₀, D₇, D₁₄, D₂₁, D₂₈ and D₃₅) presented exuberant growth and mucoid colonies after the fourth day of incubation. The control bags (opened on D₀ and D₃₅) had negative results.

The electron microscopy showed typical Gram-negative cell walls within the RBCs on D₃₅ (Fig. 1).

DISCUSSION

Diagnostic methods for B. henselae

Bartonella spp. are fastidious bacteria. Incubation for a short period of time and in standard medium does not allow for *B. henselae* growth as observed in the hemoculture of this study. Cultivation in blood-enriched media and incubation in environments with high CO₂ levels of infected smears resulted positive (Dougherty *et al.*, 1996; Brenner *et al.*, 1997). The *B. henselae* used is a standard strain and presents fast growth in favourable conditions.

There is evidence that *B. henselae* can infect endothelial cells (Dehio *et al.*, 1997; Kempf, *et al.*, 2000, 2001), epithelial cells (Batterman *et al.*, 1995), monocytes or macrophages (Resto-Ruiz *et al.*, 2002; Kempf *et al.*, 2005) but there are controversies about its capability to invade RBCs (Kordick & Breitschwerdt, 1995; Iwaki-Egawa & Ihler, 1997; Guptill *et al.*, 2000; Rolain *et al.*, 2002; Mändle *et al.*, 2005; Pitassi *et al.*, 2007). We were able to demonstrate *B. henselae* structures inside RBC on day 35.

Transfusional risk

Bacterial contamination of blood components is an important cause of transfusion-associated morbidity and mortality (Goldman & Blajchman, 1991).

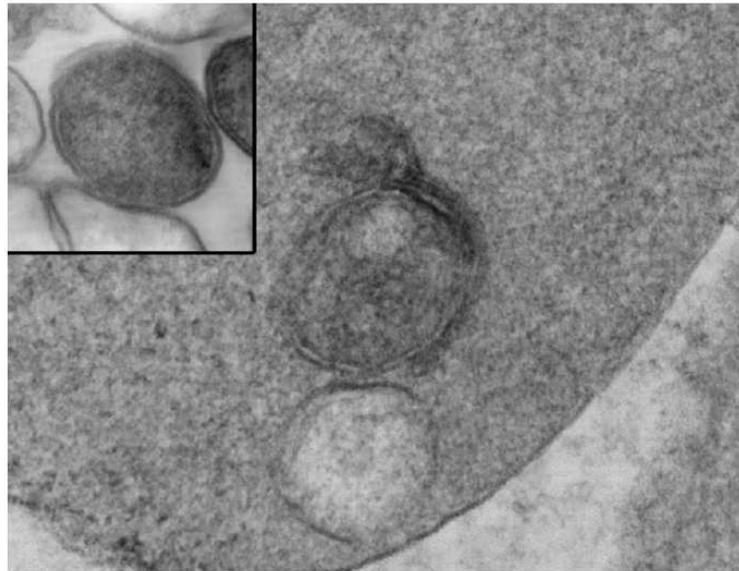


Fig. 1. Erythrocyte clearly shows typical Gram-negative trilaminar cell wall structures (initial magnification 27 800 \times) in an electron microphotograph on the 35th day after inoculation. Inset: electron microphotograph of an ATCC 49882^T *Bartonella henselae* colony.

The storage of platelet units in plasma at 22 °C for up to 5 days provides optimal conditions for bacterial growth. Contamination of platelet concentrates occurs in about 0.26% of the units, and skin flora, such as *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes* are the most frequent contaminants (Schrezenmeier *et al.*, 2007).

Species of *Bartonella* live in the interior of RBCs, as demonstrated for *B. quintana* and *B. bacilliformis*. Freezing does not limit the viability of *B. henselae*, as they are able to endure up to -80 °C (Velho *et al.*, 2002).

Donated blood samples are not lysed before seeding and the culture is thought to be negative if growth does not occur by the 7th day of incubation. It is well known that the *Bartonella* genus has an average incubation period of 15–21 days, both in blood-enriched media and in environments with high CO₂ levels.

There is a theoretical risk that an asymptomatic carrier would shelter the agents within RBCs. This study has demonstrated that *B. henselae* remains viable in RBC units during the storage period at 4 °C (American Association of Blood Banks, 2005). The incidence of asymptomatic carriers among blood donors is not known, but tests carried out with donated blood bags might include simple and inexpensive detection methods such as smears for *Bartonella* spp. and serologic screening tests.

It is necessary to prioritize research in this area, to avoid transfusional transmission of these bacteria. Recipients of blood transfusion many times are or may become immunocompromised, with risk of de-

veloping severe forms of bartonellosis. Lucey *et al.* (1992) suggested that people infected by *B. henselae* should abstain from donating blood until negative cultures are obtained, after antimicrobial therapy. This might not be enough because we are not sure about the efficacy of antibiotic treatment in bartonella infections.

The role of *B. henselae* is still unknown. As this agent may be pathogenic and cause severe illness, it is necessary to intensify studies about *Bartonella* spp. infections.

REFERENCES

- American Association of Blood Banks. (2005) *Technical Manual* (15th edn). AABB, Bethesda, Maryland.
- Bass, J.W., Vincent, J.M. & Person, D.A. (1997) The expanding spectrum of *Bartonella* infections: II. Cat-Scratch disease. *Pediatric Infectious Disease Journal*, **16**, 163–179.
- Batterman, H.J., Peek, J.A., Loutit, J.S., Falkow, S. & Tompkins, L.S. (1995) *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* adherence to and entry into cultured human epithelial cells. *Infection and Immunity*, **63**, 4553–4556.
- Birtles, R.J., Harrison, T.G. & Taylor, A.G. (1991) The causative agent of bacillary angiomatosis. *New England Journal of Medicine*, **325**, 1447–1448.
- Brenner, S.A., Rooney, J.A., Manzwetsch, P. & Regnery, R.L. (1997) Isolation of *Bartonella (Rochalimaea) henselae*: effects of methods of blood collection and handling. *Journal of Clinical Microbiology*, **35**, 544–547.

- Carithers, H.A. (1985) Cat-scratch disease. An overview based on a study of 1,200 patients. *American Journal of Diseases of Children*, **139**, 1124–1133.
- Chomel, B.B., Kasten, R.W., Floyd-Hawkins, K. et al. (1996) Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *Journal of Clinical Microbiology*, **34**, 1952–1956.
- Da Costa, P.S., Brigatte, M.E. & Greco, D.B. (2005) Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **100**, 853–859.
- Dehio, C., Meyer, M., Berger, J., Schwarz, H. & Lanz, C. (1997) Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. *Journal of Cell Science*, **110**, 2141–2154.
- Dörbecker, C., Sander, A., Oberle, K. & Schülün-Casonato, T. (2006) In vitro susceptibility of *Bartonella* species to 17 antimicrobial compounds: comparison of Etest and agar dilution. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **58**, 784–788.
- Dougherty, M.J., Spach, D.H., Larson, A.M., Hooton, T.M. & Coyle, M.B. (1996) Evaluation of an extended blood culture protocol to isolate fastidious organisms from patients with AIDS. *Journal of Clinical Microbiology*, **34**, 2444–2447.
- Eidlitz-Markus, T. & Zeharia, A. (2006) Images in clinical medicine. Cat scratch disease lymphadenopathy. *New England Journal of Medicine*, **354**, e17.
- Estrella, M. & Cosgrove, S.E. (2002) Cases from the Osler Medical Service at Johns Hopkins University. *Bartonella henselae* infection of the liver and spleen. *American Journal of Medicine*, **113**, 344–346.
- García-Caceres, U. & García, F.U. (1991) Bartonellosis. An immunodepressive disease and the life of Daniel Alcides Carrión. *American Journal of Clinical Pathology*, **95**, S58–S66.
- Goldman, M. & Blajchman, M.A. (1991) Blood product-associated bacterial sepsis. *Transfusion Medicine Reviews*, **5**, 73–83.
- Guptill, L., Wu, C.C., Glickman, L., Turek, J., Slater, L. & HogenEsch, H. (2000) Extracellular *Bartonella henselae* and artifactual intraerythrocytic pseudoinclusions in experimentally infected cats. *Veterinary Microbiology*, **76**, 283–290.
- Iwaki-Egawa, S. & Ihler, G.M. (1997) Comparison of the abilities of proteins from *Bartonella bacilliformis* and *Bartonella henselae* to deform red cell membranes and to bind to red cell ghost proteins. *FEMS Microbiology Letters*, **157**, 207–217.
- Kempf, V.A., Schaller, M., Behrendt, S., Volkmann, B., Aepfelbacher, M., Cakman, I. & Autenrieth, I.B. (2000) Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in rapid bacterial rRNA synthesis and replication. *Cellular Microbiology*, **2**, 431–441.
- Kempf, V.A., Volkmann, B., Schaller, M., Sander, C.A., Alitalo, K., Riess, T. & Autenrieth, I.B. (2001) Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations. *Cellular Microbiology*, **3**, 623–632.
- Kempf, V.A., Schairer, A., Neumann, D. et al. (2005) *Bartonella henselae* inhibits apoptosis in Mono Mac 6 cells. *Cellular Microbiology*, **7**, 91–104.
- Kordick, D.L. & Breitschwerdt, E.B. (1995) Intraerythrocytic presence of *Bartonella henselae*. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**, 1655–1656.
- Kordick, D.L. & Breitschwerdt, E.B. (1997) Relapsing bacteremia after blood transmission of *Bartonella henselae* to cats. *American Journal of Veterinary Research*, **58**, 492–497.
- Kordick, D.L., Brown, T.T., Shin, K. & Breitschwerdt, E.B. (1999) Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cat. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**, 1536–1547.
- LeBoit, P.E., Berger, T.G., Egbert, B.M., Beckstead, J.H., Yen, T.S. & Stoler, M.H. (1989) Bacillary angiomatosis. The histopathology and differential diagnosis of a pseudoneoplastic infection in patients with human immunodeficiency virus disease. *American Journal of Surgical Pathology*, **13**, 909–920.
- Liston, T.E. & Koehler, J.E. (1996) Granulomatous hepatitis and necrotizing splenitis due to *Bartonella henselae* in a patient with cancer: case report and review of hepatosplenic manifestations of bartonella infection. *Clinical Infectious Diseases*, **22**, 951–957.
- Lucey, D., Dolan, M.J., Moss, C.W. et al. (1992) Relapsing illness due to *Rochalimaea henselae* in immunocompetent hosts: implication for therapy and new epidemiological associations. *Clinical Infectious Diseases*, **14**, 683–688.
- Mändle, T., Einsele, H., Schaller, M., Neumann, D., Vogel, W., Autenrieth, I.B. & Kempf, V.A. (2005) Infection of human CD34+ progenitor cells with *Bartonella henselae* results in intraerythrocytic presence of *B. henselae*. *Blood*, **106**, 1215–1222.
- Maurin, M. & Raoult, D. (1996) *Bartonella (Rochalimaea) quintana* infections. *Clinical Microbiology Reviews*, **9**, 273–292.
- Mylonakis, E. & Calderwood, S.B. (2001) Infective endocarditis in adults. *New England Journal of Medicine*, **345**, 1318–1330.
- Piémont, Y. & Heller, R. (1999) Les bartonelloses II. Autres *Bartonella* responsables de maladies humaines. *Annales de Biologie Clinique*, **57**, 29–36.
- Pitassi, L.H., Magalhães, R.F., Barjas-Castro, M.L., de Paula, E.V., Ferreira, M.R. & Velho, P.E. (2007) *Bartonella henselae* infects human erythrocytes. *Ultrastructural Pathology*, **31**, 369–372.
- Rath, P.M., von Recklinghausen, G. & Ansorg, R. (1997) Seroprevalence of immunoglobulin G antibodies to

- Bartonella henselae* in cat owners. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **16**, 326–327.
- Resto-Ruiz, S.I., Schmiederer, M., Sweger, D., Newton, C., Klein, T.W., Friedman, H. & Anderson, B.E. (2002) Induction of a potential paracrine angiogenic loop between human THP-1 macrophages and human microvascular endothelial cells during *Bartonella henselae* infection. *Infection and Immunity*, **70**, 4564–4570.
- Rolain, J.M., Foucault, C., Guieu, R., La Scola, B., Brouqui, P. & Raoult, D. (2002) *Bartonella quintana* in human erythrocytes. *Lancet*, **360**, 226–228.
- Schrezenmeier, H., Walther-Wenke, G., Müller, T.H. *et al.* (2007) Bacterial contamination of platelet concentrates: results of a prospective multicenter study comparing pooled whole blood-derived platelets and apheresis platelets. *Transfusion*, **47**, 644–652.
- Schwartzman, W.A., Patnaik, M., Barka, N.E. & Peter, J.B. (1994) *Rochalimaea* antibodies in HIV-associated neurologic disease. *Neurology*, **44**, 1312–1316.
- Spach, D.H. & Koehler, J.E. (1998) *Bartonella*-associated infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, **12**, 137–155.
- Velho, P.E., de Moraes, A.M., Uthida-Tanaka, A.M., Cintra, M.L. & Giglioli, R. (2002) Ultrastructural changes in a standard strain of *Bartonella henselae* after passages through BALB/cAn mice. *Ultrastructural Pathology*, **26**, 161–169.
- Velho, P.E., Pimentel, V., Del Negro, G.M., Okay, T.S., Diniz, P.P. & Breitschwerdt, E.B. (2007) Severe anemia, panserositis, and cryptogenic hepatitis in an HIV patient infected with *Bartonella henselae*. *Ultrastructural Pathology*, **31**, 373–377.

3.4 Capítulo IV

Ultrastructural Pathology, 33:151–154, 2009
Copyright © Informa Healthcare USA, Inc.
ISSN: 0191-3123 print/1521-0758 online
DOI: 10.1080/01913120902785567

informa
healthcare

Bartonellosis as Cause of Death After Red Blood Cell Unit Transfusion

Renata Ferreira Magalhães, MD, PhD,
Luiza Helena Urso Pitassi, MD, and
Bruno Grosselli Lania
Dermatology Division,
Department of Internal Medicine,
School of Medical Sciences, State
University of Campinas
(UNICAMP), Campinas,
São Paulo, Brazil

Maria Lourdes Barjas-Castro, MD, PhD
Hemocentro UNICAMP, School of
Medical Sciences, State University
of Campinas (UNICAMP),
Campinas, São Paulo, Brazil

Paulo Eduardo Neves
Ferreira Velho, MD, PhD
Dermatology Division,
Department of Internal
Medicine, School of Medical
Sciences, State University of
Campinas (UNICAMP),
Campinas, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

The authors present the case of a young man with aplastic anemia who went into shock and died after several red blood cell unit transfusions. Immunohematological studies did not show any abnormality and blood cultures from patients and blood bags were negative. The ultrastructural findings, allied with current scientific knowledge, permitted the diagnosis of *Bartonella* sp. infection. In face of this diagnosis, two possibilities should be considered: the first one is that the patient was already infected by the bacteria before the last RBC unit transfusion. The pathogen could be involved in aplastic anemia etiology and in the failure to recover hemoglobin levels, in spite of the transfusions. The second possibility is that the RBC unit was contaminated with a *Bartonella* sp., which would have led to a state of shock, causing the death of the patient.

Keywords: *Bartonella*, bartonella infections, erythrocyte transfusion, iatrogenic disease

Bartonella spp. are fastidious gram-negative bacilli whose growth requires an enriched culture medium as well as an environment with high CO₂ level [1–3]. There is an extensive clinical spectrum for infection by these agents. On one end of the spectrum is the granulomatous reaction observed in cat scratch disease [4, 5]; on the other, angioproliferation of the verruga peruana and of bacillary angiomatosis [6]. It is the only genus able to foster capillary proliferation in human beings.

Other expressions of infection by these agents are Oroya fever, which progresses with severe anemia caused by erythrocytic parasitism [1], and trench fever, characterized by recurrent fever associated with infection by *Bartonella quintana* [7]. In addition to these

characteristic manifestations, psychiatric manifestations may occur, such as bipolar disorder, neurological disorders, such as Leber neuroretinitis, and dementia in immunodeficient HIV patients [8]. Cutaneous manifestations, thrombocytopenic purpura, chronic adenopathy, and chronic fatigue syndrome have been associated with *Bartonella* ssp. infection [9, 10]. Septicemia, endocarditis, and acute and chronic hepatopathies are also described [11–13].

No definition or laboratory exam is considered the gold standard for diagnosis of bartonellosis cases [2, 3]. Giemsa-staining blood smears, agent isolation, serology, gene detection techniques, immunohistochemical findings, and light and electron microscopy are used

Received 10 October 2008; accepted 28 December 2008.

Address correspondence to Dr. Renata Ferreira Magalhães, MD, PhD, Dermatology Division, Department of Internal Medicine, School of Medical Sciences, UNICAMP, Rua Tessália Vieira Camargo, 126. Barão Geraldo, Campinas, SP, Brazil 13084-971. E-mail: renatafmagalhaes@uol.com.br

[14]. Transmission electron microscopy, even though it allows diagnosis by detecting the bacilli, does not permit differentiation among *Bartonella* species [15]. None of these exams has a sufficiently high sensitivity.

We present the case of a young man with aplastic anemia who went into shock and died after several red blood cell unit transfusions. The ultrastructural findings, allied with current scientific knowledge, permitted the diagnosis of bartonella infection.

CASE REPORT

A 25-year-old black man, with a diagnosis of aplastic anemia, was referred to our service for bone marrow transplantation. He was in good general condition, febrile, and with pancytopenia (hemoglobin 5.5g/dL, leukocytes $0.5 \times 10^3/\text{mm}^3$, and platelets $11 \times 10^3/\text{mm}^3$).

The patient received irradiated and leukocyte-reduced RBC and platelet units during the hospitalization period, but the hemoglobin level was not recovered and remained around 5.0g/dL. Broad-spectrum antibiotic

therapy was introduced and the fever abated. One week after admission to the hospital he presented with headache, projectile vomiting, and convulsions. Computerized tomography of the cranium showed bleeding in the central nervous system, while neurological evaluation did not detect any deficits. Disease progression resulted in pain and tearing eyes; ophthalmologic evaluation revealed bilateral retinal bleeding.

Fourteen days after hospital admission, while receiving RBC unit transfusion the patient experienced back pain, which gradually intensified and progressed to diffuse abdominal pain and distension. A blood sample was immediately removed and forwarded for immunohematological and microbiological evaluation. The patient progressed to a lower consciousness level and hypotension, requiring an endotracheal tube and vasoactive drugs. The immunohematological analysis showed that the blood was compatible and no alloantibodies were identified. There was suspicion of septic transfusional reaction and wide-spectrum antibiotics were prescribed. On the following day, the clinical picture worsened with hemodynamic instability, deterioration of renal function, and bradycardia,

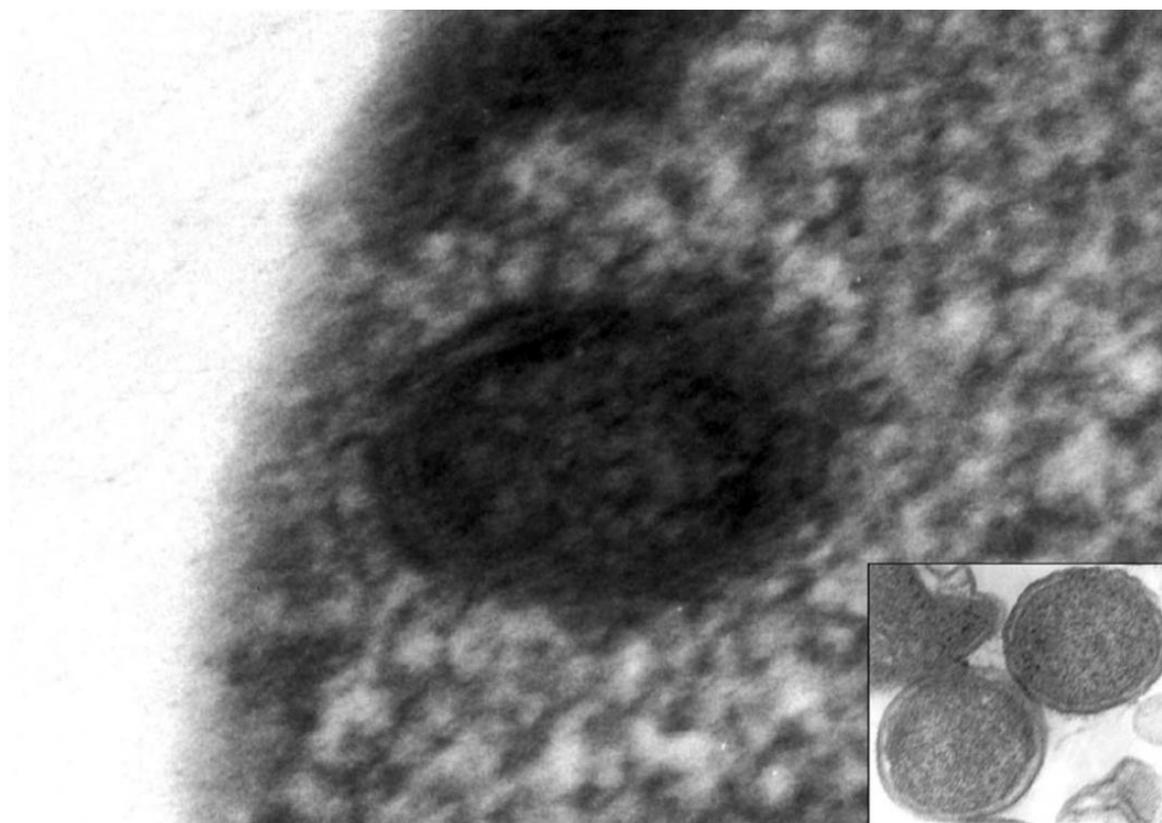


Figure 1. Erythrocyte shows typical gram-negative trilaminar cell wall structures (initial magnification 27,800 \times) on an electron microphotograph. *Inset*: Electron microphotograph of an ATCC 49882^T *B. henselae* colony.

without response to vasoactive drugs, hemodialysis, and cardiotonics. After 2 RBC unit transfusions, the hemoglobin level fell from 5.8 to 2.9 g/dL.

The patient died 72h after transfusion, presenting acute worsening of the disease during this period. Blood, urine, and secretion cultures were all negative and no infection focus was found. Immunohematological tests were performed again and the results were also negative, ruling out the possibility of immune hemolysis transfusional reaction. The postmortem examination findings showed massive hemolysis.

During later reassessment of the case, ultrastructural examination of the patient's spleen suggested intraerythrocytic presence of *Bartonella* sp. (Figure 1) as described by Pitassi et al. [16]. PCR screening of the *Bartonella* genus was carried out in paraffin-embedded tissue samples and found to be negative.

DISCUSSION

Bartonella spp. are bacilli that colonize red blood cells of several mammals. Man, cat, dog, vole, and mouse are known reservoir hosts of the *Bartonella* species [1]. The primary isolation of this bacterium is difficult and requires a special culture medium and environment, as well as prolonged time of incubation [2, 3]. In Oroya fever, caused by *B. bacilliformis*, there may be severe anemia with parasitism of up to 100% of erythrocytes. In spite of antibiotic therapy, up to this date the mortality rate of patients with this disease is high, even though the bacterium may cause chronic and asymptomatic infections in other individuals [1]. *B. henselae* has also been associated with severe anemia [17, 18].

The case presented here concerns a young man, diagnosed with aplastic anemia, without known etiology, forwarded to the Teaching Hospital of the State University of Campinas for bone marrow transplantation. He arrived neutropenic and febrile. After treatment with wide-spectrum antibiotics the fever abated, but his hemoglobin level remained low despite the several transfusions received during the 15 days he was in hospital. He presented with bleeding of the central nervous system and gastrointestinal tract. During transfusion of red blood cell concentrate he progressed to acute abdominal pain, followed by shock and death. The hypothesis of severe transfusional reaction was ruled out by immunohematological tests.

Transmission electron microscopy identified intraerythrocytic structures of size and morphology compatible with *Bartonella* spp. [19]. Among intraerythrocytic parasites that cause severe anemia, the only one with such characteristics is a bacterium of the *Bartonella* genus. A negative hemoculture does not invalidate the

diagnosis. PCR of paraffin-embedded material may also be false-negative [18].

In the face of the bartonella infection diagnosis, two possibilities should be considered: the first one is that the patient was already infected by the bacteria before the last blood transfusion received. The pathogen could be involved in aplastic anemia etiology and in the failure to recover hemoglobin levels, in spite of the transfusions. The second possibility is that transfusional transmission of *Bartonella* sp. would have led to a state of shock, which determined the death of the patient. Magalhaes et al. have demonstrated that *Bartonella henselae* survives after the storage period of red blood cell units [20].

The clinical spectrum of *Bartonella* spp. infections is wide and has increased with more prevalent consideration of this hypothesis. Damage to the human body occurs not only by direct action of the agent, but also in association with chronic inflammation caused by its presence, similarly to what happens with the *Helicobacter pylori*. This medical reasoning, not common among us, should orient future investigations about transfusional infections.

The case report presented was ultrastructurally diagnosed as bartonella infection and may be regarded as a warning about the potential severity of infection by bacteria of this genus.

Declaration of Interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

1. Garcia-Caceres U, Garcia FU. Bartonellosis: an immunodepressive disease and the life of Daniel Alcides Carrión. *Am J Clin Pathol.* 1991;95(Suppl 1):58-66.
2. Dougherty MJ, Spach DH, Larson AM, Hooton TM, Coyle MB. Evaluation of an extended blood culture protocol to isolate fastidious organisms from patients with AIDS. *J Clin Microbiol.* 1996;34:2444-2447.
3. Larson AM, Dougherty MJ, Nowowiejski DJ, et al. Detection of *Bartonella (Rochalimaea) quintana* by routine acridine orange staining of broth blood cultures. *J Clin Microbiol.* 1994;32:1492-1496.
4. Bass JW, Vincent JM, Person DA. The expanding spectrum of *Bartonella* infections, II: cat-scratch disease. *Pediatr Infect Dis J.* 1997;16:163-179.
5. Carithers HA. Cat-scratch disease: an overview based on a study of 1200 patients. *Am J Dis Child.* 1985;139:1124-1133.
6. Leboit PE, Berger TG, Egbert BM, Beckstead JH, Yen TSB, Stoler MH. Bacillary angiomatosis: the histopathology and differential diagnosis of a pseudoneoplastic infection in patients with human immunodeficiency virus disease. *Am J Surg Pathol.* 1989;13:909-910.
7. Maurin M, Raoult D. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* infections. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9:273-292.
8. Schwartzman WA, Patnaik M, Barka NE, Peter JB. *Rochalimaea* antibodies in HIV-associated neurologic disease. *Neurology.* 1994;44:1312-1316.
9. Raoult D, Drancourt M, Carta A, Gastaut JA. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* isolation in patient with chronic adenopathy, lymphopenia, and a cat. *Lancet.* 1994;343:977.

Bartonellosis as Cause of Death After Transfusion

10. Spach DH, Koehler JE. *Bartonella*-associated infections. *Emerg Infect Dis*. 1998;12:137-155.
11. Slater LN, Welch DF, Hensel D, Coody DW. A newly recognized fastidious gram-negative pathogen as a cause of fever and bacteremia. *N Engl J Med*. 1990;323:1587-1593.
12. Liston TE, Koehler JE. Granulomatous hepatitis and necrotizing splenitis due to *Bartonella henselae* in a patient with cancer: case report and review of hepatosplenic manifestations of bartonella infection. *Clinic Infect Dis*. 1996;22:951-957.
13. Estrella M, Cosgrove SE. Cases from the Osler Medical Service at Johns Hopkins University: *Bartonella henselae* infection of the liver and spleen. *Am J Med*. 2002;113:344-346.
14. Kordick DL, Brown TT, Shin K, Breitschwerdt EB. Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cat. *J Clin Microbiol*. 1999;37:1536-1547.
15. Stoler MH, Bonfiglio TA, Steigbigel RT, Pereira M. An atypical subcutaneous infection associated with acquired immune deficiency syndrome. *Am J Clin Pathol*. 1983;80:714-718.
16. Pitassi LHU, Magalhães RF, Barjas-Castro ML, De Paula EV, Velho PENF. *Bartonella henselae* infects human erythrocytes. *Ultrastruct Pathol*. 2007;31:369-372.
17. 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;115:924-925.
18. Velho PENF, Pimentel V, Del Negro GMB, Okay TS, Diniz PPVP, Breitschwerdt EB. Severe anemia, panseritis, and cryptogenic hepatitis in an HIV patient infected with *Bartonella henselae*. *Ultrastruct Pathol*. 2007;31:373-377.
19. Velho PENF, Moraes AM, Uthida-Tanaka AM, Cintra ML, Gilioli R. Ultrastructural changes in a standard strain of *Bartonella henselae* after passages through BALB/cAn mice. *Ultrastruct Pathol*. 2002;26:161-169.
20. Magalhães RF, Pitassi LHU, Salvadego M, Moraes AM, Barjas-Castro ML, Velho PENF. *Bartonella henselae* survives after the storage period of red blood cell units: is it transmissible by transfusion? *Transfus Med*. 2008;18:287-291.

3.5 Capítulo V

Bacteremia por *Bartonella* spp. e sua caracterização molecular em doadores de sangue de Campinas, Brasil

Luiza Helena Urso Pitassi¹; Pedro Paulo Vissotto de Paiva Diniz², Diana Gerardi Scorpio³; Marina Rovani Drummond¹; Bruno Lania¹; Maria Lourdes Barjas-Castro⁴; Rovilson Gilioli⁵; Silvia Colombo⁶; Stanley Sowya²; Edward B. Breitschwerdt⁷; William L. Nicholson⁸, Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho¹.

Disciplina de Dermatologia, Departamento de Clínica Médica, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)¹, São Paulo, Brasil; College of Veterinary Medicine, Western University of Health Sciences², Pomona CA USA; Department of Molecular & Comparative Pathobiology, Johns Hopkins University School of Medicine³, Baltimore MD USA, Hemocentro⁴ e Laboratório de Controle de Qualidade Animal, Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB)⁵, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp); Instituto Adolfo Lutz (IAL)⁶, São Paulo, Brasil; Intracellular Pathogens Research Laboratory, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University⁷, Raleigh, NC USA; Rickettsial Zoonoses Branch, Centers for Disease Control and Prevention⁸, Atlanta, GA USA.

Palavras chave: *Bartonella*, transfusão sanguínea, doadores de sangue, infecção

Conflito de interesse: Dr. Breitschwerdt detém a patente dos EUA No. 7.115.385 relacionada ao meio líquido de cultura.

Apoio financeiro:

- *Jonhs Hopkins Center for Global Health* – 2008. Faculty Grant in Global Health para DG Scorpio.
- FAEPEX - UNICAMP (Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão - Unicamp) - 234/10 e 292/10.
- Office of the Vice President for Research and Biotechnology, Western University of Health Sciences para S Sowya.

Correspondência para Luiza Pitassi:

Departamento de Clínica Médica (Dermatologia), Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) Cidade Universitária Zeferino Vaz, s/n, 13.081-970, Campinas, SP, Brasil. Fone/Fax: 55-19-3289-4107 Email: pitassi@yahoo.com; lpitassi@fcm.unicamp.br

Resumo

As bactérias do gênero *Bartonella* são patógenos zoonóticos negligenciados capazes de provocar diversas manifestações clínicas nos seres humanos, desde bacteremia assintomática à doença debilitante crônica e podem até ser fatal. A *B. henselae*, uma bactéria intraeritrocitária, é a espécie mais associada a doenças humanas e pode sobreviver durante a armazenagem de concentrado de hemácias após os procedimentos rotineiros de preparo e armazenamento do sangue doado. A prevalência das espécies de *Bartonella* foi investigada em uma grande população de doadores de sangue na cidade de Campinas, São Paulo, Brasil. As amostras de sangue de 500 doadores voluntários foram inoculadas em meio de crescimento líquido BAPGM (*Bartonella* Alpha-Proteobacteria Growth liquid Medium) e incubadas a 37 °C em 5% CO₂ durante 14 dias. Subsequentemente, foram sub-inoculadas em meio ágar sangue de carneiro por mais 42 dias. A cultura líquida foi analisada por meio da PCR convencional que amplifica a região intergênica 16S-23S rRNA (ITS) do gênero *Bartonella* e os produtos amplificados foram sequenciados para a identificação de espécies. Os isolados gram-negativos obtidos da cultura sólida foram também testados por amplificação de DNA genero-específico juntamente com a caracterização molecular por meio de seqüenciamento. Os anticorpos IgG contra *B. henselae* e *B. quintana* foram detectados pela Imunofluorescência Indireta no soro dos doadores. A *B. henselae* foi isolada em seis doadores de sangue e dezesseis (3,2%) mostraram-se positivos na PCR ITS para *Bartonella* spp. após cultura em meio líquido e/ou sólido. O seqüenciamento do DNA indicou que 15 amostras eram homólogas à *B. henselae* e uma amostra homóloga à *B. clarridgeiae* quando comparadas àquelas depositadas no *Gen Bank*. Os anticorpos contra *B. henselae* e *B. quintana* foram detectados em 16,2% (81/500) e 32% (160/500) dos doadores, respectivamente. O DNA da *Bartonella* sp. foi demonstrado em 3,2% das amostras de sangue dos doadores cultivadas em meio de cultura líquida (em 15 doadores foi sequenciada a *B. henselae* e em um a *B. clarridgeiae*) e 1,2% apresentou bacteremia por *B. henselae* em isolados obtidos da cultura sólida. Estes resultados estabelecem a necessidade de reavaliação da transmissão de espécies de *Bartonella* através de transfusões de sangue, especialmente em pacientes pediátricos, idosos e nos imunodeficientes.

Introdução

Bartonella é um gênero que compreende bactérias fastidiosas com distribuição mundial, responsável por diversas infecções crônicas em animais e humanos¹. As espécies de *Bartonella* são consideradas patógenos zoonóticos negligenciados transmitidos aos seres humanos por uma variedade de vetores artrópodes incluindo os flebótomos, piolhos do corpo, pulgas e carrapatos^{2,3}. Nos últimos anos, um amplo espectro de manifestações clínicas associadas a essas infecções surgiu rapidamente, sendo que os médicos raramente consideram esta infecção e na maioria dos casos a doença não é diagnosticada

corretamente^{4,5}. Nos seres humanos, espécies de *Bartonella* spp. são conhecidas como agentes causadores de verruga peruana, doença da arranhadura do gato, febre das trincheiras e angiomatose bacilar, podendo a doença se manifestar de forma assintomática ou até mesmo ser fatal^{6,7}.

A infecção por *Bartonella* spp. causa imunossupressão, como é bem documentada na febre de Oroya, que corresponde a primeira fase da bartonelose peruana⁸. A bartonelose deve, portanto, ser sempre considerada uma doença potencialmente sistêmica, mesmo em pacientes imunocompetentes. No entanto, os imunodeficientes são mais suscetíveis a quadros clínicos graves causados por estas bactérias⁹.

Algumas espécies de *Bartonella* são capazes de infectar e de sobreviver em células vermelhas do sangue¹⁰, resultando em uma infecção intraeritrocitária e intraendotelial de longa duração e que pode estar associada a um padrão de bacteremia recorrente¹¹. Foi demonstrado que estas bactérias invadem, multiplicam-se e persistem por toda a vida em células do hospedeiro infectado¹². A bacteremia prolongada permite uma maior oportunidade para que a transmissão ocorra entre os hospedeiros. A *B. henselae* é a espécie mais frequentemente relacionada à infecção humana e pode causar infecção crônica e assintomática⁷.

Estudos anteriores deste grupo, utilizando microscopia eletrônica de transmissão e cultura da bactéria, demonstraram a capacidade da *B. henselae* sobreviver no sangue armazenado por 35 dias, ilustrando o potencial da infecção associado à transfusão sanguínea¹³. Também foi comprovado que esta bactéria se adere a eritrócitos humanos após 10 horas da inoculação e invade os eritrócitos após 72 horas¹⁴. Estes dados laboratoriais sugerem um papel importante de *Bartonella* spp. na Medicina Transfusional¹³, visto que a infecção por transfusão já foi documentada em gatos¹⁵, além da transmissão de espécies de *Bartonella* por agulhas contaminadas ter sido relatada em seres humanos^{16,17}, bem como um caso de choque e morte após a transfusão de sangue¹⁸. A transmissão transfusional da *B. bacilliformis* também já foi documentada¹⁹.

Não existe um método “padrão ouro” para o diagnóstico de *Bartonella* spp.²⁰. Várias técnicas são necessárias para evitar resultados falso-negativos. Culturas líquidas e sólidas, técnicas moleculares e sorológicas têm sido utilizados em conjunto para melhorar a sensibilidade do diagnóstico¹¹.

O objetivo deste trabalho foi detectar a prevalência da exposição e também a bacteremia causada por *Bartonella* spp. em uma população de doadores de sangue em Campinas, Estado de São Paulo, Brasil, por meio de cultura líquida e sólida, sorologia, PCR e o sequenciamento.

Métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Campinas, Brasil (CEP 122/2005). A seleção dos doadores de sangue e a triagem das doenças infecciosas para este estudo estão em conformidade com as normas nacionais e internacionais vigentes^{21,22}. Os doadores de sangue voluntários deste estudo foram provenientes do Centro de Hematologia e Hemoterapia da Unicamp (Hemocentro), que abrange uma região geográfica com uma população estimada de 2,8 milhões de pessoas no estado de São Paulo, Brasil.

Quinhentos doadores de sangue foram aleatoriamente incluídos neste estudo. Após a preparação asséptica do local da punção venosa, 5 mL de sangue total foram coletados em um tubo contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e outros 5mL foram coletados em um tubo separador para obtenção de soro. As amostras foram armazenadas a -20 °C até serem analisadas.

Dois mililitros de sangue total com EDTA de cada doador foram adicionados a 8mL de meio líquido de crescimento *Bartonella* alfa-Proteobacteria (BAPGM), incubados a 37 °C com 5% de CO₂, em atmosfera saturada de água e mantido em constante movimento de agitação durante 14 dias. Os controles negativos para o meio BAPGM foram incluídos em cada lote das hemoculturas. Subsequentemente, 1mL da cultura líquida foi inoculado em tubos de ágar enriquecido com 30% de sangue de carneiro *Bartonella*-negativo (confirmado por PCR e por cultura)²³ por mais 42 dias. Os controles negativos do BAPGM também foram incubados em ágar-sangue. Os tubos de ágar foram inspecionados semanalmente quanto à evidência de crescimento bacteriano. Ao se observar na cultura um crescimento bacteriano semelhante ao da *Bartonella* sp., colônias eram coletadas em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) e congelada para posterior identificação por métodos moleculares. Todo o processo da cultura da *Bartonella* sp. deste trabalho foi realizado no Laboratório de Controle de Qualidade Animal, Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB), Unicamp, com nível de biossegurança classe 2 a fim de minimizar a possibilidade de contaminação dos espécimes.

Após 14 dias do período de incubação, uma alíquota de 1mL de meio de cultura líquido foi centrifugado e o sedimento (200µL) foi submetido à PCR convencional para o gênero *Bartonella*. As técnicas moleculares foram realizadas em quatro salas separadas para evitar a contaminação do DNA. O fluxo de trabalho realizado foi unidirecional entre as áreas pré-PCR (manuseamento das amostras, preparação e extração do DNA) e entre as áreas pós-PCR (amplificação do DNA, análise do gel e detecção dos produtos de amplificação). Todo material descartável e equipamentos eram específicos de cada sala. Foram realizados rigorosos procedimentos laboratoriais a fim de se evitar a contaminação dos reagentes e das amostras amplificadas²⁴.

Para a extração do DNA das culturas líquidas BAPGM e dos isolados do ágar-sangue suspensos em BHI foi utilizado o Mini Kit QIAamp DNA[®] (QIAGEN Inc., Valencia, CA) seguindo as instruções do fabricante. A média de produção de DNA obtida foi de 6,19ng/ul (DP: 32,8ng/ul) e a proporção 260/280 média foi de 1,47 (DP: 2,03), sendo estas concentrações mensuradas em aparelho NanoDrop[®]. A triagem inicial com PCR foi realizada utilizando um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores desenhados manualmente visando a região intergênica 16S-23S de rRNA (ITS) da *Bartonella* spp.. Os *primers* utilizados foram 314A-s (5'-CGTTTCTCTTTCTTCMGATGATGATCCC-3'), 314B-s (5'-CGTTTCTCTTTCTTCRGATGATGATCCC-3') e 357A-s (5'-GCGCTCTAACCAACTGAGC-3'). O volume de 25µL da mistura da reação continha 0,25µL de unidades de Taq DNA-polimerase (5U/µL), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 5µL de amostra de DNA. As amplificações foram realizadas sob as seguintes condições: um ciclo de aquecimento a 95°C durante 2 minutos, seguido por 45 ciclos de desnaturação a 95°C durante 60 segundos, anelamento a 58°C durante 60 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos. A amplificação foi completada por um ciclo adicional a 72°C durante 5 minutos. Os produtos foram, então, analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% sob exposição à luz ultravioleta (Figura 1). Em todas as reações de PCR foram adicionados três controles: controle negativo BAPGM (meio BAPGM sem inóculo e incubado simultaneamente com cada série de culturas líquidas), controle dos reagentes (“branco de extração”: tubo onde todas as soluções da extração eram adicionadas) e um controle positivo (DNA extraído a partir de uma cepa padrão de *B. henselae* Houston-1 ITS ATCC 49882[™]). Uma concentração conhecida do DNA da *B. henselae* foi diluída em série de 10 vezes até 10⁹ equivalentes a um genoma (GE) por microlitro para determinar a sensibilidade da técnica de PCR. Este método de PCR convencional foi capaz de detectar um mínimo de 50 GE de *B. henselae* por tubo de reação. As amostras PCR negativas foram analisadas para um gene constitutivo para confirmar a qualidade da extração. A região escolhida foi um fragmento da GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), uma enzima relacionada com a glicólise e expressada por todas as células de mamíferos. Estes testes de triagem foram realizados no Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB), Unicamp, Brasil.

As amostras de DNA das culturas líquidas positivas para *Bartonella* sp. e o DNA das culturas sólidas isoladas suspeitas foram adicionalmente testadas na Western University of Health Sciences, EUA, para a identificação da espécie. As amostras de DNA foram testadas por PCR ITS em tempo real (*Real Time*) utilizando os *primers* desenhados manualmente para amplificar um fragmento da região ITS de todas as espécies de *Bartonella*. A mistura de reação continha 25µL de mistura de PCR 1X (SYBR[®] Premix Ex Taq, Takara Bio Inc., Shiga, Japan), 7,5pmol de iniciador 314A-s (5'-CGTTTCTCTTTCTTCMGATGATGATCCC-3'), 7,5pmol de iniciador 314B-s (5'-

CGTTTCTCTTTCTTCRGATGATGATCCC-3'), 10,5pmol de iniciador 382-as (5'-ACTTSAACCTCCGACCTCACGCTTAT-3'), 1X de ROX corante de referência e 5µL de molde de DNA. Os controles negativos foram incluídos em cada lote do teste conforme descrito acima. As amplificações foram realizadas sob as seguintes condições: um ciclo de aquecimento a 95°C durante 1 minuto seguido de 50 ciclos de desnaturação a 94°C durante 10 segundos, hibridação a 58°C durante 20 segundos e extensão a 72°C durante 20 segundos. A amplificação foi detectada por fluorescência do reagente SYBR Green I com emissão a 522 nm. As curvas de fusão foram obtidas para cada amplificação. O limite de detecção de 5 cópias por reação foi determinado como descrito acima.

As amostras de DNA isoladas da cultura sólida e confirmadas por conter DNA de *Bartonella* sp. pela mesma metodologia foram caracterizadas utilizando os métodos de PCR convencionais previamente publicados para a região ITS²⁵, para o gene citrato sintase (gltA)²⁶, para a proteína de ligação heme (pap31)²⁵. Além disso, as amostras foram submetidas a um PCR convencional para a *B. koehlerae*^{27,28}. As amostras de DNA extraídas das culturas líquidas não foram testadas por estes métodos devido ao material genômico ser insuficiente.

As amostras amplificadas a partir de um dos cinco métodos de PCR utilizados durante os passos de confirmação foram purificados com o MiniElute kit (Qiagen, Valencia, California, EUA) de acordo com as instruções do fabricante e sequenciadas por um sistema automatizado de sequenciamento baseado em fluorescência (Eurofins MWG Operon, Huntsville, Alabama, EUA). A avaliação do cromatograma, a deleção do *primer* e o alinhamento da sequência foram realizados utilizando os *softwares* Contig Express e Align X (Vector NTI Suíte 10.1, Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, EUA). As espécies de bactérias foram definidas por comparação e semelhança com outras sequências depositadas no *GenBank* utilizando a ferramenta de pesquisa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)²⁹.

Sorologia

As amostras de soro foram analisadas quanto à presença de anticorpos IgG contra os antígenos de *B. henselae* e *B. quintana* por meio da técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI) e os títulos ≥ 64 foram considerados soropositivos. Os antígenos de *B. henselae* e *B. quintana* provenientes de cultura de células Vero, conforme descrito anteriormente²³, foram fornecidos pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC-Atlanta, EUA). As amostras de soro foram diluídas a 1:64 em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e 25µL foi adicionado em poços contendo células infectadas por *Bartonella* sp. fixadas em uma lâmina de vidro e incubadas durante 30 min a 37 ° C. As lâminas foram lavadas três vezes com PBS (5 minutos cada), cobertas com imunoglobulina IgG anti-humana conjugada com isotiocianato de fluoresceína (Sigma, St. Louis, MO, EUA)

a uma diluição de 1:150, incubadas a 37 ° C durante 30 minutos, lavadas e secas. Após a montagem das lâminas com glicerina tamponada a leitura foi realizada em um microscópio de fluorescência e o título de corte da reação de IFI foi de 1:64. O teste foi considerado positivo na presença de coloração esverdeada brilhante das bactérias detectadas por microscopia de fluorescência na ampliação de 400x (Figura 2).

Para os controles negativos foram utilizadas amostras sabidamente negativas. A titulação seria realizada se uma co-relação fosse estabelecida com sorologia positiva e cultura e/ou PCR positivos.

Análise dos dados

Os doadores de sangue positivos na PCR, após análise das culturas líquidas e sólidas, foram considerados bacterêmicos para espécies de *Bartonella*. As prevalências moleculares e sorológicas para *Bartonella* spp. foram descritas como frequências absolutas, percentuais e intervalos de confiança de 95% (calculadas usando o método de pontuação). As análises estatísticas foram realizadas utilizando JMP Pro 10 para Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Resultados

Dos 500 doadores de sangue testados, 16 (3,2%, IC 95%: 2,0% - 5,1%) foram positivos na PCR para *Bartonella* spp. baseada na região ITS após cultura do sangue em meios líquido e/ou sólido. Após o sub-cultivo sólido em ágar-sangue das amostras de sangue dos doadores, 36 isolados foram sugestivos de *Bartonella* spp. por meio da coloração de Gram das colônias bacterianas e seis isolados foram identificados como *B. henselae*. A análise da sequência após a amplificação da região ITS (157-271 pb de tamanho) do DNA obtido dos meios líquidos e sólidos revelou *B. henselae* em 15 das 16 culturas (3%, IC de 95%: 1,8% - 4,9%) e *B. clarridgeiae* em uma cultura (0,2%, IC de 95%: 0% - 1,1%) (Tabela 1).

Entre os 16 doadores de sangue positivos na PCR para *Bartonella* sp., 11 mostraram-se positivos a partir do DNA extraído na cultura líquida BAPGM, seguido por PCR e sequenciamento, enquanto que 6 foram detectados apenas depois do sub-cultivo sólido em ágar-sangue, seguido por PCR e sequenciamento (Tabela 1). Apenas um doador foi PCR positivo em ambas as subculturas líquidas e sólidas.

Quando posteriormente amplificadas e sequenciadas, 4 amostras, destas 6 isoladas da cultura sólida, continham um fragmento maior (559 pb de tamanho) da região ITS confirmando a presença de *B. henselae*. A homologia da sequência de DNA obtida neste estudo por ITS foi de 100% de similaridade quando comparada com as sequências de *B. henselae* (número de acesso NC_005956.1) e *B. clarridgeiae* (número de acesso NC_014932.1) depositadas anteriormente no *GenBank*.

Similarmente, o DNA da *B. henselae* também foi confirmado após cultura de enriquecimento em cinco amostras por amplificação e sequenciamento do gene *gltA* (338 pb) e a partir de três amostras por amplificação e sequenciamento do gene *pap31* (501 pb) com 100% de homologia. Nenhum doador de sangue mostrou-se positivo na PCR ITS para *B. kohlerae* baseado na região intergênica.

Os anticorpos anti-*B. henselae* e *B. quintana* foram detectados em 16,2% (81/500, IC 95% = 13,2%-19,7%) e 32% (160/500, IC 95% = 28,0%-36,2%) das amostras dos 500 doadores de sangue, respectivamente. Entre os doadores de sangue sororreativos para *B. henselae*, apenas dois foram considerados bacterêmicos para *B. henselae* por PCR da cultura líquida de enriquecimento. A *B. quintana* não foi detectada por meio de PCR na cultura líquida de enriquecimento em nenhum doador de sangue neste estudo. No entanto, dois doadores de sangue sororreativos para a *B. quintana* foram considerados bacterêmicos para *B. henselae* por PCR na cultura líquida de enriquecimento, com um deles também sororreagente para *B. henselae*. O doador bacterêmico por *B. clarridgeiae* mostrou-se soronegativo frente aos antígenos de *B. henselae* e *B. quintana* (Tabela 1).

Tabela1. Resultado da sorologia e sequenciamento de DNA de 16 doadores de sangue testados para exposição e infecção por espécies de *Bartonella*.

Doador de sangue	Sorologia (IFI) ^a		<i>Bartonella</i> spp. identificadas por sequenciamento de DNA				
	<i>B. henselae</i>	<i>B. quintana</i>	Amostras testadas	ITS ^b 314s-382as	ITS ^b 325s-1100as	Pap31 ^c 1s-668as	gltA ^d 781p-1137n
1	Negativo	Negativo	Cultura líquida	<i>B. henselae</i>	NR ^e	NR ^e	NR ^e
2	Negativo	Negativo	Cultura líquida / isolado	<i>B. henselae</i> ^f	<i>B. henselae</i>	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo	Isolado	<i>B. henselae</i>	Negativo	Positivo ^g	<i>B. henselae</i>
4	Positivo	Negativo	Cultura líquida	<i>B. henselae</i>	NR ^e	NR ^e	NR ^e
5	Negativo	Negativo	Isolado	<i>B. henselae</i>	<i>B. henselae</i>	<i>B. henselae</i>	<i>B. henselae</i>
6	Negativo	Negativo	Isolado	<i>B. henselae</i>	Negativo	Negativo	<i>B. henselae</i>
7	Negativo	Negativo	Isolado	<i>B. henselae</i>	<i>B. henselae</i>	<i>B. henselae</i>	<i>B. henselae</i>
8	Negativo	Negativo	Cultura líquida	<i>B. henselae</i>	NR ^e	NR ^e	NR ^e
9	Negativo	Negativo	Cultura líquida	<i>B. henselae</i>	NR ^e	NR ^e	NR ^e
10	Negativo	Negativo	Cultura líquida	<i>B. clarridgeiae</i>	NR ^e	NR ^e	NR ^e
11	Negativo	Negativo	Cultura líquida	<i>B. henselae</i>	NR ^e	NR ^e	NR ^e
12	Negativo	Negativo	Cultura líquida	<i>B. henselae</i>	NR ^e	NR ^e	NR ^e
13	Negativo	Negativo	Cultura líquida	<i>B. henselae</i>	NR ^e	NR ^e	NR ^e
14	Negativo	Positivo	Cultura líquida	<i>B. henselae</i>	NR ^e	NR ^e	NR ^e
15	Negativo	Negativo	Cultura líquida	<i>B. henselae</i>	NR ^e	NR ^e	NR ^e
16	Positivo	Positivo	Isolado	<i>B. henselae</i>	<i>B. henselae</i>	<i>B. henselae</i>	<i>B. henselae</i>

^aImunofluorescência indireta com ponto de corte 1:64.

^bGene do espaço transcrito intergênico 16S-23S rRNA

^c Proteínas de ligação associadas ao grupo heme

^d Gene citrato sintase

^e Não realizada devido ao material genético insuficiente

^f Tanto a cultura líquida quanto o isolado revelaram as mesmas espécies de *Bartonella*. Outros testes de PCR foram somente realizados nos isolados devido ao material genômico insuficiente da cultura líquida.

^g O sequenciamento do DNA não foi realizado nesta amostra



Figura 1. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à PCR para o gênero *Bartonella*. Canaletas 1-9: DNA das amostras de culturas líquidas positivas para *Bartonella*. Canaleta 10 e 11: Amostras negativas. Canaleta 12: Controle positivo da reação de PCR (208bp). Canaleta 13: Controle negativo da reação de PCR. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases.

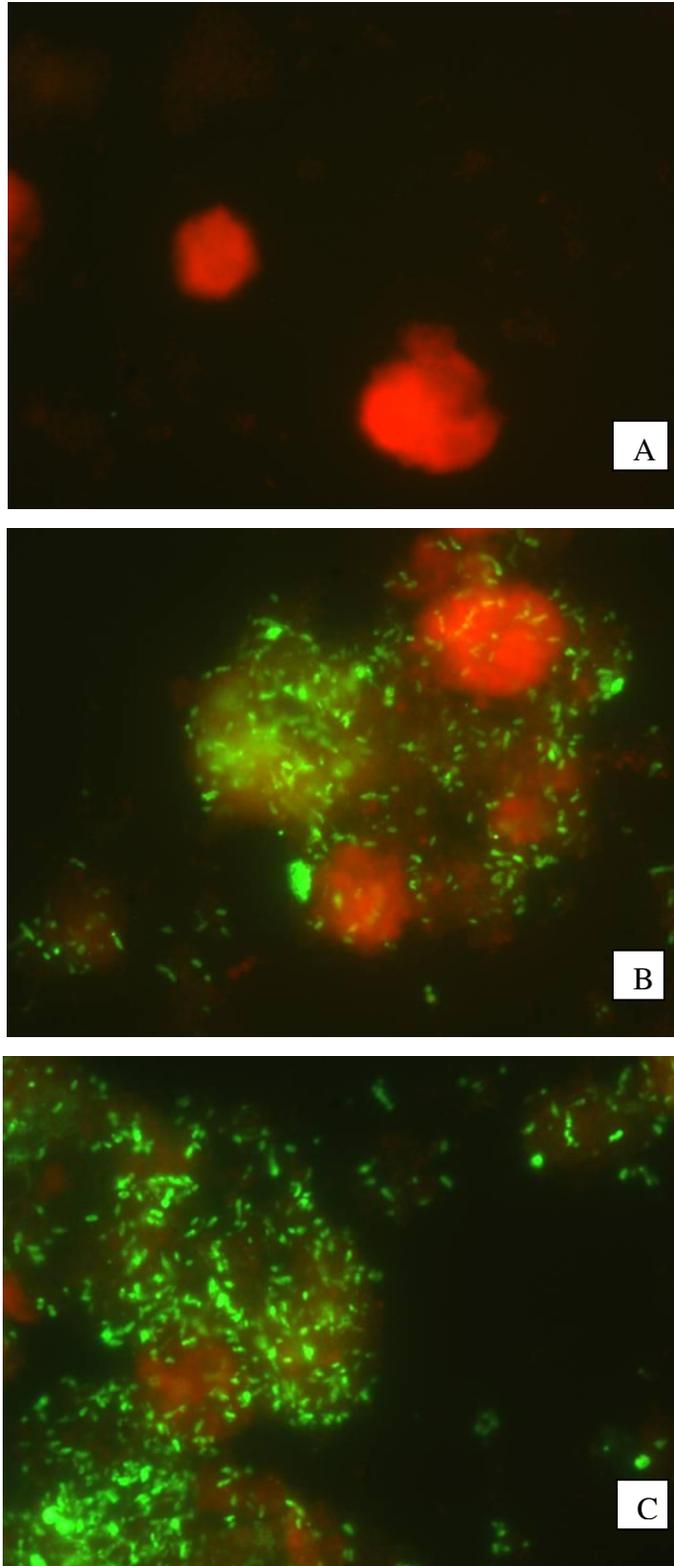


Figura 2. (A, B e C) - Reação de Imunofluorescência Indireta para *Bartonella* spp.. A: Padrão de fluorescência com soro de controle negativo humano. B: Padrão de fluorescência com soro de controle positivo humano. C: Soro de doador positivo. Aumento de 1.000 x

Discussão

Bartonella spp. são agentes infecciosos re-emergentes que podem induzir infecção assintomática e intraeritrocitária nos hospedeiros, sendo isolados em vários quadros clínicos, tanto em pacientes imunodeficientes como nos imunocompetentes^{7, 33,34,35}.

Há um número limitado de estudos sobre a ocorrência e a patogenicidade da infecção por *Bartonella* spp. em seres humanos. Uma pesquisa sistemática deve ser realizada em alguns pacientes com doenças idiopáticas, como a hepatite criptogênica, por exemplo³⁶. Qualquer infecção com uma fase de bacteremia assintomática tem o potencial de transmissão por transfusão. A sobrevivência do agente infeccioso no sangue coletado e a sua capacidade de causar infecção por via intravenosa, também são fatores necessários para a transmissão por essa via³⁷. A capacidade de sobrevivência da *B. henselae* em sangue doado já foi descrita anteriormente^{6,38}. A *B. henselae* apresenta distribuição mundial e é a espécie mais frequentemente envolvida em infecção humana chegando a resultar em fatalidade³⁹.

A transmissão por transfusão é de grande relevância se o agente causar uma doença identificável no receptor³³. Doença febril autolimitada de 48-72h de duração, anemia transitória leve a moderada, disfunção neurológica transitória e abscessos hepáticos foram relatados após transmissão experimental por transfusão de *B. henselae* em gatos^{15,40}. Em humanos, manifestações clínicas relacionadas à infecção por *Bartonella* spp. (dor de cabeça, fadiga, febre e dor) foram descritas após punção com agulha contaminada acidentalmente em veterinários^{16,17}. A transmissão de *Bartonella* sp. por transfusão de sangue só será documentada se os médicos considerarem a possibilidade de infecção crônica.

Outro fator relacionado ao surgimento aparente de *Bartonella* spp. é o desenvolvimento de técnicas avançadas de diagnóstico³³. Historicamente, os métodos laboratoriais tradicionais para o diagnóstico de *Bartonella* sp. são pouco sensíveis. Nos últimos anos, o desenvolvimento de métodos moleculares altamente sensíveis e específicos, associados aos meios de cultura específicos aumentou a detecção da bactéria. Além disso, a utilização destas plataformas com múltiplos exames realizados em diferentes amostras clínicas coletadas em várias ocasiões do mesmo indivíduo, apresenta o potencial de reduzir o número de resultados falso-negativos^{41,42}.

O diagnóstico de bartonelose continua a ser um problema, devido à dificuldade para se realizar a cultura da bactéria. As bartoneloses poderão ser confirmadas por uma combinação de técnicas microbiológicas e moleculares associadas ao exame histopatológico, no entanto os resultados negativos devem ser avaliados cuidadosamente⁴³ e sempre que possível realizar a combinação destes métodos diagnósticos⁴⁴.

No presente estudo, usando a combinação de culturas líquidas e sólidas enriquecidas, 36 isolados obtidos foram sugestivos de *Bartonella* spp. pela coloração de Gram. Seis em 34 destes foram caracterizados como *B. henselae*.

O resultado negativo na PCR não significa a ausência de DNA da *Bartonella* sp.. A bacteremia por *Bartonella* spp. em doadores assintomáticos deve ser em torno de 10UFC/mL de sangue⁴⁵, muito abaixo do limite de detecção das reações moleculares. Outra razão para os resultados falso-negativos é que espécies de *Bartonella* tipicamente provocam uma bacteremia cíclica. Devido ao fato de que somente uma amostra de sangue foi testada uma vez de cada doador de sangue neste estudo, o número de indivíduos com bacteremia pode ter sido subestimado. Além disso, todos os indivíduos voluntários para as doações de sangue são saudáveis ou assintomáticos. Supõe-se que baixos níveis de bacteremia cíclica ocorram em seres humanos saudáveis. Neles o sistema imune seria capaz de evitar um elevado número de micro-organismos na corrente sanguínea. Portanto, deve-se esperar que o número real de doadores de sangue infectados com *Bartonella* spp. seja mais elevado do que os nossos resultados atuais.

Os anticorpos anti-*B. quintana* e *B. henselae* foram detectados em 32% (160/500) e 16,2% (81/500) de 500 doadores de sangue, respectivamente. Um estudo anterior realizado no Brasil avaliou 437 indivíduos saudáveis de uma área rural do Estado de Minas Gerais expostos a esses patógenos. Foi encontrada uma soroprevalência para *B. henselae* em 12,8% e para *B. quintana* em 13,7%⁴⁶. Entre 125 pacientes assintomáticos HIV positivos no Rio de Janeiro, 41,6% foram sororreagentes para *Bartonella* spp.⁴⁷. No presente estudo, não foi possível detectar qualquer diferença estatística entre sororreatividade e infecção em doadores assintomáticos. Em muitos casos, a sorologia não se correlacionou com a amplificação do PCR positivo seguido de sequenciamento do DNA ou com o isolamento de *Bartonella* sp.. Todos os resultados sorológicos positivos devem ser interpretados com cuidado e no contexto clínico. O seguimento dos títulos pode também ser útil para documentar a infecção baseado na soroconversão.

Quando os gatos são utilizados como doadores de sangue estes devem ser rastreados para *Bartonella* spp., principalmente se existir história anterior de bartonelose clínica ou de exposição à pulgas. Havendo positividade em qualquer teste, o gato deve ser excluído do programa de doação de sangue, porque o tratamento de forma consistente não leva à eliminação da infecção⁴⁸. Não há orientação humana relacionada à *Bartonella* spp. em doadores de sangue ou de órgãos. Os doadores de sangue positivos neste estudo foram classificados como inadequados para doações de sangue. Esta decisão foi assumida após um parecer do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da UNICAMP.

Conclusão

Os resultados deste estudo indicam que a exposição humana à espécies de *Bartonella* ocorre freqüentemente na região Sudeste do Brasil, demonstrando que existe um risco real de contaminação dos produtos do sangue por bactérias provenientes dos doadores de sangue bacterêmicos e assintomáticos. O impacto da transmissão de espécies de *Bartonella* através de transfusões de sangue e em receptores de transplantes de órgãos necessita de reavaliação, bem como o uso de tecnologias avançadas para a triagem diagnóstica da infecção por *Bartonella* sp. em doadores de sangue.

Referências

1. Breitschwerdt EB, Kordick DL. *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:428-438.
2. Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB, Kasten RW, Vayssier-Taussat M, Birtles RJ, Koehler JE and Dehio C. Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. *Vet Res* 2009; 40, (2):29.
3. 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 (San Antonio)* 2010; 20: 8-30.
4. Boulouis HJ, Chang CC, Henn JB, Kasten RW and Chomel BB. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet Res* 2005; 36:383-410.
5. Liu Q, Eremeeva ME, Li D. *Bartonella* and *Bartonella* infections in China: From the clinic to the laboratory. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2012; 35(2):93-102.
6. Magalhães RF, Cintra ML, Barjas-Castro ML, Del Negro GMB, Okay TS and Velho PENF. Blood donor infected with *Bartonella henselae*. *Transfusion Medicine* 2010; 20: 280–282.
7. Harms A, Dehio C. Intruders below the radar: molecular pathogenesis of *Bartonella* spp. *Clin Microbiol Rev.* Jan 2012; 25(1):42-78.
8. Pulliainen AT, Dehio C. Persistence of *Bartonella* spp. stealth pathogens: from subclinical infections to vasoproliferative tumor formation. *FEMS Microbiol Rev.* May 2012; 36(3):563-599.
9. Mosepele M, Mazo D, Cohn J. *Bartonella* infection in immunocompromised hosts: immunology of vascular infection and vasoproliferation. *Clinical & developmental immunology* 2012; 2012:612809.
10. Pitassi LH, Cintra ML, Ferreira MR, Magalhaes RF, Velho PE. Blood cell findings resembling *Bartonella* spp. *Ultrastruct Pathol* 2010; 34(1):2-6.
11. Maggi RG, Mascarelli PE, Pultorak EL, et al. *Bartonella* spp. bacteremia in high-risk immunocompetent patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* Dec 2011; 71(4):430-437.

12. Schulein R, Seubert A, Gille C, *et al.* Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes: a unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. *J Exp Med* 2001; 193:1077-1086.
13. 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; 18:287-291.
14. Pitassi LHU, Magalhães RF, Barjas-Castro ML, De Paula EV, Velho PENF. *Bartonella henselae* infects human erythrocytes. *Ultrastruct Pathol* 2007; 31:369–372.
15. Kordick DL, Brown TT, Shin K, Breitschwerdt EB. Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1536-1547.
16. Oliveira, AM, Maggi, RG, Woods, CW, Breitschwerdt, EB. Putative needle stick transmission of *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* to a veterinarian. *J Vet Intern Med* 2010; 24:1229–1232.
17. 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.
18. Magalhaes RF, Pitassi LHU, Lania B G, Barjas-Castro M L & Velho PENF. Bartonellosis as cause of death after red blood cell unit transfusion. *Ultrastructural Pathology* 2009; 33(0):151-154.
19. Ruiz J, Silva W, Pons MJ, Del Valle LJ, Tinco CR, Casabona VD, ... & del Valle J. Long time survival of *Bartonella bacilliformis* in blood stored at 4° C. A risk for blood transfusions. *Blood Transfusion* 2012; 10(4):563-564.
20. Velho PE. Blood transfusion as an alternative bartonellosis transmission in a pediatric liver transplant. *Transpl Infect Dis* 2009; 11:474.
21. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução 153 de 14 de junho de 2004. Determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea. *Diário Oficial da União, Brasília, DF, 24 de Junho; Seção 1, 2004. p. 68.*
22. Standards for blood banks and transfusion services. 28th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Bank; 2012.
23. Drummond MR, Pitassi LHU, Lania BG, Santos SRC, Gilioli R, Velho PENF. Detection of *Bartonella henselae* in defibrinated sheep blood used for culture media supplementation. *Braz J Microbiol* 2011; 42(2), 430-432.
24. Apfalter P, Reischl U & Hammerschlag MR. In-House Nucleic Acid Amplification Assays in Research: How Much Quality Control Is Needed before One Can Rely upon the Results? *J Clin Microbiol* 2005; 43(12): 5835-5841.
25. Diniz PP, Maggi RG, Schwartz DS, Cadenas MB, Bradley JM, Hegarty B & Breitschwerdt EB. 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.

26. Norman AF, Regnery R, Jameson P, Greene C & Krause DC. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *Journal of clinical microbiology* 1995; 33(7): 1797-1803.
27. Varanat M, Maggi RG, Linder KE & Breitschwerdt EB. Molecular prevalence of *Bartonella*, *Babesia*, and hemotropic *Mycoplasma* sp. in dogs with splenic disease. *J Vet Intern Med* 2011; 25(6): 1284-1291.
28. Breitschwerdt EB, Mascarelli PE, Schweickert LA, Maggi RG, Hegarty BC, Bradley JM & Woods CW. Hallucinations, sensory neuropathy, and peripheral visual deficits in a young woman infected with *Bartonella koehlerae*. *Journal of clinical microbiology* 2011; 49(9), 3415-3417.
29. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* 1990; 215(3): 403-410.
30. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M & Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* 2011; 28(10): 2731-2739.
31. Hosmer DW, Lemeshow S: *Applied Logistic Regression*, 2nd Edition (Second ed.) Wiley Publishing; 2001.
32. Greenland S, Schwartzbaum JA, Finkle WD: Problems due to small samples and sparse data in conditional logistic regression analysis. *Am J Epidemiol* 2000, 151:531-539.
33. 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; 155:1670-6.
34. Maggi RG, Mascarelli PE, Pultorak EL, *et al.* *Bartonella* spp. bacteremia in high-risk immunocompetent patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. Dec 2011; 71(4):430-437.
35. Dehio C. Infection-associated type IV secretion systems of *Bartonella* and their diverse roles in host cell interaction. *Cell Microbiol* 2008; 10(8):1591.
36. Velho PE, Pimentel V, Del Negro GM, Okay TS, Diniz PP, Breitschwerdt EB. Severe anemia, panserositis, and cryptogenic hepatitis in an HIV patient infected with *Bartonella henselae*. *Ultrastructural pathology*. [Case Reports]. 2007 Nov-Dec; 31(6):373-7.
37. Greub G, Raoult D. *Bartonella*: new explanations for old diseases. *J Med Microbiol*; 2002 Nov; 51(11):915-23.
38. Stramer SL, Hollinger FB, Katz LM, Kleinman S, Metzger PS, Gregory KR, Dodd RY. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. *Transfusion*, 2009; 49(Suppl 2):1S-29S.
39. Pitassi LU, Barjas-Castro M, Drummond MR, *et al.* *Bartonella henselae* bacteremia in blood donors. *Transfusion*. 2010; 50:195A.
40. Fouch B, Coventry S *Arch Pathol Lab Med*; 2007; 131(10):1591-4. A case of fatal disseminated *Bartonella henselae* infection (cat-scratch disease) with encephalitis. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131(10):1591-4.

41. Guptill L, Slater L, Wu CC, Lin TL, Glickman LT, Welch DF, HogenEsch H. Experimental infection of young specific pathogen-free cats with *Bartonella henselae*. J Infect Dis 1997; 176(1):206-16.
42. Breitschwerdt EB, Maggi RG, Lantos PM, Woods CW, Hegarty BC, Bradley JM. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* and *Bartonella henselae* in a father and daughter with neurological disease. Parasit Vectors 2010; 3:29.
43. Maggi RG, Mozayeni BR, Pultorak EL, Hegarty BC, Bradley JM, Correa M, Breitschwerdt EB. *Bartonella* spp. bacteremia and rheumatic symptoms in patients from Lyme disease-endemic region. Emerg Infect Dis 2012; 18(5):783-91.
44. Drummond MR, Gilioli R, Velho PE. Bartonellosis diagnosis requires careful evaluation. Braz J Infect Dis 2010; 14(3):217.
45. Drummond MR. Detecção microbiológica e molecular da bacteremia por *Bartonella* spp. em gatos. (Tese Mestrado) Unicamp, 2012.
46. 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; 100:853-859.
47. Lamas CC, Rozental T, Favacho A, et al. *Bartonella* sp. infections in HIV positive individuals in Rio de Janeiro, Brazil. International Journal of Infectious Diseases 2006; 10(Suppl 1):S176.
48. Reine NJ. Infection and blood transfusion: a guide to donor screening. Clin Tech Small Anim Pract 2004; 19(2):68-74.

4. DISCUSSÃO GERAL

As doenças causadas por *Bartonella* spp. vêm ganhando importância nas últimas duas décadas. O gênero *Bartonella* é constituído por um grupo de patógenos zoonóticos re-emergentes e negligenciados que têm sido associados a um amplo espectro de doenças humanas graves (Breitschwerdt *et al.*, 2011). As *Bartonella* spp. são os únicos bacilos gram-negativos conhecidos que podem viver no interior das hemácias e que são capazes de induzir infecção assintomática nos hospedeiros. Em alguns pacientes, principalmente nos imunodeficientes, a doença pode ser fatal (Maguiña *et al.*, 2009; Magalhães *et al.*, 2009).

As espécies mais encontradas em doenças humanas e responsáveis por diversas manifestações clínicas são a *B. bacilliformis*, *B. quintana* e *B. henselae* (Breitschwerdt *et al.*, 2010a; Pérez-Martínez *et al.*, 2010; Kaiser *et al.*, 2011; Kosoy *et al.*, 2012; Mosepele *et al.*, 2012; Harms & Dehio, 2012). A extrema diversidade das manifestações clínicas das doenças depende principalmente da infectividade das *Bartonella* spp. e da resposta imune do paciente (Rolain *et al.*, 2004).

As características patogênicas mais importantes de espécies de *Bartonella* são a capacidade de invadir as células vermelhas do sangue e provocar a lise destas células, causar bacteremia persistente e induzir a proliferação das células endoteliais nos pequenos vasos (Benson *et al.*, 1986; Garcia *et al.*, 1990; Batterman *et al.*, 1995; Kordick & Breitschwerdt, 1995; Brouqui & Raoult, 1996; Resto-Ruiz *et al.*, 2003; Kaiser *et al.*, 2011; Franz & Kempf, 2011, Harms & Dehio, 2012).

Apesar do conhecimento ainda ser muito limitado em relação ao agente da doença fora das áreas onde a *B. bacilliformis* é endêmica, os pesquisadores nos últimos anos documentaram claramente a bacteremia por espécies de *Bartonella* entre os mamíferos, questionando a noção típica de o sangue ser estéril (Breitschwerdt & Kordick, 2000; Jacomo *et al.*, 2002; Harms & Dehio, 2012).

Os seres humanos podem ser portadores assintomáticos das *Bartonella* spp. (Greub & Raoult, 2002; Kaiser *et al.*, 2011) como observado nos períodos entre as crises de febre das trincheiras ou entre a febre de Oroya e a verruga peruana.

A *B. henselae* é considerada o agente mais comumente envolvido e o mais relevante como causa de infecção humana. Porém, os profissionais de saúde pouco sabem sobre ela (Kosoy *et al.*, 2012; Mosepele *et al.*, 2012; Harms & Dehio, 2012).

Os animais de estimação, especialmente os gatos, representam os maiores reservatórios destas bactérias para a infecção humana (Chomel *et al.*, 2006; Lamas *et al.*, 2008). Os gatos são os reservatórios primários para a *B. henselae*, *B. clarridgeiae* e *B. koehlerae*, além de serem os principais responsáveis pela transmissão, principalmente em crianças (Anderson & Neuman, 1997; Rolain *et al.*, 2003c; Boulouis *et al.*, 2005). Além destes, os cães também são considerados reservatórios da *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. washoensis*, *B. elizabethae* e *B. quintana* (Chung *et al.*, 2005; Kaiser *et al.*, 2011).

Estudos realizados na Unicamp utilizando múltiplas metodologias (culturas líquida e sólida, PCR convencional e *nested* e sequenciamento) comprovaram uma alta prevalência (90%) de bacteremia causada por *B. henselae* nos gatos de Campinas-SP. Parte destes casos foi associada a uma cepa brasileira (Drummond, 2012). A cepa chamada de *B. henselae* Brazil-1 foi sequenciada a partir de amostra de sangue de um cão proveniente da região de Botucatu e depositada no *GenBank* (Diniz *et al.*, 2007). A sequência desta também foi 100% homóloga à encontrada em um paciente soropositivo para HIV com anemia grave, panserosite, ascite e hepatite criptogênica atendido no Hospital das Clínicas da Unicamp (Velho *et al.*, 2007). Frente ao exposto, acredita-se que a *B. henselae* esteja presente de forma endêmica nos grupos de população que se expõem principalmente aos gatos, com maior agravo nos pacientes imunodeficientes diante de quadros infecciosos e/ou de febre de origem indeterminada (Mosepele *et al.*, 2012). Conclui-se com estes dados que a alta prevalência da infecção por *Bartonella* spp. nos gatos e suas consequências para a saúde pública têm sido subestimadas.

Em estudos anteriores, a presença da *B. henselae* também foi demonstrada no sangue de pessoas imunocompetentes que tiveram contato frequente com gatos e exposição a alguns artrópodos (pulgas, carrapatos, mosquitos, piolhos), concluindo que a *B. henselae* pode induzir infecção oculta neste grupo de pessoas (Breitschwerdt *et al.*, 2007).

A *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*, outro importante patógeno intravascular, foi recentemente isolado em pacientes imunocompetentes com quadros de endocardite, artrite, doenças neurológicas e neoplasia vasoproliferativa (Breitschwerdt *et al.*, 2010c). Fragmentos do DNA da *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* e da *B. henselae* foram amplificados e sequenciados a partir de amostras de sangue em crianças após o parto, sugerindo que estas bactérias podem ser transmitidas ainda no útero ou durante o parto cesareana (Breitschwerdt *et al.*, 2010d).

Uma das principais características observadas em relação à infecção por bartonela é que esta é muito mais comum nos pacientes imunocompetentes do que se suspeitava anteriormente. Estima-se que a soroprevalência das *Bartonella* spp. em veterinários saudáveis seja aproximadamente 45% (Chmielewski *et al.*, 2007). No entanto, não se sabe a real prevalência da bacteremia nos profissionais que são expostos frequentemente a mordidas e/ou arranhões de animais ou picadas de artrópodes.

Em um trabalho com 192 pacientes com sintomas inespecíficos, Maggi e colaboradores utilizaram 32 profissionais da Faculdade de Medicina Veterinária como controles assintomáticos e não encontraram nenhum destes com PCR ou cultura positiva (Maggi *et al.*, 2011). Neste trabalho, a soroprevalência foi de 49.5% entre os pacientes e 23.9% tiveram o DNA de *Bartonella* sp. detectado a partir do sangue. Os sintomas predominantes associados ao quadro clínico foram fadiga, insônia, dores articulares e musculares (Maggi *et al.*, 2011).

Corrêa e colaboradores detectaram o DNA de *Bartonella* sp. no sangue de um veterinário saudável entre 56 indivíduos assintomáticos utilizados como controle que doaram sangue para o estudo (Corrêa *et al.*, 2012). Este estudo

demonstrou um risco 45 vezes maior da *Bartonella* sp. ser detectada no sangue dos pacientes com arritmia cardíaca, 40 vezes maior entre os pacientes com miocardiopatia chagásica e 22 vezes entre os pacientes com endocardite quando foram comparados com o grupo controle.

O estudo de Lucey *et al.* (1992) sugeriu que pessoas infectadas pela *B. henselae* deveriam ser aconselhadas a se abster de doar sangue, após relatar dois casos de febre recorrente causada pela *B. henselae*.

Em 2001, em sua tese de doutorado, Velho aventou a possibilidade de transmissão transfusional dessas bactérias a partir de pacientes com bacteremia assintomática. Em 2002 fez menção a este risco potencial em um artigo de revisão sobre as bartoneloses humanas (Velho *et al.*, 2002).

O estudo do Capítulo 1 comprovou a capacidade da *B. henselae* invadir eritrócitos humanos e demonstrou, por meio da microscopia eletrônica de transmissão, que a bactéria era capaz de aderir-se a uma hemácia com 10h e invadí-la com 72h após a infecção experimental (Pitassi *et al.*, 2007). Estes dados foram recentemente confirmados por microscopia confocal a Laser por Vieira e outros colaboradores deste grupo de pesquisa (informação não publicada).

As *Bartonella* spp. são bastante singulares entre os agentes patógenos bacterianos pela sua capacidade de invadir, multiplicar e provocar parasitismo por períodos prolongados no interior das hemácias infectadas (Schulein *et al.*, 2001).

Um estudo anterior sugeriu que a *B. henselae* não seria capaz de aderir a e infectar os eritrócitos humanos maduros, somente as células progenitoras hematopoiéticas humanas CD34+ que poderiam servir como nicho primário da infecção (Mandle *et al.*, 2005). A *B. henselae* já havia sido demonstrada ultraestruturalmente em eritrócitos de gatos (Kordick & Breitschwerdt, 1995) e nunca antes identificada em eritrócitos humanos.

Estudos demonstram que, após a colonização do nicho principal durante a infecção por espécies de *Bartonella*, as bactérias caem na corrente sanguínea e infectam os eritrócitos. Ocorre então a aderência, a deformação e a invasão e,

finalmente, a persistência intraeritrocitária (Franz & Kempf, 2011; Harms & Dehio, 2012). A capacidade da *B. tribocorum* em infectar eritrócitos maduros de seu hospedeiro murino também já foi demonstrada em estudos *in vivo* (Schulein *et al.*, 2001; Jacomo *et al.*, 2002).

Durante o primeiro estudo (capítulo 1), foram observadas várias estruturas intraeritrocitárias que se assemelhavam às bartonelas. Existiam poucos dados na literatura que caracterizassem as bartonelas ultraestruturalmente e havia uma real dificuldade de identificação destas quando analisadas à microscopia eletrônica. O referido estudo proporcionou um grande aprendizado durante a análise da morfologia das *Bartonella* spp. nas células do sangue.

Na literatura, foram descritas estruturas como sendo *Bartonella* sp., mas que não podiam ser diferenciadas de artefatos ou pseudoinclusões (Kordick & Breitschwerdt, 1995). Comprovando este fato, Guptill e colaboradores realizaram um estudo infectando experimentalmente gatos livres de patógenos específicos com *B. henselae* e, por meio da ME, detectaram pseudoinclusões nos eritrócitos dos gatos infectados, mas também nos eritrócitos de gatos não infectados pela bactéria. Assim, adotaram como critério ultraestrutural para a identificação da bactéria a parede trilaminar (Guptill *et al.*, 2000).

Após esta observação de que a *B. henselae* poderia invadir os eritrócitos maduros (capítulo 1), houve a necessidade de realizar novos estudos que permitissem avaliar o potencial de transmissão transfusional destas bactérias.

O segundo artigo (capítulo 2) descreveu estruturas compatíveis com *Bartonella* sp. e definiu os parâmetros para se caracterizar a bactéria no interior de células sanguíneas ultraestruturalmente (Pitassi *et al.*, 2010). Foram descritas, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, as estruturas das hemácias e plaquetas que eram semelhantes às bartonelas no sangue dos pacientes com suspeita de bartonelose.

Como a *B. henselae* invadia a hemácia e havia informações já citadas que o homem poderia ser portador assintomático, era necessário saber se a bactéria permanecia viável em uma unidade de concentrado de hemácias por 35 dias,

estocada a 4° C, como rotineiramente é feito com o sangue doado. Neste estudo (capítulo 3), foi realizada a ME em amostras de concentrado de hemácias e estruturas sugestivas de bartonela que atendiam aos critérios publicados por Pitassi *et al.* (2010) puderam ser observadas no interior das hemácias, 35 dias após a infecção experimental, confirmando que o parasitismo pode ocorrer após longos períodos de infecção. Culturas realizadas seriadamente permitiram o isolamento da bactéria do sangue experimentalmente infectado, atestando que o risco da transmissão transfusional da *Bartonella* spp. tem sido subestimado (Magalhães *et al.*, 2008).

Este resultado reforçou a possibilidade da infecção ocorrer através da transfusão de unidades de sangue coletadas de doadores assintomáticos. O artigo 3 foi citado no *Transfusion*, um jornal da AABB (American Association of Blood Banks), como um marco na literatura ao associar a *B. henselae* como um possível agente associado à transmissão por transfusão sanguínea em humanos (Stramer *et al.*, 2009). Em 2010, Magalhães e colaboradores também descreveram o primeiro doador de sangue detectado com bacteremia assintomática (Magalhães *et al.*, 2010).

Anualmente, cerca de 15 milhões de unidades de glóbulos vermelhos são transfundidas nos Estados Unidos e 85 milhões em todo o mundo (Carson *et al.*, 2012). Como os testes normalmente usados para a triagem dos doadores de sangue não detectam estes agentes, incluindo a hemocultura de rotina, o Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp, após a constatação de que hemácias humanas abrigam espécies de *Bartonella*, determinou que pessoas que tiveram o diagnóstico de infecção por *B. henselae* não deveriam ser aceitas para novas doações sanguíneas (Anexo1). Até o presente momento, não existe nenhuma orientação padronizada do FDA (Food and Drug Administration) ou AABB relacionada à infecção por *Bartonella* spp..

Durante os estudos, utilizando-se os parâmetros do diagnóstico ultraestrutural da infecção por *Bartonella* sp., relatou-se um caso de bartonelose como causa de morte 72h após a transfusão sanguínea (capítulo 4). Antes da

definição do diagnóstico, suspeitou-se de choque séptico ou reação transfusional grave. Mas, após a morte do jovem com anemia aplástica que recebeu transfusão de sangue, foram analisados por ME fragmentos do baço que permitiram o diagnóstico de infecção por *Bartonella* sp. (Magalhães *et al.*, 2009).

A anemia grave é um quadro característico descrito na febre de Oroya (Maguiña *et al.*, 2008), causada pela *B. bacilliformis*. A *B. henselae* também já havia sido associada como causa de anemia hemolítica imunomediada (Van Audenhove *et al.*, 2001).

Uma reação transfusional é caracterizada por febre (com aumento de temperatura de 1 a 2°C), calafrios, tremores, hipotensão, ruborização, náusea, vômitos e choque (Lee *et al.*, 1998). As reações transfusionais febris não hemolíticas e alérgicas são as mais comumente relatadas. A maioria dos relatórios fornece somente informações sobre as reações mais graves, ocorrendo grandes variações nos dados informados entre as instituições, além da introdução de novos processos nestes serviços que podem alterar as taxas de reação diferentemente ao longo tempo (por exemplo: a leucorredução pré-armazenamento reduz a taxa de reação febril não hemolítica) (Tinegate *et al.*, 2012).

As taxas de reações transfusionais variam entre 0,5 a 3% das transfusões sanguíneas (Fry *et al.*, 2010). Os relatórios anuais sugerem uma incidência de reações mais graves entre os componentes transfundidos (14/100.000), variando de 11/100.000 para as células vermelhas a 29/100.000 para plaquetas (Knowles & Cohen, 2011).

O Ministério da Saúde regulamentou o processo de doação de sangue, hemocomponentes e hemoderivados, através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 153, de 14 de junho de 2004. Considerando que todo o processo desde a coleta, processamento e transfusão de sangue deve ser efetuado com altíssimo controle de qualidade, evitando a propagação de doenças e afastando qualquer tipo de contaminação, esta RDC define que 1% da produção

mensal ou 10 unidades por mês, independente da quantidade produzida, sejam submetidos à cultura para detecção de bactérias (Anvisa, 2004).

O risco de contaminação bacteriana relacionado à transfusão de concentrado de plaquetas é maior quando comparado ao concentrado de hemácias. Este último é armazenado entre 2°C e 6°C, enquanto que o concentrado de plaquetas entre 20°C a 24°C. A estocagem deste hemocomponente a uma temperatura entre 20-24°C por 5-7 dias torna-se um excelente meio para a proliferação bacteriana. As maiores incidências de contaminação se devem principalmente às bactérias Gram-negativas (Simon *et al.*, 2002; McDonald *et al.*, 2004).

As *Bartonella* spp. continuam a ser um dos organismos mais difíceis de se detectar por meio da cultura de sangue ou de tecidos. Como a bactéria é intraeritrocitária, estudos sugerem que estas devam ser cultivadas a partir de amostras de sangue que sofreram congelamento e posterior descongelamento. A lógica é que as células do sangue serão lisadas e as bactérias libertadas dos eritrócitos para crescerem no meio de cultura (Duncan *et al.*, 2007). As amostras de sangue doadas não são lisadas antes da sementeira e a cultura é considerada negativa após quatro dias da incubação. Sabe-se que o gênero *Bartonella* demora em média 15 a 21 dias em meios enriquecidos com sangue e em ambientes ricos em CO₂ para crescer. As hemoculturas em meios enriquecidos com sangue deveriam ser incubadas durante 5 a 21 dias (La Scola & Raoult, 1999), o que não é visto na rotina dos laboratórios, limitando assim o diagnóstico desta infecção.

Frente a esta importante informação e sabendo que a bartonela pode ser transmitida acidentalmente por sangue contaminado (Oliveira *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011), fez-se necessário realizar nova pesquisa que pudesse esclarecer a prevalência desta bacteremia assintomática nos doadores de sangue.

Investigou-se a prevalência da *Bartonella* spp. em uma amostra de 500 doadores de sangue voluntários de Campinas, estado de São Paulo, Brasil, utilizando sorologia, cultura líquida e sólida, PCR e sequenciamento como métodos de identificação destes patógenos (capítulo 5). Os anticorpos contra *B.*

henselae e *B. quintana* foram detectados em 16.2% and 32% dos doadores, respectivamente. O DNA da *Bartonella* sp foi demonstrado em 3,2% do sangue doado e em 1,2% foi documentada, por meio do isolamento do agente, bacteremia por *B. henselae*. Este estudo revela a presença de patógenos no sangue de doadores assintomáticos que não estão sendo rastreados e que podem ser responsáveis por doenças nos receptores cuja etiologia pode não ser definida.

Os 6 isolados (1,2%) foram obtidos semeando o meio de enriquecimento BAPGM- *Bartonella* alpha-Proteobacteria growth medium (sangue em BAPGM na proporção de 1:5) em meio sólido contendo 30% de sangue de carneiro, conforme rotineiramente utilizado no Banco de Bactérias do Instituto Adolpho Lutz, São Paulo. Usualmente, cita-se na literatura cultura sólida enriquecida com 5 a 10% de sangue (Bai *et al.*, 2010; Sykes *et al.*, 2010; Lynch *et al.*, 2011). É importante lembrar a característica fastidiosa e a exigência de meios extremamente enriquecidos para o isolamento de *Bartonella* spp.. Além destes fatores, existe a dificuldade de isolamento da bactéria em doadores assintomáticos, pois neste caso estas se apresentam potencialmente menos virulentas. Os meios de Ducrey modificado e o BAPGM contribuíram para o aumento da população bacteriana nas amostras estudadas atingindo o limiar de detecção por PCR.

Estes resultados estabelecem a necessidade de uma reavaliação por autoridades de saúde pública dos riscos e do impacto da transmissão da *Bartonella* spp. através de transfusões sanguíneas, especialmente para os pacientes imunodeficientes. Esforços devem ser feitos para a melhoria dos métodos de diagnóstico com sensibilidade suficiente para excluir a *Bartonella* spp. em doadores de sangue e para proteger os receptores da transmissão destes patógenos pela transfusão de sangue.

É importante ressaltar que a inexistência de um teste diagnóstico “padrão ouro” que permita detectar a bacteremia causada por *Bartonella* spp., principalmente em hospedeiros imunocompetentes, torna-se uma grande dificuldade a ser enfrentada por profissionais de saúde e autoridades sanitárias. Os métodos diagnósticos como sorologia, cultura, histopatologia, PCR e

microscopia eletrônica de transmissão podem ajudar no diagnóstico, mas nem sempre estas alternativas fornecem o diagnóstico em todos os casos. Muitos fatores interferem na análise destes exames, tais como o baixo número de hemácias infectadas, o tamanho pequeno destas bactérias à análise microscópica e também a falta de disponibilidade destes exames na prática clínica.

Como não existe um consenso ou protocolos unificados a serem seguidos, além de todas estas técnicas apresentarem vantagens e desvantagens, há a necessidade de se aprimorar os métodos diagnósticos com sensibilidade suficiente para excluir as *Bartonella* spp. em doadores de sangue e para proteger os receptores de transfusão de sangue.

5. CONCLUSÃO GERAL

O conjunto dos estudos apresentados nesta tese coloca em discussão mudanças de paradigmas na Medicina Transfusional, particularmente aqueles relacionados à infecção por *Bartonella* spp.. Por mais que novas tecnologias sejam desenvolvidas, a descoberta de novos agentes infecciosos e a reemergência de outros constituem um desafio contínuo que impede a existência de um sangue 100% seguro. Novas pesquisas microbiológicas, moleculares e estudos clínicos serão necessários para a melhor compreensão do processo de infecção e para avaliar os riscos e impactos da transmissão desta bactéria através de transfusões, especialmente em pacientes imunodeficientes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Anderson BE, Neuman MA. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10:203-19.

Angelakis E, Lepidi H, Canel A, *et al.* Human case of *Bartonella alsatica* lymphadenitis. *Emerg Infect Dis* 2008;14(12):1951-3.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução 153 de 14 de junho de 2004. Determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 24 de Junho; Seção 1, 2004. p. 68.

Avidor B, Graidy M, Efrat G, Leibowitz C, Shapira G, Schattner A, *et al.* *Bartonella koehlerae*, a new cat-associated agent of culture-negative human endocarditis. *J Clin Microbiol* 2004; 42:3462-8.

Azevedo ZM, Higa LY, Boechat PR, Boechat MB, Klaplauch F. Cat-scratch disease caused by *Bartonella quintana* in an infant: an unusual presentation. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000; 33:313-7.

Bai Y, Kosoy MY, Cully JF, *et al.* Acquisition of nonspecific *Bartonella* strains by the northern grasshopper mouse (*Onychomys leucogaster*). *FEMS Microbiol Ecol* 2007;61(3):438-48.(a)

Bai Y, Montgomery SP, Sheff KW, *et al.* *Bartonella* strains in small mammals from Dhaka, Bangladesh, related to *Bartonella* in America and Europe. *Am J Trop Med Hyg* 2007;77(3):567-70.(b)

Bai Y, Kosoy M, Martin A, *et al.* Characterization of *Bartonella* strains isolated from black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*). *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008;8(1):1-5.

Bai Y, Kosoy MY, Lerdthusnee K, *et al.* Prevalence and genetic heterogeneity of *Bartonella* strains cultured from rodents from 17 provinces in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2009;81(5):811-6.

Bai Y, Kosoy MY, Boonmar S, Sawatwong P, Sangmaneedet S & Peruski L F. Enrichment culture and molecular identification of diverse *Bartonella* species in stray dogs. *Veterinary microbiology* 2010; 146(3-4), 314.

Bai Y, Calisher CH, Kosoy MY, *et al.* Persistent infection or successive reinfection of deer mice with *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis*. *Appl Environ Microbiol* 2011;77(5):1728-31.(a)

Bass JW, Vincent JM, Person DA. The expanding spectrum of *Bartonella* infections: II. Cat-scratch disease. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16:163-79.

Bass JW, Freitas BC, Freitas AD, Sisler CL, Chan DS, Vincent JM, *et al.* Prospective randomized double blind placebo-controlled evaluation of azithromycin for treatment of cat-scratch disease. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17:447-52.

Batterman HJ, Peek JA, Loutit JS, Falkow S, Tompkins LS. *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* adherence to and entry into cultured human epithelial cells. *Infect Immun* 1995; 63:4553-6.

Benson LA, Kar S, McLaughlin G, Ihler GM. Entry of *Bartonella bacilliformis* into erythrocytes. *Infect Immun* 1986; 54:347-53.

Bergmans AM, Peeters MF, Schellekens JF, Vos MC, Sabbe LJ, Ossewaarde JM, *et al.* Pitfalls and fallacies of cat scratch disease serology: evaluation of *Bartonella henselae*-based indirect fluorescence assay and enzyme-linked immunoassay. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1931-7.

Bibhuti B, Wasser E, Bryant KA, *et al.* Culture negative endocarditis caused by *Bartonella henselae* in a child with congenital heart disease. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28(10):922-5.

Billeter SA, Levy MG, Chomel BB, Breitschwerdt EB. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Medical and veterinary entomology*. [Review]. 2008 Mar; 22(1):1-15.

Birtles RJ, Harrison TG, Saunders NA, Molyneux DH. Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45(1):1-8.

Birtles RJ, Canales J, Ventosilla P, *et al.* Survey of *Bartonella* species infecting intradomicillary animals in the Huayllacallan Valley, Ancash, Peru, a region endemic for human bartonellosis. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60(5):799-805.

Bitam I, Rolain JM, Kernif T, *et al.* *Bartonella* species detected in rodents and hedgehogs from Algeria. *Clin Microbiol Infect* 2009;15 Suppl 2:102-3.

Blanco JR, Raoult D. Diseases produced by *Bartonella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 23:313-9; quiz 320.

Blanco JR, Jado I, Marin M, *et al.* [Microbiological diagnosis of emerging bacterial pathogens: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia*, and *Tropheryma whippelii*]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26(9):573-80.

Bonatti H, Mendez J, Guerrero I, *et al.* Disseminated *Bartonella* infection following liver transplantation. *Transpl Int* 2006;19(8):683-7.

Boulouis HJ, Chang CC, Henn JB, Kasten RW, Chomel BB. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet Res* 2005; 36:383-410.

Braga Mdo S, Diniz PP, Andre MR, *et al.* Molecular characterisation of *Bartonella* species in cats from Sao Luis, state of Maranhao, north-eastern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2012;107(6):772-7.

Breitschwerdt EB, Kordick DL, Malarkey DE, *et al.* Endocarditis in a dog due to infection with a novel *Bartonella* subspecies. J Clin Microbiol 1995;33(1):154-60.

Breitschwerdt EB, Kordick DL. *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. Clin Microbiol Rev 2000; 13:428-38.

Breitschwerdt EB, Maggi RG, Duncan AW, Nicholson WL, Hegarty BC, Woods CW. *Bartonella* species in blood of immunocompetent persons with animal and arthropod contact. Emerg Infect Dis 2007; 13:938-41.

Breitschwerdt EB, Maggi RG, Nicholson WL, *et al.* *Bartonella* sp. bacteremia in patients with neurological and neurocognitive dysfunction. J Clin Microbiol 2008;46(9):2856-61.

Breitschwerdt EB, Maggi RG, Cadenas MB, de Paiva Diniz PP. A groundhog, a novel *Bartonella* sequence, and my father's death. Emerg Infect Dis 2009;15(12):2080-6.

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 (San Antonio) 2010; 20: 8-30.(a)

Breitschwerdt EB, Maggi RG, Robert Mozayeni B, Hegarty BC, Bradley JM, Mascarelli PE. PCR amplification of *Bartonella koehlerae* from human blood and enrichment blood cultures. Parasites & vectors 2010;3:76.(b)

Breitschwerdt EB, Maggi RG, Lantos PM, Woods CW, Hegarty BC, Bradley JM. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* and *Bartonella henselae* in a father and daughter with neurological disease. Parasit Vectors 2010; 3:29.(c)

Breitschwerdt EB, Maggi RG, Farmer P, Mascarelli PE. Molecular evidence of perinatal transmission of *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* and *Bartonella henselae* to a child. Journal of clinical microbiology. [Case Reports Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010; 48(6):2289-93.(d)

Breitschwerdt EB, Mascarelli PE, Schweickert LA, Maggi RG, Hegarty BC, Bradley JM, *et al.* Hallucinations, sensory neuropathy, and peripheral visual deficits in a young woman infected with *Bartonella koehlerae*. Journal of clinical microbiology. [Case Reports Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Sep; 49(9):3415-7.

Breña Chávez JP, Maguiña Vargas CP, Hernandez Diaz HR, Castillo Diaz ME, Pozo Tovar WE. Bartonelosis aguda en niños: estudio de 32 casos en el Instituto Especializado de Salud del Niño y el Hospital Nacional Cayetano Heredia (período 1993–2003). Rev Med Hered 2006; 17: 122–131.

Brenner DJ, O'Connor SP, Winkler HH, Steigerwalt AG. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from the order Rickettsiales. Int J Syst Bacteriol 1993; 43:777-86.

Brouqui P, Raoult D. *Bartonella quintana* invades and multiplies within endothelial cells in vitro and in vivo and forms intracellular blebs. Res Microbiol 1996;147(9):719-31.

Brouqui P, La Scola B, Roux V, Raoult D. Chronic *Bartonella quintana* bacteremia in homeless patients. N Engl J Med 1999; 340:184-9.

Brouqui P, Raoult D. New insight into the diagnosis of fastidious bacterial endocarditis. FEMS Immunol Med Microbiol 2006;47(1):1-13.

Byam W, Carroll JH, Churchill JH, Dimond L, Sorapure VE, Wilson RM & Lloyd LL (ed.). 1919. Trench fever: a louse-born disease. Oxford University Press, London.

Caceres AG. [Geographic distribution of *Lutzomyia verrucarum* (Townsend, 1913) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), vector of human bartonellosis in Peru]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1993;35(6):485-90.

Carithers HA. Diagnosis of cat-scratch disease. Pediatrics 1985; 76:325-6.

Carson JL, Grossman BJ, Kleinman S, Tinmouth AT, Marques MB, Fung MK, Holcomb JB, Illoh O, Kaplan LJ, Katz LM, Rao SV, Roback JD, Shander A, Tobian AA, Weinstein R, Swinton McLaughlin LG, Djulbegovic B, Clinical Transfusion Medicine Committee of the AABB. Red Blood Cell Transfusion: A clinical practice guideline from the AABB. Ann Intern Med. 2012 Jul 3; 157(1):49-58.

Castle KT, Kosoy M, Lerdthusnee K, *et al.* Prevalence and diversity of *Bartonella* in rodents of northern Thailand: a comparison with *Bartonella* in rodents from southern China. Am J Trop Med Hyg 2004;70(4):429-33.

Cesario M & Cesario RR. Infecção bacteriana rumo ao Brasil: endêmica nos Andes, Bartonelose se alastra com abertura de estradas e degradação ambiental. Scientific American Brasil 2005, 3(34): 10-11.

Cesario M, Cesario RR, Andrade-Morrays M. Environmental change and health impacts in Amazonia. Human Health and Global Environmental Change 2011; 1: 26-33.

Chamberland M & Khabbaz RF. Emerging issues in blood safety. Infectious disease clinics of North America 1998; 12(1), 217-229.

Chamberlin J, Laughlin LW, Romero S, *et al.* Epidemiology of endemic *Bartonella bacilliformis*: a prospective cohort study in a Peruvian mountain valley community. J Infect Dis 2002;186(7):983-90.

Chang CC, Chomel BB, Kasten RW, Romano V, Tietze N. Molecular evidence of *Bartonella* spp. in questing adult *Ixodes pacificus* ticks in California. J Clin Microbiol 2001; 39:1221-6.

Chi SL, Stinnett S, Eggenberger E, *et al.* Clinical characteristics in 53 patients with cat scratch optic neuropathy. Ophthalmology 2012;119(1):183-7.

Chian CA, Arrese JE, Pierard GE. Skin manifestations of *Bartonella* infections. Int J Dermatol 2002;41(8):461-6.

Chmielewski T, Podsiadly E, Tylewska-Wierzbanska S. Presence of *Bartonella* spp. in various human populations. Pol J Microbiol 2007;56(1):33-8.

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; 34:1952-6.

Chomel BB, Kasten RW, Sykes JE, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB. Clinical impact of persistent *Bartonella* bacteremia in humans and animals. Ann N Y Acad Sci 2003;990:267-78.

Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB. Cat scratch disease and other zoonotic *Bartonella* infections. J Am Vet Med Assoc 2004; 224:1270-9.

Chomel BB, Boulouis HJ, Maruyama S, Breitschwerdt EB. *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. Emerging infectious diseases. [Review]. 2006 Mar; 12(3):389-94.

Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB, Kasten RW, Vayssier-Taussat M, Birtles RJ, *et al.* Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. Veterinary research. [Review]. 2009 Mr-Apr;40(2):29.

Chomel BB, Kasten RW. Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. J Appl Microbiol 2010;109(3):743-50.

Chung JY, Han TH, Kim BN, Yoo YS, Lim SJ. Detection of *Bartonella henselae* DNA by polymerase chain reaction in a patient with cat scratch disease: a case report. J Korean Med Sci 2005; 20:888-91.

Clemente NS, Ugarte-Gil CA, Solórzano N, Maguiña C, Pachas P, Blazes D, ... & Moore D. *Bartonella bacilliformis*: A Systematic Review of the Literature to Guide the Research Agenda for Elimination. PLoS neglected tropical diseases 2012; 6(10), e1819.

Cockerell CJ, Whitlow MA, Webster GF, Friedman-Kien AE. Epithelioid angiomatosis: a distinct vascular disorder in patients with the acquired immunodeficiency syndrome or AIDS-related complex. Lancet 1987; 2:654-6.

Cockerell CJ, LeBoit PE. Bacillary angiomatosis: a newly characterized, pseudoneoplastic, infectious, cutaneous vascular disorder. J Am Acad Dermatol 1990; 22:501-12.

Concannon R, Wynn-Owen K, Simpson VR, Birtles RJ. Molecular characterization of haemoparasites infecting bats (Microchiroptera) in Cornwall, UK. Parasitology 2005;131(Pt 4):489-96.

Cornejo W, Vizcarra H. *Bartonella henselae*: Nuevo patógeno en humanos. Anales de la Facultad de Medicina: Universidad Nacional Mayor de San Marcos 1999; 60:281-292.

Corrêa FG, Pontes CLS, Verzola RMM, Mateos JCP, Velho PENF, Schijman AG & Selistre-de-Araujo HS). Association of *Bartonella* spp bacteremia with Chagas cardiomyopathy, endocarditis and arrhythmias in patients from South America. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2012; 45(7), 644-651.

Costa PSG, 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; 100:853-9.

Crissiuma A, Favacho A, Gershony L, Mendes-de-Almeida F, Gomes R, Mares-Guia A, *et al.* Prevalence of *Bartonella* species DNA and antibodies in cats (*Felis catus*) submitted to a spay/neuter program in Rio de Janeiro, Brazil. Journal of feline medicine and surgery 2011 Feb;13(2):149-51.

Cueto M. Tropical medicine and bacteriology in Boston and Peru: studies of Carrion's disease in the early twentieth century. Med Hist 1996;40(3):344-64.

Cunningham ET, Koehler JE. Ocular bartonellosis. Am J Ophthalmol 2000;130(3):340-9.

Curi AL, Machado D, Heringer G, *et al.* Cat-scratch disease: ocular manifestations and visual outcome. Int Ophthalmol 2010;30(5):553-8.

Czauderna P, Schaarschmidt K, Komasa L, Harms D, Lempe M, Vorpahl K, ... & Balanda A. Abdominal inflammatory masses mimicking neoplasia in children—experience of two centers. Pediatric surgery international 2005; 21(5), 346-350.

Daly JS, Worthington MG, Brenner DJ, Moss CW, Hollis DG, Weyant RS., ... & O'Connor SP. *Rochalimaea elizabethae* sp. nov. isolated from a patient with endocarditis. Journal of Clinical Microbiology 1993;31(4), 872-881.

Dehio C, Meyer M, Berger J, Schwarz H, Lanz C. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. J Cell Sci 1997; 110 (Pt 18):2141-54.

Dehio C, Sander A. *Bartonella* as emerging pathogens. Trends Microbiol 1999; 7:226-8.

Dehio C. *Bartonella* interactions with endothelial cells and erythrocytes. Trends Microbiol 2001; 9:279-85.

Dehio C. Molecular and cellular basis of *bartonella* pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 2004; 58:365-90.

Dehio C. Infection-associated type IV secretion systems of *Bartonella* and their diverse roles in host cell interaction. *Cell Microbiol* 2008;10(8):1591-8.

Dimopoulos S, Eleftherakis E, Charitos C, *et al.* *Bartonella* quintana endocarditis as a cause of severe aortic insufficiency and heart failure. *Hellenic J Cardiol* 2012;53(6):476-9.

Diniz PP, Maggi RG, Schwartz DS, Cadenas MB, Bradley JM, Hegarty B, *et al.* Canine bartonellosis: serological and molecular prevalence in Brazil and evidence of co-infection with *Bartonella henselae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*. *Veterinary research*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 Sep-Oct;38(5):697-710.

Dorbecker C, Sander A, Oberle K, Schulin-Casonato T. In vitro susceptibility of *Bartonella* species to 17 antimicrobial compounds: comparison of Etest and agar dilution. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:784-8.

Drancourt M, Bodaghi B, Lepidi H, Le Hoang P, Raoult D. Intraocular detection of *Bartonella henselae* in a patient with HLA-B27 uveitis. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1822-5.

Drancourt M, Tran-Hung L, Courtin J, *et al.* *Bartonella quintana* in a 4000-year-old human tooth. *J Infect Dis* 2005;191(4):607-11.

Dreier J, Vollmer T, Freytag CC, *et al.* Culture-negative infectious endocarditis caused by *Bartonella* spp.: 2 case reports and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;61(4):476-83.

Drummond, Marina Rovani. Detecção microbiológica e molecular da bacteremia por *Bartonella* spp. em gatos. (Tese Mestrado) Unicamp, 2012.

Duncan AW, Maggi RG, Breitschwerdt EB. A combined approach for the enhanced detection and isolation of *Bartonella* species in dog blood samples: pre-enrichment liquid culture followed by PCR and subculture onto agar plates. Journal of microbiological methods. [Comparative Study]. 2007 May;69(2):273-81.

Džupová O, Peková S, Sojková N, Feuereisl R & Beneš J. Infective endocarditis due to *Bartonella quintana*: a severe disease and underdiagnosed etiology. Folia Microbiologica 2013; 1-4.

Edouard S, Raoult D. [*Bartonella henselae*, an ubiquitous agent of proteiform zoonotic disease]. Med Mal Infect 2010;40(6):319-30.

Ehrenborg C, Bystrom R, Hjelm E, *et al.* High *Bartonella* spp. seroprevalence in a Swedish homeless population but no evidence of trench fever. Scand J Infect Dis 2008;40(3):208-15.

Eicher SC, Dehio C. *Bartonella* entry mechanisms into mammalian host cells. Cell Microbiol 2012;14(8):1166-73.

Ellis BA, Regnery RL, Beati L, *et al.* Rats of the genus *Rattus* are reservoir hosts for pathogenic *Bartonella* species: an Old World origin for a New World disease? J Infect Dis 1999;180(1):220-4.(a)

Ellis BA, Rotz LD, Leake JA, *et al.* An outbreak of acute bartonellosis (Oroya fever) in the Urubamba region of Peru, 1998. Am J Trop Med Hyg 1999;61(2):344-9.(b)

Eremeeva ME, Gerns HL, Lydy SL, Goo JS, Ryan ET, Mathew SS, *et al.* Bacteremia, fever, and splenomegaly caused by a newly recognized *bartonella* species. N Engl J Med 2007; 356:2381-7.

Eymin G, Zapata A, Andrade M, Aizman A, Rojas L, Rabagliati R. Cat-scratch disease. Review of eight adult patients hospitalized for fever or adenopathy. Rev Med Chil 2006; 134:1243-8.

Fenollar F, Sire S, Raoult D. *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis* as an agent of blood culture-negative endocarditis in a human. J Clin Microbiol 2005;43(2):945-7.

Filoni C, Catao-Dias JL, Bay G, *et al.* First evidence of feline herpesvirus, calicivirus, parvovirus, and Ehrlichia exposure in Brazilian free-ranging felids. J Wildl Dis 2006;42(2):470-7.

Florin TA, Zaoutis TE & Zaoutis LB. Beyond cat scratch disease: widening spectrum of *Bartonella henselae* infection. Pediatrics 2008;121(5), e1413-e1425.

Foucault C, Barrau K, Brouqui P, Raoult D. *Bartonella quintana* Bacteremia among Homeless People. Clin Infect Dis 2002;35(6):684-9.

Foucault C, Brouqui P, Raoult D. *Bartonella quintana* characteristics and clinical management. Emerg Infect Dis 2006;12(2):217-23.

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

Fournier PE, Lelievre H, Eykyn SJ, *et al.* Epidemiologic and clinical characteristics of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* endocarditis: a study of 48 patients. Medicine (Baltimore) 2001;80(4):245-51.

Fournier PE, Thuny F, Richet H, *et al.* Comprehensive diagnostic strategy for blood culture-negative endocarditis: a prospective study of 819 new cases. Clin Infect Dis 2010;51(2):131-40.

Franz B, Kempf VA. Adhesion and host cell modulation: critical pathogenicity determinants of *Bartonella henselae*. Parasit Vectors 2011;4:54.

Fry JL, Arnold DM, Clase CM, Crowther MA, Holbrook AM, Traore AN, ... & Heddle NM. Transfusion premedication to prevent acute transfusion reactions: a retrospective observational study to assess current practices. Transfusion 2010; 50(8), 1722-1730.

Garcia FU, Wojta J, Broadley KN, Davidson JM, Hoover RL. *Bartonella bacilliformis* stimulates endothelial cells in vitro and is angiogenic in vivo. Am J Pathol 1990; 136:1125-35.

Garcia-Caceres U, Garcia FU. Bartonellosis. An immunodepressive disease and the life of Daniel Alcides Carrion. Am J Clin Pathol 1991; 95:S58-66.

Gasquet S, Maurin M, Brouqui P, *et al.* Bacillary angiomatosis in immunocompromised patients. AIDS 1998;12(14):1793-803.

Gerber JE, Johnson JE, Scott MA, Madhusudhan KT. Fatal meningitis and encephalitis due to *Bartonella henselae* bacteria. J Forensic Sci 2002; 47:640-4.

Ghez D, Bernard L, Bayou E, *et al.* *Bartonella henselae* infection mimicking a splenic lymphoma. Scand J Infect Dis 2001;33(12):935-6.

Giladi M, Maman E, Paran D, *et al.* Cat-scratch disease-associated arthropathy. Arthritis Rheum 2005;52(11):3611-7.

Graveleau J, Grossi O, Lefebvre M, *et al.* Vertebral osteomyelitis: an unusual presentation of *Bartonella henselae* infection. Semin Arthritis Rheum 2011;41(3):511-6.

Gray GC, Johnson AA, Thornton SA, *et al.* An epidemic of Oroya fever in the Peruvian Andes. Am J Trop Med Hyg 1990;42(3):215-21.

Greub G, Raoult D. *Bartonella*: new explanations for old diseases. Journal of medical microbiology. [Review]. 2002 Nov;51(11):915-23.

Guimaraes AM, Brandao PE, Moraes W, *et al.* Detection of *Bartonella* spp. in neotropical felids and evaluation of risk factors and hematological abnormalities associated with infection. Vet Microbiol 2010;142(3-4):346-51.

Gundi VA, Davoust B, Khamis A, *et al.* Isolation of *Bartonella rattimassiliensis* sp. nov. and *Bartonella phoceensis* sp. nov. from European *Rattus norvegicus*. J Clin Microbiol 2004;42(8):3816-8.

Gundi VA, Taylor C, Raoult D, La Scola B. *Bartonella rattaaustraliani* sp. nov., *Bartonella queenslandensis* sp. nov. and *Bartonella coopersplainsensis* sp. nov., identified in Australian rats. Int J Syst Evol Microbiol 2009;59(Pt 12):2956-61.

Guptill L, Slater L, Wu CC, Lin TL, Glickman LT, Welch DF, HogenEsch H. Experimental infection of young specific pathogen-free cats with *Bartonella henselae*. J Infect Dis 1997; 176(1):206-16.

Guptill L, Wu CC, Glickman L, Turek J, Slater L, HogenEsch H. Extracellular *Bartonella henselae* and artifactual intraerythrocytic pseudoinclusions in experimentally infected cats. Vet Microbiol 2000; 76:283-90.

Guptill L. Bartonellosis. Veterinary microbiology. [Review]. 2010 Jan 27; 140(3-4):347-59.

Habot-Wilner Z, Zur D, Goldstein M, Goldenberg D, Shulman S, Kesler A, ... & Neudorfer M. Macular findings on optical coherence tomography in cat-scratch disease neuroretinitis. Eye 2011; 25(8), 1064-1068.

Hajjaji N, Hocqueloux L, Kerdraon R, Bret L. Bone infection in cat-scratch disease: a review of the literature. J Infect 2007;54(5):417-21.

Halos L, Jamal T, Maillard R, *et al.* Role of Hippoboscidae flies as potential vectors of *Bartonella* spp. infecting wild and domestic ruminants. Appl Environ Microbiol 2004;70(10):6302-5.

Harms A, Dehio C. Intruders below the radar: molecular pathogenesis of *Bartonella* spp. Clinical microbiology reviews. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Jan;25(1):42-78.

Heller R, Artois M, Xemar V, De Briel D, Gehin H, Jaulhac B, *et al.* Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in stray cats. *Journal of clinical microbiology* 1997 Jun;35(6):1327-31.

Heller R, Riegel P, Hansmann Y, *et al.* *Bartonella tribocorum* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rats. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48 Pt 4:1333-9.

Heller R, Kubina M, Mariet P, *et al.* *Bartonella alsatica* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rabbits. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49 Pt 1:283-8.

Hendrix LR. Contact-dependent hemolytic activity distinct from deforming activity of *Bartonella bacilliformis*. *FEMS Microbiol Lett* 2000;182(1):119-24.

Hill EM, Raji A, Valenzuela MS, *et al.* Adhesion to and invasion of cultured human cells by *Bartonella bacilliformis*. *Infect Immun* 1992;60(10):4051-8.

Hillyer CD, Josephson CD, Blajchman MA, Vostal JG, Epstein JS, Goodman JL. Bacterial Contamination of Blood Components: Risks, Strategies, and Regulation, Joint ASH and AABB Educational Session in Transfusion Medicine. *Hematology* 2003: 575-589.

Houpikian P, Raoult D. Molecular phylogeny of the genus *Bartonella*: what is the current knowledge? *FEMS Microbiol Lett* 2001;200(1):1-7.

Houpikian P, Raoult D. Diagnostic methods. Current best practices and guidelines for identification of difficult-to-culture pathogens in infective endocarditis. *Cardiol Clin* 2003;21(2):207-17.

Houpikian P, Raoult D. Blood culture-negative endocarditis in a reference center: etiologic diagnosis of 348 cases. *Medicine (Baltimore)* 2005;84(3):162-73.

Huang R, Liu Q, Li G, Li D, Song X, Birtles RJ & Zhao F. *Bartonella quintana* infections in captive monkeys, China. *Emerging infectious diseases* 2011; 17(9), 1707.

Huarcaya E, Best I, Rodriguez-Tafur J, *et al.* Cytokines and T-Lymphocyte count in patients in the acute and chronic phases of *Bartonella bacilliformis* infection in an endemic area in Peru: a pilot study. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2011; 53(3):149-54.

Humar A, Salit I. Disseminated *Bartonella* infection with granulomatous hepatitis in a liver transplant recipient. *Liver Transpl Surg* 1999; 5(3):249-51.

Ihler GM. *Bartonella bacilliformis*: dangerous pathogen slowly emerging from deep background. *FEMS Microbiol Lett* 1996; 144:1-11.

Inoue K, Kabeya H, Shiratori H, Ueda K, Kosoy MY, Chomel BB, *et al.* *Bartonella japonica* sp. nov. and *Bartonella silvatica* sp. nov., isolated from *Apodemus mice*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Apr; 60(Pt 4):759-63.

Iwaki-Egawa S, Ihler GM. Comparison of the abilities of proteins from *Bartonella bacilliformis* and *Bartonella henselae* to deform red cell membranes and to bind to red cell ghost proteins. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 157:207-17.

Jacobs RF, Schutze GE. *Bartonella henselae* as a cause of prolonged fever and fever of unknown origin in children. *Clin Infect Dis* 1998; 26:80-4.

Jacomo V, Kelly PJ, Raoult D. Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate). *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9:8-18.

Jardine C, Appleyard G, Kosoy MY, *et al.* Rodent-associated *Bartonella* in Saskatchewan, Canada. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2005; 5(4):402-9.

Jawad AS, Amen AA. Cat-scratch disease presenting as the oculoglandular syndrome of Parinaud: a report of two cases. *Postgrad Med J* 1990; 66:467-8

Jeanclaude D, Godmer P, Leveiller D, Pouedras P, Fournier PE, Raoult D & Rolain JM. *Bartonella alsatica* endocarditis in a French patient in close contact with rabbits. *Clinical Microbiology and Infection* 2009; 15(s2), 110-111.

Kaewmongkol G, Kaewmongkol S, Owen H, Fleming PA, Adams PJ, Ryan U, *et al.* Candidatus *Bartonella antechini*: a novel *Bartonella* species detected in fleas and ticks from the yellow-footed antechinus (*Antechinus flavipes*), an Australian marsupial. *Veterinary microbiology* 2011 May 5; 149 (3-4):517-21.

Kaiser PO, Riess T, O'Rourke F, Linke D, Kempf VA. *Bartonella* spp.: throwing light on uncommon human infections. *International journal of medical microbiology : IJMM*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2011 Jan; 301(1):7-15.

Karem KL, Paddock CD, Regnery RL. *Bartonella henselae*, *B. quintana*, and *B. bacilliformis*: historical pathogens of emerging significance. *Microbes Infect* 2000;2(10):1193-205.

Kelly P, Rolain JM, Maggi R, *et al.* *Bartonella quintana* endocarditis in dogs. *Emerg Infect Dis* 2006;12(12):1869-72.

Kempf VA, Schaller M, Behrendt S, Volkmann B, Aepfelbacher M, Cakman I, *et al.* Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in rapid bacterial rRNA synthesis and replication. *Cell Microbiol* 2000; 2:431-41.

Kempf VA, Volkmann B, Schaller M, Sander CA, Alitalo K, Riess T, *et al.* Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations. *Cell Microbiol* 2001; 3:623-32.

Kempf VA, Schairer A, Neumann D, Grassl GA, Lauber K, Lebidziejewski M, *et al.* *Bartonella henselae* inhibits apoptosis in Mono Mac 6 cells. *Cell Microbiol* 2005; 7:91-104.

Keret D, Giladi M, Kletter Y, Wientroub S. Cat-scratch disease osteomyelitis from a dog scratch. *J Bone Joint Surg Br* 1998;80(5):766-7.

Klotz SA, Ianas V, Elliott SP. Cat-scratch Disease. *Am Fam Physician* 2011;83(2):152-5.

Knowles S, & Cohen H. on behalf of of the Serious Hazards of transfusion (SHOT) Steering Group.(2011). The 2010 Annual SHOT Report, Serious Hazards of Transfusion, Manchester, UK.

Koehler JE. Bacillary angiomatosis: investigation of the unusual interactions between *Rochalimaea* bacilli and endothelial cells. *J Lab Clin Med* 1994;124(4):475-7.

Koehler JE, Sanchez MA, Garrido CS, Whitfield MJ, Chen FM, Berger TG, *et al.* Molecular epidemiology of *bartonella* infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis. *N Engl J Med* 1997; 337:1876-83.

Koehler JE, Sanchez MA, Tye S, *et al.* Prevalence of *Bartonella* infection among human immunodeficiency virus-infected patients with fever. *Clin Infect Dis* 2003;37(4):559-66.

Koehler JE, Duncan LM. Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 30-2005. A 56-year-old man with fever and axillary lymphadenopathy. *N Engl J Med* 2005;353(13):1387-94.

Koesling J, Aebischer T, Falch C, *et al.* Cutting edge: antibody-mediated cessation of hemotropic infection by the intraerythrocytic mouse pathogen *Bartonella grahamii*. *J Immunol* 2001;167(1):11-4.

Kordick DL, Breitschwerdt EB. Intraerythrocytic presence of *Bartonella henselae*. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1655-6.

Kordick DL, Hilyard EJ, Hadfield TL, Wilson KH, Steigerwalt AG, Brenner DJ, *et al.* *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease). *J Clin Microbiol* 1997; 35:1813-8.

Kordick DL, Brown TT, Shin K, Breitschwerdt EB. Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats. J Clin Microbiol 1999; 37:1536-47.

Kosek M, Lavarello R, Gilman RH, *et al.* Natural history of infection with *Bartonella bacilliformis* in a nonendemic population. J Infect Dis 2000;182(3):865-72.

Kosoy MY, Regnery RL, Tzianabos T, *et al.* Distribution, diversity, and host specificity of *Bartonella* in rodents from the Southeastern United States. Am J Trop Med Hyg 1997;57(5):578-88.

Kosoy M, Bai Y, Sheff K, *et al.* Identification of *Bartonella* infections in febrile human patients from Thailand and their potential animal reservoirs. Am J Trop Med Hyg 2010;82(6):1140-5.

Kosoy M, Hayman DT & Chan KS. *Bartonella* bacteria in nature: where does population variability end and a species start?. Infection, genetics and evolution 2012; 12(5), 894-904.

Kruszewska D, Tylewska-Wierzbanowska S. Unknown species of rickettsiae isolated from *Ixodes ricinus* tick in Walcz. Roczn Akad Med Białymst 1996;41(1):129-35.

Lamas CC, Eykyn SJ. Blood culture negative endocarditis: analysis of 63 cases presenting over 25 years. Heart 2003;89(3):258-62.

Lamas C, Curi A, Bóia MN & Lemos ERS. . Human bartonellosis: seroepidemiological and clinical features with an emphasis on data from Brazil-a review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2008; 103(3), 221-235.

Lamas CC, Mares-Guia MA, Rozental T, *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.

La Scola B, Raoult D. Serological cross-reactions between *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae*, and *Coxiella burnetii*. J Clin Microbiol 1996;34(9):2270-4.

La Scola B, Raoult D. Culture of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* from human samples: a 5-year experience (1993 to 1998). J Clin Microbiol 1999; 37:1899-905.

La Scola B, Zeaiter Z, Khamis A, Raoult D. Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: the *Bartonella* paradigm. Trends Microbiol 2003;11(7):318-21.

Lee RG *et al.* Wintrobe: Hematologia Clínica. 1. ed. São Paulo: Monole, 738-765, 1998.

Levy PY, Fournier PE, Carta M, Raoult D. Pericardial effusion in a homeless man due to *Bartonella quintana*. J Clin Microbiol 2003; 41:5291-3.

Lynch T, Iverson J, Kosoy M. Combining culture techniques for *Bartonella*: the best of both worlds. J Clin Microbiol 2011;49(4):1363-8.

Li H, Liu W, Zhang GZ, *et al.* Transmission and maintenance cycle of *Bartonella quintana* among rhesus macaques, China. Emerg Infect Dis 2013;19(2):297-300.

Lin EY, Tsigrelis C, Baddour LM, Lepidi H, Rolain JM, Patel R, *et al.* Candidatus *Bartonella mayotimonensis* and endocarditis. Emerging infectious diseases. [Case Reports]. 2010 Mar;16(3):500-3.

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.

Liu Q, Eremeeva ME, Li D. *Bartonella* and *Bartonella* infections in China: From the clinic to the laboratory. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2012; 35(2):93-102.

López CAV & Andraca RA.. *Bartonellosis*: espectro clínico actual de un viejo patógeno. *Medicina Interna de México* 2008; 24(3).

Loutit JS. *Bartonella* infections. *Curr Clin Top Infect Dis* 1997; 17:269-90.

Lucey D, Dolan MJ, Moss CW, Garcia M, Hollis DG, Wegner S, *et al.* Relapsing illness due to *Rochalimaea henselae* in immunocompetent hosts: implication for therapy and new epidemiological associations. *Clin Infect Dis* 1992; 14:683-8.

Luddy RE, Sutherland JC, Levy BE & Schwartz AD. Cat scratch disease simulating malignant lymphoma. *Cancer* 1982; 50(3), 584-586.

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; 18:287-291.

Magalhães RF, Urso Pitassi LH, Lania BG, *et al.* Bartonellosis as cause of death after red blood cell unit transfusion. *Ultrastruct Pathol* 2009;33(4):151-4.

Maggi RG, Duncan AW, Breitschwerdt EB. Novel chemically modified liquid medium that will support the growth of seven *Bartonella* species. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:2651–2655.(a)

Maggi RG, Harms CA, Hohn AA, Pabst DA, McLellan WA, Walton WJ, *et al.* *Bartonella henselae* in porpoise blood. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1894-8.(b)

Maggi RG, Kosoy M, Mintzer M, Breitschwerdt EB. Isolation of Candidatus *Bartonella melophagi* from human blood. *Emerging infectious diseases.* [Case Reports Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Jan;15(1):66-8.

Maggi RG, Mascarelli PE, Pultorak EL, Hegarty BC, Bradley JM, Mozayeni BR, *et al.* *Bartonella* spp. bacteremia in high-risk immunocompetent patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* Dec 2011; 71(4):430-437.

Maggi RG, Mozayeni BR, Pultorak EL, *et al.* *Bartonella* spp. bacteremia and rheumatic symptoms in patients from Lyme disease-endemic region. *Emerg Infect Dis* 2012;18(5):783-91.

Maguiña Vargas C. Bartonellosis o Enfermedad de Carrion. Nuevos Aspectos de Una Vieja Enfermedad. Lima: A.F.A. Editores Importadores; 1998.

Maguiña C, Gotuzzo E. Bartonellosis. New and old. *Infect Dis Clin North Am* 2000;14(1):1-22, vii.

Maguiña C, Garcia PJ, Gotuzzo E, Cordero L, Spach DH. Bartonellosis (Carrion's disease) in the modern era. *Clin Infect Dis* 2001; 33:772-9.

Maguiña Vargas C, Ugarte-Gil C, Breña Chavez P, Ordaya Espinoza E, Ventosilla Lopez P *et al.* Actualización de la enfermedad de Carrión. *Rev Med Hered* 2008; 19: 36–41.

Maguiña C, Guerra H, Ventosilla P. Bartonellosis. *Clin Dermatol* 2009;27(3):271-80.

Mandle T, Einsele H, Schaller M, Neumann D, Vogel W, Autenrieth IB, *et al.* Infection of human CD34+ progenitor cells with *Bartonella henselae* results in intraerythrocytic presence of *B. henselae*. *Blood* 2005; 106:1215-22.

Manfredi R, Sabbatani S. Bartonellosis: suggestive case reports in adult and pediatric patients and therapeutic issues. *Braz J Infect Dis* 2006; 10:411-5.

Mansueto P, Pepe I, Cillari E, *et al.* Prevalence of antibodies anti-*Bartonella henselae* in western Sicily: children, blood donors, and cats. *J Immunoassay Immunochem* 2012;33(1):18-25.

Margileth AM. Antibiotic therapy for cat-scratch disease: clinical study of therapeutic outcome in 268 patients and a review of the literature. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11:474-8.

Margileth AM. Cat scratch disease. *Adv Pediatr Infect Dis* 1993; 8:1–21.

Margileth AM. Recent Advances in Diagnosis and Treatment of Cat Scratch Disease. *Curr Infect Dis Rep* 2000;2(2):141-6.

Marie JL, Fournier PE, Rolain JM, *et al.* Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. Elizabethae*, *B. Koehlerae*, *B. Doshiae*, *B. Taylorii*, and *Rickettsia felis* in rodent fleas collected in Kabul, Afghanistan. *Am J Trop Med Hyg* 2006;74(3):436-9.

Martin L, Vidal L, Campins A, *et al.* *Bartonella* as a cause of blood culture-negative endocarditis. Description of five cases. *Rev Esp Cardiol* 2009;62(6):694-7.

Maurin M, Stein A, Raoult D. [A new bacterium: *Rochalimaea*]. *Rev Prat* 1994;44(7):865-9.

Maurin M, Gasquet S, Ducco C, Raoult D. MICs of 28 antibiotic compounds for 14 *Bartonella* (formerly *Rochalimaea*) isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(11):2387-91.

Maurin M, Raoult D. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* infections. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9:273-92.

Maurin M, Eb F, Etienne J, Raoult D. Serological cross-reactions between *Bartonella* and *Chlamydia* species: implications for diagnosis. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2283-7.

McDonald CP, Roy A, Mahajan P, Smith R, Charlett A, Barbara JA. Relative values of the interventions of diversion and improved donor-arm disinfection to reduce the bacterial risk from blood transfusion. *Vox Sang* 2004; 86:178-182.

McGill SL, Regnery RL, Karem KL. Characterization of human immunoglobulin (Ig) isotype and IgG subclass response to *Bartonella henselae* infection. *Infect Immun* 1998;66(12):5915-20.

McGill S, Wesslen L, Hjelm E, Holmberg M, Auvinen MK, Berggren K, *et al.* *Bartonella* spp. seroprevalence in healthy Swedish blood donors. Scand J Infect Dis 2005; 37:723-30.

Mehock JR, Greene CE, Gherardini FC, *et al.* *Bartonella henselae* invasion of feline erythrocytes in vitro. Infect Immun 1998;66(7):3462-6.

Minadakis G, Chochlakis D, Kokkini S, *et al.* Seroprevalence of *Bartonella henselae* antibodies in blood donors in Crete. Scand J Infect Dis 2008;40(10):846-7.

Minnick MF & Battisti JM.. Pestilence, persistence and pathogenicity: infection strategies of *Bartonella*. Future microbiology 2009; 4(6), 743-758.

Mosepele M, Mazo D, Cohn J. *Bartonella* infection in immunocompromised hosts: immunology of vascular infection and vasoproliferation. Clin Dev Immunol 2012;2012:612809.

Moulin C, Kanitakis J, Ranchin B, *et al.* Cutaneous bacillary angiomatosis in renal transplant recipients: report of three new cases and literature review. Transpl Infect Dis 2012;14(4):403-9.

Musso T, Badolato R, Ravarino D, *et al.* Interaction of *Bartonella henselae* with the murine macrophage cell line J774: infection and proinflammatory response. Infect Immun 2001;69(10):5974-80.

Noguchi H, Shannon RC, Tilden EB, Tyler JR. Etiology of Oroya Fever : Xiv. The Insect Vectors of Carrion's Disease. J Exp Med 1929;49(6):993-1008.

O'Connor SP, Dorsch M, Steigerwalt AG, Brenner DJ, Stackebrandt E. 16S rRNA sequences of *Bartonella bacilliformis* and cat scratch disease bacillus reveal phylogenetic relationships with the alpha-2 subgroup of the class Proteobacteria. J Clin Microbiol 1991; 29:2144-50.

Ohl ME, Spach DH. *Bartonella quintana* and urban trench fever. Clin Infect Dis 2000;31(1):131-5.

Olarte L, Ampofo K, Thorell EA, *et al.* *Bartonella vinsonii* endocarditis in an adolescent with congenital heart disease. Pediatr Infect Dis J 2012;31(5):531-4.

Olaso CM, Gariglio LG, García MF, Larraz GG, Bottino MG & García MP. Enfermedad por arañazo de gato: características clínicas en niños hospitalizados. An Pediatr (Barc)2011; 74(1).

Oliveira, AM, Maggi, RG, Woods, CW, Breitschwerdt, EB. Putative needle stick transmission of *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* to a veterinarian. J Vet Intern Med 2010; 24:1229–1232.

Ormerod LD, Dailey JP. Ocular manifestations of cat-scratch disease. Curr Opin Ophthalmol 1999;10(3):209-16.

O'Rourke LG, Pitulle C, Hegarty BC, Kraycirik S, Killary KA, Grosenstein P, *et al.* *Bartonella quintana* in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). Emerg Infect Dis 2005; 11:1931-4.

Pachas-Chávez, PE. Enfermedad de Carrión (bartonelosis) en el Perú. Lima, Oficina General de Epidemiología, 2001.

Pamo OG. Daniel Carrion's experiment: the use of self-infection in the advance of medicine. The journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh 2012; v. 42, n. 1, p. 81, 2012.

Pandak N, Dakovic-Rode O, Cabraja I, *et al.* Prevalence of *Bartonella henselae* antibodies in children and blood donors in Croatia. Infection 2009;37(2):166-7.

Parola P, Shpynov S, Montoya M, *et al.* First molecular evidence of new *Bartonella* spp. in fleas and a tick from Peru. Am J Trop Med Hyg 2002;67(2):135-6.

Perez-Martinez L, Blanco JR, Oteo JA. [Treatment of human infections caused by *Bartonella* spp.]. Rev Esp Quimioter 2010;23(3):109-14.

Perkocha LA, Geaghan SM, Yen TS, Nishimura SL, Chan SP, Garcia-Kennedy R, ... & Goldman RL. Clinical and pathological features of bacillary peliosis hepatitis in association with human immunodeficiency virus infection. The New England journal of medicine 1990; 323(23), 1581.

Pierard-Franchimont C, Quatresooz P, Pierard GE. Skin diseases associated with *Bartonella* infection: facts and controversies. Clin Dermatol 2010;28(5):483-8.

Pitassi LHU, Magalhães RF, Barjas-Castro ML, De Paula EV, Velho PENF. *Bartonella henselae* infects human erythrocytes. Ultrastruct Pathol 2007; 31(6):369–372.

Pitassi LH, Cintra ML, Ferreira MR, Magalhaes RF, Velho PE. Blood cell findings resembling *Bartonella* spp. Ultrastruct Pathol 2010; 34(1):2-6.

Pitassi LHU; Scorpio DG; Drummond MR L, B; Barjas-Castro ML; Gilioli R; Colombo S; dos Santos FCP; Diniz, PPVP; Breitschwerdt EB; Nicholson, WL; Velho, PENF, editor. *Bartonella* spp. detected in blood donors from Campinas, Brazil. 7th International Conference on *Bartonella* as Animal and Human Pathogens; 2012; Raleigh, North Carolina, USA.

Podsiadly E, Karbowski G, Tylewska-Wierzbanowska S. Presence of *Bartonella* spp. in Ixodidae ticks. Clin Microbiol Infect 2009;15 Suppl 2:120-1.

Pretorius AM, Beati L, Birtles RJ. Diversity of *bartonellae* associated with small mammals inhabiting Free State province, South Africa. Int J Syst Evol Microbiol 2004;54(Pt 6):1959-67.

Psarros G, Riddell Jt, Gandhi T, *et al.* *Bartonella henselae* infections in solid organ transplant recipients: report of 5 cases and review of the literature. Medicine (Baltimore) 2012;91(2):111-21.

Pulliainen AT, Dehio C. Persistence of *Bartonella* spp. stealth pathogens: from subclinical infections to vasoproliferative tumor formation. FEMS Microbiol Rev. May 2012; 36(3):563-599.

Rahimian J, Raoult D, Tang YW, Hanna BA. *Bartonella quintana* endocarditis with positive serology for *Coxiella burnetii*. J Infect 2006;53(3):e151-3.

Raoult D, Fournier PE, Drancourt M, *et al.* Diagnosis of 22 new cases of *Bartonella* endocarditis. Ann Intern Med 1996;125(8):646-52.

Raoult D. *Bartonella* infection in humans. Presse Med 1999; 28:429-34, 438.

Raoult D, Dutour O, Houhamdi L, *et al.* Evidence for louse-transmitted diseases in soldiers of Napoleon's Grand Army in Vilnius. J Infect Dis 2006;193(1):112-20.

Reeves WK, Nelder MP, Cobb KD, Dasch GA. *Bartonella* spp. in deer keds, *Lipoptena mazamae* (Diptera: Hippoboscidae), from Georgia and South Carolina, USA. J Wildl Dis 2006;42(2):391-6.

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; 30:265-74.

Reis C, Cote M, Le Rhun D, *et al.* Vector competence of the tick *Ixodes ricinus* for transmission of *Bartonella birtlesii*. PLoS Negl Trop Dis 2011;5(5):e1186.

Resto-Ruiz SI, Schmiederer M, Sweger D, Newton C, Klein TW, Friedman H, *et al.* Induction of a potential paracrine angiogenic loop between human THP-1 macrophages and human microvascular endothelial cells during *Bartonella henselae* infection. Infect Immun 2002; 70:4564-70.

Resto-Ruiz S, Burgess A, Anderson BE. The role of the host immune response in pathogenesis of *Bartonella henselae*. DNA Cell Biol 2003;22(6):431-40.

Riess T, Raddatz G, Linke D, *et al.* Analysis of *Bartonella* adhesin A expression reveals differences between various *B. henselae* strains. *Infect Immun* 2007;75(1):35-43.

Rolain JM, La Scola B, Liang Z, Davoust B, Raoult D. Immunofluorescent detection of intraerythrocytic *Bartonella henselae* in naturally infected cats. *J Clin Microbiol* 2001; 39:2978-80.

Rolain JM, Maurin M, Mallet MN, Parzy D, Raoult D. Culture and antibiotic susceptibility of *Bartonella quintana* in human erythrocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:614-9.(a)

Rolain JM, Novelli S, Ventosilla P, Maguiña C, Guerra H, Raoult D. Immunofluorescence detection of *Bartonella bacilliformis* flagella in vitro and in vivo in human red blood cells as viewed by laser confocal microscopy. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 990:581-4.(b)

Rolain JM, Franc M, Davoust B, Raoult D. Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. *Emerging infectious diseases* 2003 Mar;9(3):338-42.(c)

Rolain JM, Brouqui P, Koehler JE, Maguiña C, Dolan MJ, Raoult D. Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:1921-33.

Roubaud-Baudron C, Fortineau N, Goujard C, *et al.* [Cat scratch disease with bone involvement: a case report and literature review]. *Rev Med Interne* 2009;30(7):602-8.

Roux V, Raoult D. The 16S-23S rRNA intergenic spacer region of *Bartonella (Rochalimaea)* species is longer than usually described in other bacteria. *Gene* 1995;156(1):107-11.

Roux V, Eykyn SJ, Wyllie S, Raoult D. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* as an agent of afebrile blood culture-negative endocarditis in a human. J Clin Microbiol 2000; 38:1698-700.

Ruiz J, Silva W, Pons MJ, del Valle LJ, Tinco CR, Casabona VD, ... & del Valle J. Long time survival of *Bartonella bacilliformis* in blood stored at 4° C. A risk for blood transfusions. Blood Transfusion 2012; 10(4), 563.

Saisongkorh W, Wootta W, Sawanpanyalert P, Raoult D, Rolain JM. "Candidatus *Bartonella thailandensis*": a new genotype of *Bartonella* identified from rodents. Veterinary microbiology. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Oct 20;139(1-2):197-201.

Saenz HL, Engel P, Stoeckli MC, *et al.* Genomic analysis of *Bartonella* identifies type IV secretion systems as host adaptability factors. Nat Genet 2007;39(12):1469-76.

Schulein R, Seubert A, Gille C, Lanz C, Hansmann Y, Piemont Y, *et al.* Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes. A unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. J Exp Med 2001; 193:1077-86.

Schulte B, Linke D, Klumpp S, Schaller M, Riess T, Autenrieth IB, *et al.* *Bartonella quintana* variably expressed outer membrane proteins mediate vascular endothelial growth factor secretion but not host cell adherence. Infect Immun 2006; 74:5003-13.

Schwartz RA, Nychay SG, Janniger CK, Lambert WC. Bacillary angiomatosis: presentation of six patients, some with unusual features. Br J Dermatol 1997;136(1):60-5.

Scolfaro C, Mignone F, Gennari F, Alfarano A, Veltri A, Romagnoli R, *et al.* Possible donor-recipient bartonellosis transmission in a pediatric liver transplant. Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society. [Case Reports]. 2008 Dec;10(6):431-3.

Skerget M, Wenisch C, Daxboeck F, *et al.* Cat or dog ownership and seroprevalence of ehrlichiosis, Q fever, and cat-scratch disease. *Emerg Infect Dis* 2003;9(10):1337-40.

Sekeyova Z, Subramanian G, Mediannikov O, *et al.* Evaluation of clinical specimens for Rickettsia, *Bartonella*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Anaplasma*, *Franciscella* and *Diplorickettsia* positivity using serological and molecular biology methods. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012;64(1):82-91.

Simon TL, Dzik WH, Snyder EL, Stowel CP, Stauss RG. Rossi's Principles of Transfusion Medicine. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2002.

Slhessarenko N, Camargo MCGO, D'Auria SRN, Moureiz ESM, Camargo ME. Soroprevalência de *Bartonella henselae* em gatos do município de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 1996; 29:104.

Slhessarenko N. Doença da arranhadura do gato: aspectos clínico-epidemiológicos e laboratoriais em 38 pacientes. [Tese de Mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1998.

Souza AM, Guterres A, Gomes R, Favacho ARM, Moreira NS, Maia LMP, Rozental T, Filho RAT, Cerqueira AMF, Lemos ERS, Almosny NRP. Bartonellosis: molecular and serological analysis in cats from Rio de Janeiro – Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Science* 2010 jan./abr. 2010;17:7-11.

Spach DH, Kanter AS, Daniels NA, *et al.* *Bartonella* (Rochalimaea) species as a cause of apparent "culture-negative" endocarditis. *Clin Infect Dis* 1995;20(4):1044-7.(a)

Spach DH, Kanter AS, Dougherty MJ, *et al.* *Bartonella* (Rochalimaea) quintana bacteremia in inner-city patients with chronic alcoholism. *N Engl J Med* 1995;332(7):424-8.(b)

Spach DH, Koehler JE. *Bartonella*-associated infections. Infect Dis Clin North Am 1998; 12:137-55.

Sreter-Lancz Z, Tornyai K, Szell Z, *et al.* *Bartonella* infections in fleas (Siphonaptera: Pulicidae) and lack of *bartonellae* in ticks (Acari: Ixodidae) from Hungary. Folia Parasitol (Praha) 2006;53(4):313-6.

Staggemeier R, Venker CA, Klein DH, *et al.* Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats in the south of Brazil: a molecular study. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010;105(7):873-8.

Stein A, Raoult D. Return of trench fever. Lancet 1995; 345:450-1.

Stramer SL, Hollinger FB, Katz LM, Kleinman S, Metzler PS, Gregory KR, Dodd RY. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. Transfusion, 2009; 49(Suppl 2):1S-29S. (Appendix 2. Transfusion, 49: 4S–233S).

Sun J, Liu Q, Lu L, *et al.* Coinfection with four genera of bacteria (*Borrelia*, *Bartonella*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia*) in *Haemaphysalis longicornis* and *Ixodes sinensis* ticks from China. Vector Borne Zoonotic Dis 2008;8(6):791-5.

Sykes JE, Westropp JL, Kasten RW, Chomel BB. Association between *Bartonella* species infection and disease in pet cats as determined using serology and culture. Journal of feline medicine and surgery. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Aug;12(8):631-6.

Tappero JW, Mohle-Boetani J, Koehler JE, Swaminathan B, Berger TG, LeBoit PE, *et al.* The epidemiology of bacillary angiomatosis and bacillary peliosis. JAMA 1993; 269:770-5.

Tappero JW, Perkins BA, Wenger JD, Berger TG. Cutaneous manifestations of opportunistic infections in patients infected with human immunodeficiency virus. Clin Microbiol Rev 1995;8(3):440-50.

Telfer S, Clough HE, Birtles LR, *et al.* Ecological differences and coexistence in a guild of microparasites: *Bartonella* in wild rodents. *Ecology* 2007;88(7):1841-9.

Thudi KR, Kreikemeier JT, Phillips NJ, *et al.* Cat scratch disease causing hepatic masses after liver transplant. *Liver Int* 2007;27(1):145-8.

Tinegate, H., Birchall, J., Gray, A., Haggas, R., Massey, E., Norfolk, D., ... & Allard, S. Guideline on the investigation and management of acute transfusion reactions Prepared by the BCSH Blood Transfusion Task Force. *British journal of haematology*, 2012; 159(2), 143-153.

Truttmann MC, Rhomberg TA, Dehio C. Combined action of the type IV secretion effector proteins BepC and BepF promotes invasome formation of *Bartonella henselae* on endothelial and epithelial cells. *Cell Microbiol* 2011;13(2):284-99.

Tsai YL, Chang CC, Chuang ST, Chomel BB. *Bartonella* species and their ectoparasites: selective host adaptation or strain selection between the vector and the mammalian host? *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. [Review]. 2011 Jul;34(4):299-314.

Tsukahara M, Tsuneoka H, Iino H, *et al.* *Bartonella henselae* infection from a dog. *Lancet* 1998;352(9141):1682.

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; 38:1990-1.

Uribe P, Balcells ME, Giesen L, *et al.* [Bacillary angiomatosis]. *Rev Med Chil* 2012;140(7):910-4.

Valentine KH, Harms CA, Cadenas MB, Birkenheuer AJ, Marr HS, Braun-McNeill J, *et al.* *Bartonella* DNA in loggerhead sea turtles. *Emerg Infect Dis* 2007; 13:949-50.

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; 115:924-5.

VanderHeyden TR., Yong SL, Breitschwerdt EB, Maggi RG, Mihalik AR., Parada JP, & Fimmel CJ. Granulomatous hepatitis due to *Bartonella henselae* infection in an immunocompetent patient. BMC infectious diseases 2012; 12(1), 17.

Vasquez TP, Chanqueo CL, Garcia CP, Poggi MH, Ferres GM, Bustos MM, *et al.* Bacillary angiomatosis caused by *Bartonella quintana* in an human immunodeficiency virus positive patient. Rev Chilena Infectol 2007; 24:155-9.

Velho PE. Estudo das bartoneloses humanas e da *Bartonella henselae*: infecção experimental, microbiologia, microscopia de luz e eletrônica de transmissão. [Tese de Doutorado]. Campinas: Unicamp; 2001.

Velho PE, de Moraes AM, Uthida-Tanaka AM, Cintra ML, Gigliogi R. Ultrastructural changes in a standard strain of *Bartonella henselae* after passages through BALB/cAn mice. Ultrastruct Pathol 2002; 26:161-9.

Velho PE, Cintra ML, Uthida-Tanaka AM, de Moraes AM, Mariotto A. What do we (not) know about the human bartonelloses? Braz J Infect Dis 2003; 7:1-6.

Velho PE, de Souza EM, Cintra ML, de Moraes AM, Uthida-Tanaka AM. Diagnóstico da infecção por *Bartonella* spp.: a propósito de um caso de angiomatose bacilar. An Bras Dermatol 2006; 81:349-353.

Velho PE, Pimentel V, Del Negro GM, Okay TS, Diniz PP, Breitschwerdt EB. Severe anemia, panserositis, and cryptogenic hepatitis in an HIV patient infected with *Bartonella henselae*. Ultrastructural pathology. [Case Reports]. 2007 Nov-Dec;31(6):373-7.

Velho PE. Blood transfusion as an alternative bartonellosis transmission in a pediatric liver transplant. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*. [Comment Letter]. 2009 Oct;11(5):474.

Vermeulen MJ, Verbakel H, Notermans DW, Reimerink JH & Peeters MF. Evaluation of sensitivity, specificity and cross-reactivity in *Bartonella henselae* serology. *Journal of medical microbiology* 2010; 59(6), 743-745.

Vermi W, Facchetti F, Riboldi E, *et al.* Role of dendritic cell-derived CXCL13 in the pathogenesis of *Bartonella henselae* B-rich granuloma. *Blood* 2006;107(2):454-62.

Vitale G, Incandela S, Incandela C, *et al.* Isolation and characterization of *Bartonella quintana* from the parotid gland of an immunocompetent man. *J Clin Microbiol* 2009;47(3):862-4.

Wagner CL, Riess T, Linke D, *et al.* Use of *Bartonella* adhesin A (BadA) immunoblotting in the serodiagnosis of *Bartonella henselae* infections. *Int J Med Microbiol* 2008;298(7-8):579-90.

Walker TS, Winkler HH. *Bartonella bacilliformis*: colonial types and erythrocyte adherence. *Infect Immun* 1981;31(1):480-6.

Werner JA, Feng S, Kasten RW, Hodzic E, Chomel BB, Barthold SW. Cloning, characterization, and expression of *Bartonella henselae* p26. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13:830-6.

Yamamoto K, Chomel BB, Kasten RW, *et al.* Experimental infection of specific pathogen free (SPF) cats with two different strains of *bartonella* henselae type I: a comparative study. *Vet Res* 2002;33(6):669-84.

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.

Ying B, Kosoy MY, Maupin GO, *et al.* Genetic and ecologic characteristics of *Bartonella* communities in rodents in southern China. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66(5):622-7.

Zarraga M, Rosen L, Herschthal D. Bacillary angiomatosis in an immunocompetent child: a case report and review of the literature. *Am J Dermatopathol* 2011;33(5):513-5.

7. ANEXOS

ANEXO I
Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp.



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

🌐 www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

Ofício CEP 153/2011
Em 23/03/2011

Ilma. sra.
Profa. Dra. Luiza Helena Urso Pitassi
Pesquisadora Responsável

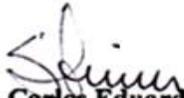
REF. : “ESTUDO SOBRE PREVALENCIA DA SOROPOSITIVIDADE DA BARTONELLA SPP EM DOADORES DE SANGUE DO HEMOCENTRO/UNICAMP” - (Parecer CEP 122/2005).

Prezada Senhora,

A dúvida da pesquisadora foi discutida na III Reunião Ordinária do Comitê de Ética em Pesquisa de 22/03/2011. A recomendação é que os sujeitos de pesquisa que apresentaram resultados soropositivos para *Bartonella spp.* sejam comunicados desses resultados e encaminhados para os tratamentos necessários, bem como sejam orientados a não doar sangue no futuro.

Sendo o que se apresenta para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM/UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

ANEXO II.

Carta convite (*Invitation Letter*) – *Jonhs Hopkins University*.



Department of Molecular and Comparative Pathobiology

June 2, 2010

Attn: Dr. Luiza Pitassi MD

Following the award of our Faculty Grant in Global Health from the Johns Hopkins Center for Global Health, Bloomberg School of Public Health, Johns Hopkins University, I would like to invite you to visit our laboratory and continue collaboration on our study entitled “Epidemiology of *Bartonella sp.* in Brazilian blood donors and domestic animals”. This study is the continuation of a joint effort between Johns Hopkins University, Western University, and the Centro de Estudos Prof. Dr. Elemir Macedo de Souza. This project will continue to be coordinated by Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho, MD, PhD at UNICAMP and Diana G. Scorpio DVM, MPH at the Johns Hopkins University and Medical Institutions.

You are welcome to visit our laboratory during any period you wish for as long as you would like. We would also invite you to give a lecture on your field of expertise during your stay here at Johns Hopkins.

Please direct any questions or concerns to the contact included below. Thank you very much and we look forward to our continued collaboration together in the discipline of bartonellosis.

Sincerely,

Diana G. Scorpio, DVM, MPH, DACLAM
Clinical Veterinarian and Assistant Professor
Department of Molecular and Comparative Pathobiology
Johns Hopkins University
School of Medicine
Ross Research Building 459
Baltimore, MD 21205
410-955-3273 (office)
410-502-5068 (fax)
dsorpio@jhmi.edu

733 N. Broadway / Suite 831 / Baltimore, Maryland 21205-2196 / 443-287-2953 / Fax 443-287-2954 / Website:
hopkinsmedicine.org/mcp

ANEXO III.

Autorização dos periódicos (*Copyright*) para inclusão dos artigos publicados na tese.



RightsLink®

Home

Account
Info

Help



Title: Bartonella henselae survives after the storage period of red blood cell units: is it transmissible by transfusion?
Author: R. F. Magalhães, L. H. U. Pitassi, M. Salvadego, A. M. De Moraes, M. L. Barjas-Castro, P. E. N. F. Velho
Publication: Transfusion Medicine
Publisher: John Wiley and Sons
Date: Oct 14, 2008

© 2008 The Authors. Journal compilation © 2008 British Blood Transfusion Society

Logged in as:
Luiza Pitassi

LOGOUT

Order Completed

Thank you very much for your order.

This is a License Agreement between Luiza Pitassi ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by John Wiley and Sons, and the [payment terms and conditions](#).

[Get the printable license.](#)

License Number	3193860904825
License date	Jul 21, 2013
Licensed content publisher	John Wiley and Sons
Licensed content publication	Transfusion Medicine
Licensed content title	Bartonella henselae survives after the storage period of red blood cell units: is it transmissible by transfusion?
Licensed copyright line	© 2008 The Authors. Journal compilation © 2008 British Blood Transfusion Society
Licensed content author	R. F. Magalhães, L. H. U. Pitassi, M. Salvadego, A. M. De Moraes, M. L. Barjas-Castro, P. E. N. F. Velho
Licensed content date	Oct 14, 2008
Start page	287
End page	291
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No
Total	0.00 USD

INFORMA HEALTHCARE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

This is a License Agreement between Luiza Pitassi ("You") and Informa Healthcare ("Informa Healthcare") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Informa Healthcare, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3194390198335
License date	Jul 22, 2013
Licensed content publisher	Informa Healthcare
Licensed content publication	ULTRASTRUCTURAL PATHOLOGY
Licensed content title	Blood Cell Findings Resembling Bartonella spp.
Licensed content author	Luiza Helena Urso Pitassi, Maria Letícia Cintra, Marilucia Ruggiero Martins Ferreira et al.
Licensed content date	Feb 1, 2010
Volume number	34
Issue number	1
Start Page	2
End Page	6
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this article
Format	print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	no
Number of copies	50
Order reference number	
Title of your thesis / dissertation	"Bartonella spp. e o risco potencial de transmissão por transfusão sanguínea"
Expected completion date	Aug 2013
Estimated Size (pages)	140
Total	0.00 USD

**INFORMA HEALTHCARE LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

This is a License Agreement between Luiza Pitassi ("You") and Informa Healthcare ("Informa Healthcare") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Informa Healthcare, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3194390288396
License date	Jul 22, 2013
Licensed content publisher	Informa Healthcare
Licensed content publication	ULTRASTRUCTURAL PATHOLOGY
Licensed content title	Bartonella henselae Infects Human Erythrocytes
Licensed content author	Luiza Helena Urso Pitassi , Renata Ferreira Magalhaes , Maria Lourdes Barjas-Castro , Erich Vinicius de Paula , Marilucia Ruggiero Martin Ferreira , Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho
Licensed content date	Jan 1, 2007
Volume number	31
Issue number	6
Start Page	369
End Page	372
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this article
Format	print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	no
Number of copies	50
Order reference number	
Title of your thesis / dissertation	"Bartonella spp. e o risco potencial de transmissão por transfusão sanguínea"
Expected completion date	Aug 2013
Estimated Size (pages)	140
Total	0.00 USD

**INFORMA HEALTHCARE LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

This is a License Agreement between Luiza Pitassi ("You") and Informa Healthcare ("Informa Healthcare") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Informa Healthcare, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3194390257201
License date	Jul 22, 2013
Licensed content publisher	Informa Healthcare
Licensed content publication	ULTRASTRUCTURAL PATHOLOGY
Licensed content title	Bartonellosis as Cause of Death After Red Blood Cell Unit Transfusion
Licensed content author	
Licensed content date	Aug 1, 2009
Volume number	33
Issue number	4
Start Page	151
End Page	154
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this article
Format	print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	no
Number of copies	50
Order reference number	
Title of your thesis / dissertation	"Bartonella spp. e o risco potencial de transmissão por transfusão sanguínea"
Expected completion date	Aug 2013
Estimated Size (pages)	140
Total	0.00 USD