



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

KARINA DE ALMEIDA LINS

Bartoneloses humanas: o desafio do diagnóstico e o uso da espectrometria de massas
MALDI-TOF

*Human bartonellosis: the challenge of diagnosis and the use of MALDI-TOF mass
spectrometry*

CAMPINAS

2020

KARINA DE ALMEIDA LINS

Bartoneloses humanas: o desafio do diagnóstico e o uso da espectrometria de massas
MALDI-TOF

*Human bartonellosis: the challenge of diagnosis and the use of MALDI-TOF mass
spectrometry*

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

*Dissertation presented to the Faculty of Medical Sciences of the
University of Campinas as a part of the requirements for obtaining the
title of Master of Science, in the concentration area of Internal
Medicine.*

ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO

COORIENTADORA: PROFA. DRA. ALESSANDRA SUSSULINI

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA KARINA DE ALMEIDA LINS, ORIENTADA PELO PROF. DR. PAULO EDUARDO NEVES
FERREIRA VELHO E COORIENTADA PELA PROFA. DRA. ALESSANDRA SUSSULINI.

CAMPINAS

2020

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

L651b Lins, Karina de Almeida, 1989-
Bartoneloses humanas : o desafio do diagnóstico e o uso da espectrometria de massas MALDI-TOF / Karina de Almeida Lins. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho.
Coorientador: Alessandra Sussulini.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Infecções por Bartonella. 2. Doenças negligenciadas. 3. Manifestações cutâneas. 4. Diagnóstico. 5. Espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz. I. Velho, Paulo Eduardo Neves Ferreira, 1966-. II. Sussulini, Alessandra, 1981-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Human Bartonellosis : the challenge of diagnosis and the use of MALDI-TOF mass spectrometry

Palavras-chave em inglês:

Bartonella infections

Neglected diseases

Skin manifestations

Diagnóstico

Spectrometry, Mass, Matrix-assisted laser desorption-ionization

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho [Orientador]

Angélica Zaninelli Schreiber

Lígia Camera Pierrotti

Data de defesa: 30-11-2020

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-7236-3711>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7024932922128622>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

NOME DA ALUNA – KARINA DE ALMEIDA LINS

ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO

COORIENTADORA: PROFA. DRA. ALESSANDRA SUSSULINI

MEMBROS TITULARES:

1. PROF. DR. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO

2. PROFA. DRA. ANGÉLICA ZANINELLI SCHREIBER

3. PROFA. DRA. LÍGIA CAMERA PIERROTTI

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

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

Data de Defesa: 30/11/2020

Dedico este trabalho às pessoas acometidas por doenças ainda pouco desvendadas, e aos pesquisadores e profissionais da saúde, que salvam a vida de muitos com esforço e dedicação. Que diante das adversidades, a ambos, não falte esperança.

AGRADECIMENTOS

Redigir os agradecimentos de uma dissertação de mestrado talvez seja, para mim, uma das partes mais importantes de todo o trabalho. É nesse momento que temos a oportunidade de desviar a atenção das pesquisas e perceber que a ciência só acontece porque, na verdade, é feita por muitas pessoas através de nós.

Agradeço primeiramente aos meus pais, Vilma e Roberto. Minhas conquistas são fruto de tudo o que me proporcionaram ao longo da vida, muitas vezes sacrificando interesses próprios, como pais amorosos e dedicados que sempre foram. Obrigada pela educação, afeto, cuidado, provisão e pelos valores transmitidos que carrego em minha essência. Devo tudo o que sou a vocês.

Aos meus avós, Rita, Dorival e Rosilva, que são como segundos pais para mim, ou, como minha avó Rita costuma dizer, pais duas vezes. Tê-los comigo é um privilégio. Obrigada por compartilharem sua sabedoria e me fazerem perceber as alegrias simples da vida. Vocês talvez pouco entendam sobre trabalhos científicos, mas certamente entendem das coisas mais valiosas nessa jornada.

À Alessandra, por todo o carinho, apoio e companheirismo. Ter você ao meu lado nesse ano tão conturbado e cheio de incertezas me deu ânimo e coragem para prosseguir. Obrigada pelo acolhimento e compreensão diante das minhas humanidades e por fazer parte da minha vida de maneira tão especial.

Aos meus amigos Jaqueline, João, Verônica e Mariana, com quem compartilho tantos momentos preciosos. Obrigada pela companhia, pelas conversas, risadas, treinos, comidas e por me apoiarem e incentivarem em tudo. Vocês tornam a minha vida mais leve e divertida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Velho, um médico e pesquisador competente e dedicado que me proporcionou um grande aprendizado, e também uma pessoa íntegra e sempre gentil, a quem respeito e admiro.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Alessandra Sussulini, por se dispor a participar dessa pesquisa desafiadora, pelas ideias ao longo do projeto e por abrir caminhos diante das dificuldades.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Dermatologia Aplicada e Infecções por Bartonella, Amanda, Marilene, Gislaine, Tânia, Marina, Luciene, Bruno, Ana Paula, Beatriz, Diego e Gabriel. Vocês sempre me proporcionaram um ambiente de trabalho agradável, de aprendizado, esforço em equipe e, porque não dizer, de amizade. Obrigada pelas trocas, por me ajudarem tanto e pela convivência prazerosa.

Também às companheiras de trabalho do Laboratório de Controle de Qualidade e Biossegurança do Hemocentro de Campinas, especialmente minha supervisora Andréa Origa, por tudo o que tem me ensinado, por me apoiar e incentivar na pesquisa e por ser sempre uma pessoa tão justa e cordial, a quem eu admiro muito.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Unicamp, especialmente ao Prof. Carlos Levy e a Cristiane, por viabilizarem este projeto e se disporem a ajudar no que foi necessário.

À profa. Anita Marsaioli, do Instituto de Química da Unicamp, que me permitiu utilizar seu laboratório para realização de parte do trabalho, e também à Rita e ao Eraldo, que foram tão solícitos e gentis me ajudando a conduzir os experimentos.

Por último e não menos importante, agradeço a Deus, porque, para mim, é Ele quem dá propósito e sentido a todas as coisas. Ele é o autor da vida e o próprio amor, que se move em tudo e em todos. Obrigada, meu Deus, por todas as pessoas que se fazem ou se fizeram presentes em algum momento da minha vida, pelas oportunidades de aprendizado e crescimento e por me permitir a conclusão deste trabalho.

Se, como forma de gratidão, esta pesquisa puder contribuir para um mundo um pouco melhor através da educação e promoção da saúde de qualquer pessoa, ainda que de forma indireta, tenho a plena certeza de que todo o esforço terá valido a pena.

RESUMO

As bartoneloses são doenças negligenciadas, emergentes, mundialmente distribuídas, que apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas, incluindo as dermatológicas, e muitos aspectos ainda não desvendados. São causadas pelas *Bartonella* spp., bactérias gram-negativas, de crescimento lento, majoritariamente zoonóticas e transmitidas por artrópodes hematófagos. A *Bartonella henselae* se destaca como a espécie mais comum em infecções humanas, responsável pela doença da arranhadura do gato. Pacientes imunodeficientes são suscetíveis a condições mais graves e potencialmente fatais. O diagnóstico das infecções por *Bartonella* spp. é desafiador, principalmente por se tratarem de bactérias pouco conhecidas e de difícil cultivo. Não existe um método padrão ouro e a combinação de cultura e técnicas moleculares tem sido apontada como estratégia para aumento da sensibilidade, mas trata-se uma abordagem cara, morosa e trabalhosa, de modo que alternativas melhores são necessárias. Nesse contexto, a espectrometria de massas MALDI-TOF tem revolucionado a rotina de identificação de bactérias como um método rápido, fácil e eficiente, mas seu potencial de aplicação na investigação das *Bartonella* spp. ainda é pouco explorado, especialmente, em se tratando de microrganismos fastidiosos, no que diz respeito à influência do tempo de crescimento dessas bactérias em sua identificação. A presente dissertação tem seu conteúdo apresentado em formato alternativo, com os resultados descritos através de dois artigos: “Manifestações cutâneas das bartoneloses” e “A influência do tempo de crescimento na identificação de cepas de *Bartonella henselae* por espectrometria de massas MALDI-TOF”. O primeiro artigo teve como objetivo realizar uma revisão da literatura a respeito das principais manifestações clínicas das bartoneloses humanas, sobretudo cutâneas, bem como aspectos relacionados à emergência, negligência, prevenção, diagnóstico e tratamento dessas doenças. Foi possível observar que a diversidade e complexidade das condições associadas às infecções por *Bartonella* spp., bem como suas limitações diagnósticas, representam um desafio para a comunidade médica e científica, de modo que mais estudos são necessários para aumentar a compreensão dessas doenças. A publicação do referido artigo é uma contribuição para difundir o conhecimento sobre as bartoneloses humanas, possibilitando que sejam mais consideradas para diagnóstico, identificadas e tratadas

adequadamente. O segundo artigo teve como objetivo avaliar a influência do tempo de crescimento de cepas de *B. henselae* em sua identificação através da MALDI-TOF MS. Para tanto, foram obtidos espectros de referência de três cepas de *B. henselae* (IAL 3714, IAL 3715 e IAL 3716) com diferentes tempos de crescimento (14 e 28 dias) para criação de entradas no banco de dados. As cepas foram novamente cultivadas para obtenção de novos espectros e comparação com os primeiros pelo programa Biotyper® (Bruker). Observou-se que cepas com tempos de crescimento diferentes apresentaram diferenças quantitativas e qualitativas em seus espectros de massas e, conseqüentemente, baixa similaridade quando comparadas pelo programa, comprometendo sua identificação. Como o tempo de crescimento não é uma varável controlável no cultivo dessas bactérias, sugeriu-se a inclusão de entradas em bancos dados com espectros de referência de colônias com tempos de crescimento diferentes para aumentar as chances de identificação. Esse estudo contribuiu para o possível estabelecimento da MALDI-TOF MS como uma alternativa promissora na identificação de cepas de *Bartonella* spp..

Palavras-chave: Infecções por Bartonella. Doenças negligenciadas. Manifestações cutâneas. Diagnóstico. Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz.

ABSTRACT

Bartonellosis are neglected, emerging and globally distributed diseases that presents a wide spectrum of clinical manifestations, including dermatological, and many aspects that are still covered. They are caused by *Bartonella* spp., Gram-negative, slow-growing bacteria, mostly zoonotic and transmitted by blood-sucking arthropods. *Bartonella henselae* stands out as the most common species in human infections, responsible for cat scratch disease. Immunocompromised patients are susceptible to more serious and potentially fatal conditions. The diagnosis of *Bartonella* spp. infection is challenging, mainly because they are poorly known and difficult to culture bacteria. There is no a gold standard method and combination of culture and molecular techniques has been suggested to improve sensitivity, but it is an expensive, time-consuming and labor-intensive approach, so that better alternatives are required. In this context, MALDI-TOF MS has revolutionized the routine of bacteria identification as a fast, easy and efficient

method, but its potential of application in the investigation of *Bartonella* spp. it is still unexplored, especially, considering the fastidious nature of this microorganism, with regard to the influence of the growth time of these bacteria in their identification. This dissertation has its content presented in an alternative format, with the results described through two articles: "Cutaneous manifestations of bartonellosis" and "The influence of growth time on identification of *Bartonella henselae* strains by MALDI-TOF mass spectrometry". The first article aimed to conduct a review of the literature regarding the main clinical manifestations of human bartonellosis, especially cutaneous, as well as aspects related to the emergence, negligence, prevention, diagnosis and treatment of these diseases. It was possible to observe that the diversity and complexity of the conditions associated with *Bartonella* spp. infection, as well as their diagnostic limitations, represent a challenge for the medical and scientific community, so that more studies are necessary to increase the understanding of these diseases. The publication of this article is a contribution to spread knowledge about human bartonellosis, allowing them to be further examined for diagnosis, identified and treated properly. The second article aimed to evaluate the influence of the growth time of *B. henselae* strains on their identification by MALDI-TOF MS. For this purpose, reference spectra of three *B. henselae* strains (IAL 3714, IAL 3715 and IAL 3716) with different growth times (14 and 28 days) were obtained to create database entries. The strains were then newly cultivated for obtention of new spectra and comparison with database entries through the software Biotyper® (Bruker). It was observed that strains with different growth times have quantitative and qualitative differences in their mass spectra and, consequently, low similarity when compared by the software, compromising the identification. As the growth time is not a controllable variable in the culture of these bacteria, it was suggested to include database entries with reference spectra of colonies with different growth times to increase the chances of identification. This study contributed to the possible establishment of MALDI-TOF MS as a promissory alternative for the identification of *Bartonella* spp. strains.

Keywords: Bartonella infection. Neglected diseases. Skin manifestations. Diagnostic. Spectrometry, Mass, Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	As bartoneloses humanas.....	13
1.2	Principais manifestações clínicas.....	14
1.2.1	<i>Bartonella bacilliformis</i>	15
1.2.2	<i>Bartonella quintana</i>	16
1.2.3	<i>Bartonella henselae</i>	16
1.3	Bacteremia assintomática e o risco de transmissão por transfusão de sangue	18
1.4	O desafio do diagnóstico.....	18
1.5	O advento da espectrometria de massas MALDI-TOF.....	21
1.5.1	Estado da arte da aplicação da MALDI-TOF MS no estudo das <i>Bartonella</i> spp.....	22
1.6	Justificativa.....	23
2	OBJETIVOS.....	24
2.1	GERAL.....	24
2.2	ESPECÍFICOS.....	24
2.2.1	Revisão da literatura.....	24
2.2.2	Avaliação da influência do tempo de crescimento na Identificação de cepas de <i>B. henselae</i> por MALDI-TOF MS.....	24
3	METODOLOGIA.....	25
3.1	Revisão da literatura.....	25
3.2	Avaliação da influência do tempo de crescimento na Identificação de cepas de <i>B. henselae</i> por MALDI-TOF MS.....	26
3.2.1	Amostras bacterianas.....	26
3.2.2	Condições de cultura.....	26
3.2.3	Preparo da amostra.....	26

3.2.4	Análises MALDI-TOF MS	27
4	RESULTADOS	29
4.1	Artigo 1: Manifestações cutâneas das bartoneloses (<i>artigo publicado</i>)	29
4.2	Artigo 2: A influência do tempo de crescimento na identificação de cepas de <i>Bartonella henselae</i> por espectrometria de massas MALDI-TOF (<i>artigo submetido</i>) .	53
5	DISCUSSÃO GERAL.....	69
6	CONCLUSÃO	75
7	REFERÊNCIAS	76
8	ANEXOS.....	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 As bartoneloses humanas

As doenças causadas por *Bartonella* spp., embora sejam pouco conhecidas, são de grande importância para a saúde humana e têm apresentado características cada vez mais instigantes à medida em que são estudadas. Consideradas entre as doenças bacterianas mais antigas em humanos (1), algumas de suas manifestações clínicas são conhecidas e descritas desde a era pré-colombiana (2). Essas bactérias foram responsáveis por grande epidemia durante as Guerras Mundiais, afetando mais de um milhão de soldados nas trincheiras europeias só na Primeira Grande Guerra (3). Estão distribuídas no mundo todo (4) e uma de suas espécies é endêmica em alguns países da América Latina (5), região onde marcou a história da medicina local (2) e foi considerada como uma das prioridades para pesquisa em saúde (6).

Relman et al. (7), no início da década de 90, realizaram um trabalho pioneiro na identificação de um patógeno não cultivado até então, a *Bartonella henselae*, que representou um marco na história do diagnóstico molecular de infecções por bactérias de difícil cultivo (8). Após 30 anos de pesquisa sobre *Bartonella* spp., o conhecimento a respeito dessas bactérias ainda é limitado (9). São pouco investigadas em relação a patógenos mais comuns (10) e apresentam aspectos clínicos e diagnósticos bastante desafiadores (4).

As *Bartonella* spp. são bactérias gram-negativas, fastidiosas, intracelulares facultativas e bem adaptadas a mamíferos como reservatórios. Sua estratégia de infecção envolve a permanência em um nicho intraeritrocitário, o que promove proteção contra a resposta imunológica do hospedeiro, bacteremia cíclica e persistente e adaptação à contínua transmissão através de vetores artrópodes hematófagos, como piolhos, pulgas, carrapatos e mosquitos (10). Muitas espécies são zoonóticas (11). Os sintomas podem variar surpreendentemente de acordo com a espécie infectante, a fase de infecção e o estado imunológico do paciente, podendo causar bacteremia assintomática, doenças autolimitadas e até condições potencialmente fatais (12, 13). São capazes também de infectar células endoteliais (14) e promover angiogênese,

provavelmente por meio da proliferação e migração dessas células (13, 15). Alguns dos principais sintomas decorrentes de infecção por *Bartonella* sp. envolvem lesões na pele, de modo que as manifestações cutâneas são bastante importantes na identificação dessas doenças (16).

Recentemente, as infecções por *Bartonella* spp. têm sido apontadas como doenças emergentes e reemergentes (14), o que se deve a fatores como o desenvolvimento de métodos de detecção bacteriana mais sensíveis, aumento da exploração da natureza, alterações climáticas e disseminação da pobreza e de condições imunossupressoras (17-19). Como reflexo disso, o número de publicações sobre *Bartonella* spp. tem aumentado significativamente nas últimas duas décadas em relação aos anos anteriores, descrevendo novas espécies, ampliando o espectro de manifestações clínicas e reportando um número cada vez maior de potenciais hospedeiros, com grande prevalência entre mamíferos, bem como a expansão do conhecimento sobre vetores em diferentes ambientes (10, 20).

As bartoneloses são consideradas doenças negligenciadas por causarem condições crônicas e debilitantes que afetam principalmente pessoas que vivem com poucos recursos, condições sanitárias precárias e contato próximo com animais e vetores. Curiosamente, contudo, as infecções por *Bartonella* spp. não estão listadas entre as 20 condições classificadas como Doenças Negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde, embora sua inclusão seja sugerida e a necessidade de esforços para conter essas doenças seja reconhecida por pesquisadores (21).

1.2 Principais manifestações clínicas

Existem hoje 45 espécies oficiais e candidatas de *Bartonella* descritas, das quais 17 estão relacionadas a doenças em humanos (4, 22). Destas, três são de maior relevância clínica: *Bartonella bacilliformis*, *Bartonella quintana* e *Bartonella henselae* (23). A Tabela 1 mostra algumas das principais manifestações clínicas associadas a essas espécies.

Tabela 1. Principais manifestações clínicas das infecções por *Bartonella* spp.

Espécie	Principais manifestações clínicas
<i>Bartonella bacilliformis</i>	doença de Carrión: febre de Oroya e verruga peruana
<i>Bartonella quintana</i>	febre das trincheiras, angiomatose bacilar e endocardite
<i>Bartonella henselae</i>	doença da arranhadura do gato, angiomatose e peliose bacilar, endocardite

1.2.1 *Bartonella bacilliformis*

A *B. bacilliformis* foi a primeira espécie de *Bartonella* descrita na literatura (2). O termo “bartoneloses” era aplicado somente às infecções causadas por essa espécie, mas passou a abranger manifestações relacionadas aos demais membros do gênero à medida em que novas descobertas foram feitas a respeito dessas bactérias (23).

Entre 1869 e 1873, a *B. bacilliformis* foi responsável pela morte, em decorrência de uma anemia hemolítica aguda febril, de cerca de 7 mil pessoas que trabalhavam na construção de uma estrada de ferro que ligaria a cidade de Lima até Oroya, localizada na região montanhosa dos Andes peruanos, razão pela qual a doença ficou conhecida como febre de Oroya (23). Em 1885, um estudante de medicina peruano chamado Daniel Alcides Carrión inoculou em si mesmo o sangue obtido de uma lesão cutânea de um paciente hospitalizado e, após alguns dias, desenvolveu anemia hemolítica severa, documentando que a “verruga” continha o agente responsável pela febre de Oroya e estabelecendo a relação entre as fases aguda (febre de Oroya) e crônica (verruga peruana) da doença (24). O experimento de Daniel foi trágico apesar de brilhante, pois o conduziu a óbito, e a infecção passou a ser chamada de doença de Carrión em sua homenagem (23, 24). A bactéria foi posteriormente identificada em 1905 pelo médico microbiologista Alberto Barton (2).

Endêmica na região dos Andes, em países como Peru, Equador e Colômbia, a espécie possui o homem como único reservatório hospedeiro e é transmitida pela

fêmea do mosquito *Lutzomyia verrucarum*, que vive em regiões úmidas de altitudes elevadas. Alterações climáticas que provocam períodos chuvosos prolongados com temperaturas elevadas têm sido responsáveis pelo aumento da população de vetores e, conseqüentemente, contribuído para a expansão da doença (25). Para prevenir o contágio deve-se evitar a picada do mosquito em regiões onde a doença é comum, através do uso de repelentes e roupas que cubram a maior parte do corpo (26).

1.2.2 *Bartonella quintana*

A infecção por *B. quintana* foi descrita durante a Primeira Guerra Mundial, manifestando principalmente febre recorrente, mal-estar, dores na cabeça e nas articulações e deixando milhares de soldados inaptos para o serviço por mais de 60 dias de uma única vez (3). Os soldados afetados ficavam nas trincheiras, escavações lineares no solo que protegem o exército contra tropas inimigas, razão pela qual a doença ficou conhecida como febre das trincheiras (3). O fato de os soldados permanecerem em contato próximo e condições de higiene precárias nas trincheiras favoreceu a propagação da infecção, uma vez que humanos são os únicos reservatórios conhecidos da *B. quintana* e a transmissão ocorre através do piolho do corpo, *Pediculus humanus corporis* (23). Depois disso a doença permaneceu obscura por um tempo, até reemergir no início da década de 90 como infecção oportunista entre pessoas que vivem com aids, situação de indigência e alcoolismo crônico (20, 23). Infecções por *B. quintana* ou *B. henselae* também têm sido apontadas como causa emergente de endocardite entre essas populações (20). Lesões valvulares pré-existentes são fator de risco para a doença (20, 27). Cerca de 80% a 90% dos pacientes com febre das trincheiras podem apresentar máculas ou pápulas eritematosas (13). A prevenção é feita evitando-se a exposição ao piolho do corpo, que está associado à falta de higiene, bem como o compartilhamento de roupas e toalhas com pessoas que possam ter o piolho (26).

1.2.3 *Bartonella henselae*

A *B. henselae* é a espécie mais associada a infecções humanas. Sua manifestação clínica mais comum consiste na doença da arranhadura do gato (DAG), caracterizada pelo desenvolvimento de pápula eritematosa no local da inoculação e

linfadenopatia regional autolimitada, possivelmente acompanhada por febre e mal-estar (14, 28). Outras manifestações atípicas e mais graves, como febre de origem desconhecida, neuroretinite, encefalite, lesões hepatosplênicas e osteomielite podem ocorrer em 5 a 14% dos casos em indivíduos imunocompetentes infectados, mas afetam principalmente pessoas imunodeficientes (28).

Pacientes que vivem com HIV (sigla em inglês para vírus da imunodeficiência humana) /aids podem manifestar angiomatose bacilar (AB) em decorrência da infecção por *B. henselae* ou *B. quintana*. Um estudo de casos controle de AB relatou que dos 48 pacientes avaliados, apenas cinco eram HIV negativos e que a aquisição da doença estava relacionada, principalmente, ao histórico de arranhaduras ou mordeduras de gatos (29). Porém, é importante mencionar também que a incidência de AB diminuiu drasticamente desde a disponibilidade do tratamento com vários antivirais contra a aids (30). Consistem em lesões cutâneas vasoproliferativas que podem afetar também outros órgãos como coração, baço, fígado, ossos e sistema nervoso central, constituindo-se uma condição bastante grave. Quando as lesões angiomatosas estão associadas a dilatações capilares são chamadas de peliose bacilar; acontecem predominantemente no fígado e no baço, e são causadas pela *B. henselae* (27, 28).

Gatos domésticos são os principais hospedeiros da *B. henselae* e a transmissão entre gatos ocorre através da pulga (31), que atua como vetor da doença. A transmissão de gatos para humanos está associada a arranhadura ou mordedura do animal, provavelmente através da inoculação das fezes do vetor contaminadas na pele lesionada, presentes na unha ou na saliva do gato (32). O contato com gatos é considerado um fator de risco para a doença e gatos que vivem em regiões quentes e úmidas apresentam maior prevalência da infecção (33). Um estudo publicado recentemente descreveu a prevalência de bacteremia por *B. henselae* em 90.2% dos gatos testados na região de Campinas, Brasil (34). Para prevenir a transmissão, deve-se manter gatos dentro de casa e realizar o controle e tratamento contra pulgas nos animais, bem como evitar lesões decorrentes do contato com os mesmos. Pessoas com imunodeficiência devem evitar o contato estes animais (26).

1.3 Bacteremia assintomática e o risco de transmissão por transfusão de sangue

Embora a possibilidade de bacteremia assintomática em pacientes imunocompetentes sugira que as infecções por *Bartonella* spp. sejam pouco importantes, além de uma possível futura manifestação de sintomas em momento oportuno, a transmissão para pacientes mais vulneráveis por transfusão de sangue é um risco bastante preocupante. Foi comprovado que *B. henselae* pode sobreviver em sangue armazenado por 35 dias a 4 °C (35) e que a transmissão entre camundongos é possível mesmo quando a bactéria não é detectada no doador (36).

Pitassi et al. (37) realizaram um estudo com doadores de sangue assintomáticos de Campinas, Brasil, em que 16 (3.2%) dos 500 doadores testados apresentaram resultado positivo para presença de DNA (sigla em inglês para ácido desoxirribonucleico) de *Bartonella* sp. utilizando um único tipo de PCR (sigla em inglês para reação em cadeia da polimerase). Um estudo posterior realizou a testagem das mesmas amostras com quatro tipos de PCR diferentes, aumentando o resultado para 115 (23%) dos doadores positivos, um número alarmante (38). Não existe atualmente nenhum protocolo de prevenção da transfusão quando doadores têm exposição de risco para a infecção por *Bartonella* spp. (37).

1.4 O desafio do diagnóstico

O diagnóstico das infecções por *Bartonella* spp. é considerado uma tarefa bastante desafiadora, que requer uma avaliação cuidadosa (39). Por se tratarem de bactérias fastidiosas, elas demandam condições específicas para o crescimento, como meio de cultura enriquecido com sangue, ambiente úmido e saturado com gás carbônico (5%) e temperatura de 35°C. Mesmo em condições ótimas o isolamento dessas bactérias pode levar de uma até seis semanas (40-42).

Por muito tempo o diagnóstico das bartoneloses foi baseado em critérios clínicos e testes cutâneos, mas desde que foram desenvolvidos antígenos específicos para a detecção de anticorpos contra *Bartonella* sp., no início da década de 90, os testes sorológicos foram amplamente utilizados para a confirmação de suspeita de infecção

devido a sua simplicidade (43, 44). A sorologia por imunofluorescência indireta (IFI) é o teste mais utilizado para a detecção de anticorpos contra *Bartonella* sp., mas a sensibilidade e especificidade desse método é frequentemente reportada como baixa (44, 45). A leitura de um teste IFI é subjetiva e pode variar significativamente de acordo com os parâmetros laboratoriais utilizados, além de não ser aplicável nos estágios iniciais da infecção e de antígenos disponíveis no mercado serem restritos a poucas espécies (43, 46). A baixa especificidade de testes para anticorpos IgG está relacionada a reatividade cruzada com outros patógenos e entre diferentes espécies de *Bartonella*, enquanto testes para anticorpos IgM têm sua especificidade comprometida devido a distribuição regional de diferentes genótipos de *Bartonella* sp. (45). Considerando essas limitações, de modo geral, testes sorológicos não são uma boa alternativa para serem utilizados isoladamente no diagnóstico de bartoneloses.

Métodos histológicos são pouco utilizados, exceto em casos de lesões teciduais características da infecção, como a AB, verruga peruana (clínica e histologicamente semelhantes) e a DAG. (38, 47, 48). À coloração de Warthin-Starry e à microscopia eletrônica podem ser vistos bacilos intra e extracelulares, o que pode levar a um diagnóstico presuntivo, mas a diferenciação entre espécies não é possível (49).

A utilização de métodos moleculares como PCR tem apresentado a vantagem de permitir a detecção dessas bactérias de maneira mais rápida e sensível, sem a necessidade do isolamento em cultura. A utilização *primers* direcionados para a região intergênica 16S-23S rRNA (ITS, sigla em inglês), a PCR convencional, tem sido apontada como promissora para a detecção e diferenciação de espécies de *Bartonella*, enquanto a PCR *nested*, de dupla amplificação e, portanto, mais sensível, tem como alvo a região que codifica a proteína FtsZ e é específica para detecção de *B. henselae* (38). Porém métodos moleculares envolvem metodologias caras e tecnicamente exigentes. As características de bacteremia cíclica e possível baixa concentração de bactérias na corrente sanguínea durante a infecção possibilitam a ausência do DNA da bactéria na amostra coletada para o teste e, além disso, a detecção do DNA não implica necessariamente em uma infecção ativa (47). Portanto, técnicas moleculares estão sujeitas a resultados falso-negativos.

Considerando esses fatores, a combinação de metodologias em uma plataforma de vários passos tem sido sugerida para aumentar a sensibilidade do diagnóstico dessas infecções (42, 50). A realização da cultura de amostras clínicas aumenta as chances tanto de isolamento quanto de detecção do DNA da bactéria, que também pode ser favorecida com diferentes tipos de PCR (42, 51, 52). O estudo previamente citado sobre determinação da bacteremia por *Bartonella* sp. em gatos na região de Campinas, Brasil, documenta o aumento da detecção da bactéria de 27.7% para 90.2% nas amostras analisadas, quando utilizou-se a combinação de diferentes tipos de PCR no sangue, na cultura líquida após dez dias de incubação e no isolado obtido em cultura sólida, quando presente (34). Apesar do aumento da sensibilidade ser uma grande vantagem, a combinação de metodologias implica também no aumento significativo de custos e tempo de análise, podendo levar até dois meses para a emissão de um laudo final (34). A Figura 1 mostra as etapas envolvidas na plataforma utilizada para o diagnóstico diferencial de infecção por *Bartonella* sp. pelo Laboratório de Pesquisa Aplicada em Dermatologia e Infecções por Bartonela da Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

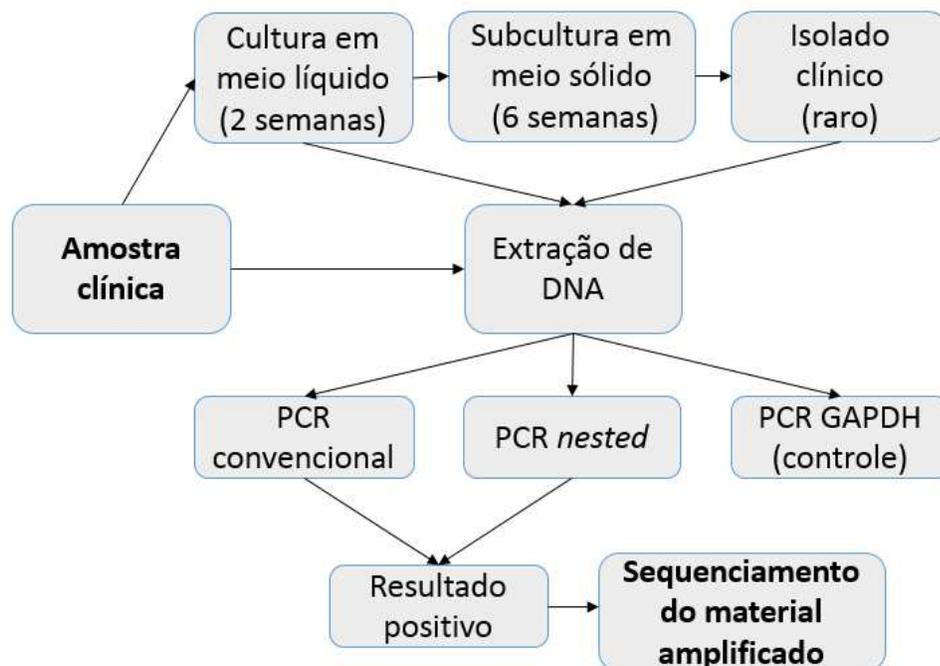


Figura 1. Combinação de técnicas para aumentar a sensibilidade do diagnóstico de infecção por *Bartonella* sp.

1.5 O advento da espectrometria de massas MALDI-TOF

Um diagnóstico precoce pode ser crítico na vida de um paciente, reduzindo taxas de mortalidade e tempo de hospitalização e viabilizando uma terapia antimicrobiana adequada, o que também previne a disseminação da resistência antimicrobiana. Além disso, a redução de custos é necessária e vantajosa para os sistemas de saúde, especialmente em países em desenvolvimento. Portanto, a necessidade da definição de métodos mais rápidos, sensíveis e de menor custo para a detecção de *Bartonella* sp. é evidente. Nesse contexto, a espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz e tempo de voo (MALDI-TOF MS, sigla para o nome da técnica em inglês) tem sido apontada como um método revolucionário na rotina de identificação de microrganismos (53). Trata-se de uma técnica mais fácil, mais rápido, de menor custo e mais eficiente para a identificação de bactérias em relação aos métodos convencionais, tendo como uma das maiores vantagens a redução do tempo de análise de 24 a 48 horas para menos de uma hora, no caso de bactérias não fastidiosas (54).

A espectrometria de massas é uma técnica analítica que permite a identificação dos componentes de uma amostra em função da sua razão massa/carga. Sua aplicação na identificação de bactérias foi proposta pela primeira vez em 1975, quando Anhalt e Fenselau (55) observaram que bactérias poderiam ser diferenciadas através de seus espectros de massas, mas isso só se tornou possível com o desenvolvimento de técnicas de ionização branda (56), como MALDI, que passaram a permitir a análise de biomoléculas de alto peso molecular. Em 1996, Holland et al. demonstraram que impressões digitais espectrométricas poderiam ser obtidas de uma célula bacteriana inteira por MALDI-TOF MS (56), o que se tornou uma aplicação de grande sucesso. As biomoléculas observadas em espectros obtidos por essa técnica consistem majoritariamente em proteínas ribossomais altamente conservadas, com funções estruturais, pouco suscetíveis a condições externas e, portanto, consideradas para a identificação de microrganismos (57).

Uma pequena quantidade de bactérias ($10^4 - 10^5$) é suficiente para a realização da análise. O material é depositado sobre uma placa metálica MALDI e sobreposto com uma matriz, como o ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico (HCCA, sigla

para o nome do composto em inglês), seguido da secagem em temperatura ambiente para permitir a cocrystalização da matriz com a amostra (54). Protocolos de tratamento químico são propostos em alguns casos para potencializar o rompimento da célula bacteriana e a extração das proteínas para a análise, e demonstraram aumentar o potencial de identificação (58, 59). Finalmente, a placa é inserida no espectrômetro de massas para aquisição de dados. A identificação bacteriana se dá pela comparação do espectro obtido de uma bactéria desconhecida com entradas de referência armazenadas em um banco de dados, o que pode ser feito através de um programa. O Biotyper (Bruker), por exemplo, calcula um valor de *score* de 0 a 3 com base na similaridade entre os espectros comparados; valores de *score* ≥ 2 indicam identificação a nível de espécie de alta confiança, valores $\geq 1,7$ e < 2 indicam identificação de baixa confiança e valores $< 1,7$ indicam identificação não confiável (53).

Muitos estudos têm comprovado a acurácia e a reprodutibilidade da identificação de bactérias por MALDI-TOF MS (60-63). Espectros de referência de qualidade são um pré-requisito fundamental para o sucesso da análise e falhas de identificação são atribuídas principalmente a falta de espectros de referência em bancos de dados (53). Portanto, mais identificações com alto grau de confiança podem ser obtidas à medida em que mais espectros de referência de qualidade de microrganismos bem caracterizados são inseridos em bancos de dados, inclusive de espécies bacterianas incomuns (53).

1.5.1 Estado da arte da aplicação da MALDI-TOF MS no estudo das *Bartonella* spp.

A MALDI-TOF MS tem sido apontada como uma alternativa promissora na identificação de bactérias de difícil cultivo, como a *Bartonella* spp. (59). Fournier et al. (64) determinaram um espectro de referência único para cada uma das 17 espécies de *Bartonella* utilizadas no estudo e identificaram corretamente 39 cepas desconhecidas a nível de espécie, comprovando que essa técnica é capaz de identificar cepas de *Bartonella* de forma reprodutível, acurada e com baixo custo. Dois estudos que realizaram a infecção experimental de *Bartonella* sp. em pulgas (65) e percevejos (66) demonstraram que a técnica foi capaz de diferenciar os artrópodes infectados dos não infectados,

mostrando um grande potencial de aplicação em entomologia médica e vigilância de vetores. Apesar desses estudos, não há outras evidências de aplicação prática da identificação de *Bartonella* sp. por MALDI-TOF MS na rotina clínica e mais pesquisas são necessários para o estabelecimento dessa metodologia como uma alternativa no diagnóstico das bartoneloses.

Uma análise por MALDI-TOF MS pode ser influenciada pelo tipo de equipamento utilizado, composição da matriz, proporção entre a matriz e amostra, quantidade de colônias e tempo/condições de crescimento do microrganismo, e a padronização de condições experimentais controladas é amplamente recomendada para garantir a reprodutibilidade da técnica (57). Dentre esses fatores, o tempo de crescimento da bactéria tem especial importância no caso da identificação de bactérias fastidiosas. Arnold et al. (67) propuseram-se a monitorar o crescimento de uma cepa de *Escherichia coli* obtendo espectros de massas periodicamente num período de 6 a 84 horas após a inoculação e concluíram que os espectros obtidos variaram qualitativamente e quantitativamente em função do tempo de crescimento da bactéria, possibilitando erros de identificação. O estudo reforça a necessidade de padronização do tempo de crescimento do microrganismo para garantir a reprodutibilidade da análise por MALDI-TOF MS, porém, esse parâmetro não é facilmente controlável no caso da cultura de microrganismos de crescimento lento (67). Não foram encontrados estudos com *Bartonella* spp. a esse respeito.

1.6 Justificativa

Deve-se considerar que as bartoneloses são doenças negligenciadas, porém emergentes, que apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas e são importantes para a saúde de pessoas no mundo todo. Além disso, há dificuldades e desafios significativos no diagnóstico dessas infecções, e a MALDI-TOF MS, técnica considerada revolucionária para a identificação de microrganismos, se apresenta como um potencial ainda pouco explorado de aplicação na identificação das *Bartonella* spp..

Portanto, faz-se necessária a revisão das principais manifestações clínicas das bartoneloses, e a exploração de aspectos relacionados ao potencial uso da MALDI-

TOF MS na identificação de cepas de *B. henselae*, espécie mais frequente em infecções humanas, especialmente no que diz respeito à influência do tempo de crescimento dessa bactéria fastidiosa em sua identificação por esta técnica.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Fazer revisão da literatura sobre as manifestações clínicas das bartoneloses, particularmente as cutâneas, e avaliar aspectos sobre o potencial uso da MALDI-TOF MS na identificação de isolados de *B. henselae*, especialmente a influência do tempo de crescimento da bactéria em sua identificação.

2.2 ESPECÍFICOS

2.2.1 Revisão da literatura

Revisar a literatura narrativamente, utilizando para a busca de trabalhos os principais bancos de dados científicos disponíveis e palavras-chave pertinentes, quanto às principais manifestações clínicas das bartoneloses humanas, sobretudo as dermatológicas, bem como aspectos relacionados à negligência, emergência, distribuição, diagnóstico, prevenção e tratamento dessas doenças.

2.2.2 Avaliação da influência do tempo de crescimento na Identificação de cepas de *B. henselae* por MALDI-TOF MS

Cultivar três cepas de *B. henselae*, IAL 3714, IAL 3715 e IAL 3716, isoladas de gatos diferentes, não domiciliados, de Campinas, SP, com diferentes tempos de crescimento, 14 e 28 dias.

Obter espectros de cada cepa e tempo de crescimento para criação de entradas no banco de dados do sistema Microflex MALDI-TOF (Bruker) utilizado na rotina do Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas.

Obter novas colônias das cepas supracitadas, com os mesmos tempos de crescimento, para aquisição de novos espectros e comparação com as entradas no banco de dados previamente obtidas, avaliando a similaridade entre os mesmos através do programa Biotyper (Bruker).

3 METODOLOGIA

3.1 Revisão da literatura

A convite da revista Anais Brasileiros de Dermatologia para publicação de um artigo de Educação Médica Continuada, realizou-se uma revisão da literatura considerando as características gerais das *Bartonella* spp., os principais aspectos e manifestações clínicas, sobretudo cutâneas, das três espécies mais frequentes em bartoneloses humanas, *B. bacilliformis*, *B. quintana* e *B. henselae*, além de aspectos referentes à negligência, emergência, aos desafios diagnósticos, à transmissão, ao tratamento e à prevenção das bartoneloses.

A abordagem utilizada para a elaboração dessa revisão foi a narrativa, que, diferentemente da sistemática, se propõe a uma discussão ampla e contextualizada sobre o assunto, sem uma metodologia específica para a busca de referências que permita a reprodução dos dados ou uma análise quantitativa sobre questões específicas do estudo. Os critérios para a seleção dos trabalhos incluídos na revisão são baseados na interpretação e análise crítica dos autores (68).

Os trabalhos utilizados, publicados nos anos de 1967 a 2017, foram buscados bases de dados como Portal de Periódicos da Capes, *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online* (MEDLINE), *Scientific Electronic Library Online* (SciELO), *PubMed*, *Web of Science*, dentre outras. Para a localização dos artigos utilizaram-se as palavras-chave *Bartonella*, *Bartonellosis*, *Bartonella Infections*, e *Skin Manifestations*. Além disso, foram também incluídos no estudo alguns casos de pacientes atendidos no Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Unicamp, bem como a experiência prática no diagnóstico laboratorial de casos suspeitos realizado pelo

Laboratório de Pesquisa Aplicada em Dermatologia e Infecções por Bartonela da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

3.2 Avaliação da influência do tempo de crescimento na Identificação de cepas de *B. henselae* por MALDI-TOF MS

3.2.1 Amostras bacterianas

Três cepas de *B. henselae* de linhagens diferentes, isoladas de gatos diferentes não domiciliados de Campinas, Brasil, por Drummond et al. (34), foram fornecidas na forma liofilizada pela Coleção de Microrganismos do Instituto Adolfo Lutz (IAL), filiada à *World Federation of Culture Collections* sob o número de registro 292. As cepas foram denominadas com a sigla IAL seguida do número acesso da linhagem correspondente: IAL 3714, IAL 3715 e IAL 3716. A identidade das cepas foi confirmada através da extração do DNA, amplificação por PCR utilizando *primers* específicos para detecção *Bartonella* sp., sequenciamento do material amplificado e obtenção de 100% de similaridade com o genoma completo de *B. henselae* (o número de acesso no GenBank HG969191), conforme previamente descrito (34).

3.2.2 Condições de cultura

O material liofilizado foi descongelado em temperatura ambiente e, em seguida, semeado em meio de cultura sólido com o auxílio de uma alça de inoculação. O meio foi preparado com 6 g de *BDTM Bordet Gengout Agar* em 117 mL de água destilada e 1,167 mL de glicerol, esterilizado, resfriado até 50°C e suplementado com 30% de sangue de carneiro. A incubação foi realizada em frascos para cultura celular com tampa com filtro a 35°C em ambiente úmido e saturado com CO₂ (34), pelos períodos de 14 e 28 dias.

3.2.3 Preparo da amostra

Decorrido o tempo de crescimento estabelecido, duas a três colônias de cada amostra foram coletadas e misturadas em 300 µL de água purificada e esterilizada em um tubo *Eppendorf* de 1,5 mL. Em seguida adicionou-se 900 µL de etanol puro, seguido

de homogeneização por agitação mecânica e centrifugação da suspensão a 12000 RPM por dois minutos. O sobrenadante foi removido e a precipitação em etanol foi repetida. Posteriormente, 50 μ L de ácido fórmico 70% foram adicionados e misturados ao precipitado por agitação. Prosseguiu-se com a adição de 50 μ L de acetonitrila, agitação mecânica e centrifugação por dois minutos a 12000 RPM, reservando-se o sobrenadante (69).

O extrato bacteriano obtido foi depositado (1 μ L) sobre o poço destinado à amostra da placa metálica e aguardou-se a secagem em temperatura ambiente. Em seguida, a amostra foi sobreposta com 1 μ L da matriz HCCA, e a placa foi deixada em temperatura ambiente por alguns minutos para permitir a cocristalização da matriz com a amostra. Finalmente, a placa foi inserida no equipamento para aquisição dos espectros.

Para obtenção das entradas de referência de cada cepa em cada tempo de crescimento, o extrato bacteriano foi depositado sobre oito poços diferentes. Já para obtenção dos espectros das cepas novamente cultivadas, a serem comparados com as entradas de referência, o extrato de cada amostra foi depositado sobre quatro poços diferentes e foram utilizadas pelo menos duas culturas diferentes de cada uma das cepas.

3.2.4 Análises MALDI-TOF MS

As análises de espectrometria de massas foram realizadas no sistema Microflex MALDI-TOF LT (Bruker Daltonics), calibrado diariamente com *Bacterial Test Standard* (BTS, Bruker). O laser de nitrogênio (337 nm) foi operado numa frequência de 60 Hz e os espectros foram adquiridos no modo linear positivo com aceleração de 27 kV.

A aquisição dos espectros foi realizada com o auxílio do programa FlexControl 3.0 (Bruker), numa faixa m/z de 2 a 20 kDa, com 40 disparos de laser em dez posições diferentes da amostra.

As entradas de referência para cada cepa em cada tempo de crescimento foram determinadas a partir da soma de pelo menos 20 espectros obtidos em oito poços diferentes contendo alíquotas da mesma amostra. O programa FlexAnalysis 2.4 (Bruker) foi utilizado para inspeção visual e controle de qualidade. *Outliers* e *flatlines* foram

rejeitados e picos de resolução > 500 foram selecionados dentro da faixa de massas pré-estabelecida.

O programa MALDI Biotyper 3.0 foi utilizado para o armazenamento das entradas de referência no banco de dados e comparação dos espectros obtidos das cepas posteriormente cultivadas com essas entradas. O algoritmo MALDI Biotyper avalia a correspondência entre os espectros comparados por um valor de *score*, numa faixa de 1.0 a 3.0. De acordo com instruções do fabricante, valores de *score* ≥ 2.0 indicam identificação confiável a nível de espécie; valores de *score* ≥ 1.7 e < 2.0 indicam identificação a nível de gênero; e valores de *score* < 1.7 indicam que não houve identificação confiável. A Figura 2 ilustra o desenho experimental do estudo.

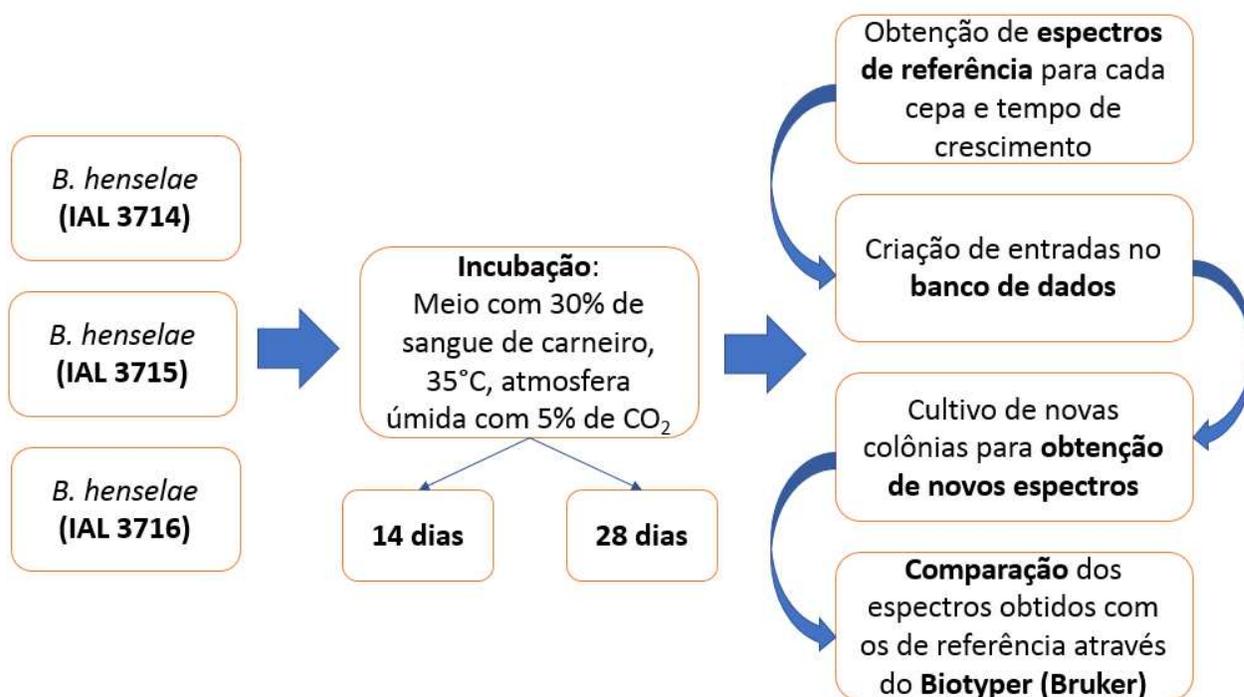


Figura 2. Fluxograma dos procedimentos para avaliação da influência do tempo de crescimento na comparação de espectros de cepas de *B. henselae*.

4 RESULTADOS

De acordo com a deliberação CCPG – 001/98 da Universidade Estadual de Campinas, optou-se pela apresentação da presente dissertação em formato alternativo, em que artigos científicos de autoria do candidato podem constar como resultados do trabalho. A seguir são apresentados, portanto, dois artigos elaborados a partir da proposta deste estudo.

4.1 Artigo 1: Manifestações cutâneas das bartoneloses (*artigo publicado*)

An Bras Dermatol. 2019;94(5):594–602



REVISÃO

Manifestações cutâneas das bartoneloses^{☆☆☆}

Karina de Almeida Lins ^{a,b}, Marina Rovani Drummond ^{a,b}
e Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho ^{b,c,*}

Manifestações cutâneas das bartoneloses

Karina de Almeida Lins^{a,b}, Marina Rovani Drummond^{a,b}, Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho^{b,c}

^a Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, SP, Brasil

^b Laboratório de Pesquisa Aplicada em Dermatologia e Infecção por *Bartonella*, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

^c Disciplina de Dermatologia, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

Resumo

Bartoneloses é o termo utilizado para descrever doenças causadas por qualquer espécie de *Bartonella*. A infecção pode manifestar-se como bacteremia assintomática a quadros potencialmente fatais. Muitas espécies são patogênicas ao homem, mas três são responsáveis pela maioria das manifestações clínicas em seres humanos: *Bartonella bacilliformis*, *Bartonella quintana* e *Bartonella henselae*. A verruga peruana, causada pela *B. bacilliformis*, pode ser indistinguível da angiomatose bacilar causada pelas outras duas espécies. Outras manifestações cutâneas são: exantema maculopapular na febre das trincheiras, pápulas ou nódulos na doença da arranhadura do gato, vasculites (muitas vezes associadas às endocardites). Além dessas, pode ocorrer exantema morbiliforme febril, púrpura, urticária, eritema nodoso, eritema multiforme, eritema marginado, granuloma anular, vasculites leucocitoclásticas, reações granulomatosas e reações angioproliferativas. Considerando o amplo espectro da infecção e as potenciais complicações associadas às *Bartonella* spp., a infecção deveria ser considerada pelos médicos com mais frequência entre diagnósticos diferenciais de condições idiopáticas. Estas doenças são frequentemente negligenciadas por profissionais da saúde e pesquisadores.

Palavras chave: Bartonella. Doenças negligenciadas. Manifestações cutâneas.

Introdução

Bartoneloses é o termo utilizado para descrever doenças causadas por qualquer espécie de *Bartonella*.¹ Elas são negligenciadas, reemergentes e mundialmente distribuídas, afetando principalmente populações em situação de pobreza, com sanitização precária e que tenham contato direto com artrópodes e animais domésticos.^{2,3} A maioria das espécies causa doença zoonótica.^{1,3}

Bartonella spp. são bacilos Gram-negativos, fastidiosos e bem adaptados a uma grande variedade de animais reservatórios, particularmente mamíferos. Essas bactérias são capazes de infectar e sobreviver dentro de eritrócitos. A fase intraeritrocítica proporciona um nicho de proteção para o agente, resultando em infecção prolongada e recorrente.⁴ As bactérias podem também infectar células endoteliais.⁵

A principal forma de transmissão das *Bartonella* spp. é de humanos ou animais infectados para novos hospedeiros por meio de vetores artrópodes sugadores de sangue. A transmissão por meio de arranhaduras de animais tem sido relatada, mas não é garantida, uma vez que pulgas são necessárias para que haja a transmissão entre gatos.^{1,6} Estudos recentes reforçam a hipótese de que essas bactérias possam ser transmitidas por transfusão sanguínea, preocupando pessoas ao redor do mundo, uma vez que atualmente nenhuma ação preventiva é feita contra essa possibilidade.^{3,7-9} Além disso, a infecção assintomática por *Bartonella* sp. já foi detectada em doadores de sangue.^{3,8-18}

As *Bartonella* spp. são responsáveis por um amplo espectro clínico, desde bacteremia assintomática a quadros potencialmente fatais. Embora as manifestações associadas às bartoneloses tenham aumentado bastante nas últimas décadas, os médicos normalmente não consideram a possibilidade de infecção por essas bactérias entre os diagnósticos diferenciais, exceto nos casos de linfonodomegalia localizada ou endocardites com cultura negativa,^{19,20} o que sugere que as bartoneloses têm sido negligenciadas pela comunidade médica e muitos dos casos não são, desse modo, diagnosticados.

Aspectos clínicos

Dentre as 16 espécies de *Bartonella* que são patogênicas aos seres humanos, três são responsáveis pela maioria das manifestações clínicas: *Bartonella bacilliformis*, *Bartonella quintana* e *Bartonella henselae*.^{5,21}

Até 1993, a *B. bacilliformis* foi considerada a única espécie desse gênero. É o agente etiológico da doença de Carrión, anteriormente conhecida como a única bartonelose. A *B. bacilliformis* é transmitida por fêmeas de *Lutzomyia verrucarum*, endêmicas nas regiões de grandes altitudes dos Andes peruanos e regiões do Equador e Colômbia.

Relatos nas últimas décadas de surtos em regiões de altitude atípica sugerem fortemente potencial de expansão da área epidemiológica. As mudanças climáticas atuais associadas a atividades humanas têm contribuído para o ressurgimento da

infecção e sua expansão para novas áreas. Alterações do clima afetam a distribuição dos vetores e, além disso, fenômenos como o *El Niño* tem provocado o aumento dos níveis de umidade, favorecendo a reprodução dos vetores e a ocorrência de surtos.^{22,23} Alguns estudos realizados com animais para a busca de potenciais novos hospedeiros mostraram que algumas espécies de macacos presentes nas selvas da América do Sul, como o macaco-da-noite (*Aotus infulatus*) são suscetíveis a infecção por *B. bacilliformis*. Esses dados alertam para o risco da expansão doença de Carrión pela possível adaptação de vetores em áreas habitadas por estes animais, que podem atuar como facilitadores para a dispersão em áreas vizinhas às regiões endêmicas, inclusive no Brasil.²⁴

Bifásica, a doença tem uma fase aguda (febre de Oroya) caracterizada por febre, anemia hemolítica e imunodeficiência transitória, e uma fase crônica (verruga peruana) expressa por lesões cutâneas vasoproliferativas.^{1,25}

A fase aguda da doença tem duração de uma a quatro semanas e a gravidade pode variar de leve a fatal. A ausência de tratamento com antibióticos pode levar a uma taxa de mortalidade de até 88%. É decorrente da invasão massiva de eritrócitos e conduz inicialmente a sintomas não específicos como mal-estar, sonolência, cefaleia, calafrios, febre, anorexia e mialgia, que vão tornando o paciente cada vez mais icterico e confuso. Na medida em que a doença progride, um grave quadro hemolítico acompanhado de linfadenopatia e hepatoesplenomegalia se estabelece. O agravamento do caso pode acarretar desconforto respiratório agudo, derrame pericárdico, miocardite, endocardite, delírio, convulsões, coma e falência múltipla de órgãos.^{1,9,25}

Após cerca de dois meses da fase febril aguda (que pode não ocorrer, sobretudo em nativos da região endêmica), aparece a verruga peruana, uma manifestação cutânea eruptiva constituída de lesões angiomatosas, na maioria das vezes muito semelhantes clínica e histologicamente às lesões de angiomatose bacilar (AB). Essas lesões são papulosas, papulotumorais ou nodulares. Aparecem em surtos, predominantemente na face e nas extremidades, e têm de 0,2 a 4cm de diâmetro. Podem persistir por meses ou até anos e ser acompanhadas de febre, dores ósseas e/ou articulares. A gravidade da erupção é variável e parece não estar relacionada ao

tratamento antibiótico prévio. Essa é a fase tecidual da doença de Carrión e é autolimitada.²⁶ Embora não seja fatal, se não tratada, estas lesões persistem como reservatórios do patógeno e como fonte de contágio via vetor. Geralmente é tratada com rifampicina, embora a estreptomicina também seja eficaz e tenha sido a droga de escolha antes de 1975. A verruga peruana não responde ao tratamento com cloranfenicol ou penicilina. Alternativas de tratamento são ciprofloxacina e azitromicina, combinadas com deflazacorte.²⁷ Não deixa cicatrizes, exceto quando as lesões se infectam secundariamente.^{28,29}

Histologicamente, as lesões da verruga peruana mostram proliferação de células endoteliais da vasculatura terminal da derme e subcutâneo. Importante achado é o infiltrado inflamatório, agudo e crônico, mesmo em lesões não ulceradas, que acompanha a presença de *B. bacilliformis* no interstício e no interior das células endoteliais. As lesões podem ter vasos mais diferenciados e ectásicos, clínica e histologicamente semelhantes ao granuloma piogênico. Atipias celulares podem ser encontradas, especialmente em lesões mais sólidas, com luzes inaparentes e células fusiformes que lembram o sarcoma de Kaposi.³⁰

A *B. quintana* foi primeiramente associada à febre das trincheiras (FT), caracterizada por episódios febris recorrentes. Atualmente, relatada em andarilhos, alcoólicos e pacientes com aids nos Estados Unidos e na Europa, a doença tem sido considerada reemergente e responsável por quadros de bacteremia crônica, endocardite e angiomatose bacilar. Os humanos são os únicos reservatórios conhecidos, e a transmissão entre eles se dá pelo piolho do corpo, razão pela qual esse patógeno está fortemente associado a más condições sanitárias e de higiene pessoal.³¹ A doença, também conhecida como febre quintana ou dos cinco dias, tem período de incubação de 15 a 25 dias. A FT pode ser desde assintomática até doença grave. Aproximadamente metade dos infectados tem um quadro gripal de instalação abrupta, sem sintomas respiratórios e de curta duração. Pode ocorrer febre alta e prolongada por semanas. Os sintomas sofrem remissão por vários dias e, após esse período assintomático, pode haver exacerbação clínica paroxística três a cinco vezes, ou mais, em aproximadamente um ano.³⁰ Lesões eritematosas, maculopapulares, de até 1 cm no tronco ocorrem em 80% a

90% dos pacientes.³² Língua saburrosa, enantema conjuntival e dor no aparelho locomotor frequentemente acompanham o quadro.³³

A *B. henselae* é um agente zoonótico que tem nos gatos domésticos o reservatório principal. A transmissão entre os gatos não se dá na ausência de pulgas, embora a transmissão a humanos seja frequentemente associada à arranhadura dos gatos. A figura 1 mostra a arranhadura de gato apresentada por um homem de 28 anos, diabético tipo I, há 3 dias com náuseas e vômitos e há um dia com rebaixamento do nível de consciência. Foi recebido com Glasgow 3 e com sepse de origem desconhecida. Havia duas lesões que sugeriam arranhaduras. A infecção por *Bartonella* sp. foi detectada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional para região do Espaço Interno Transcrito (ITS) a partir de amostra sanguínea.



Figura 1. Lesões provocadas por arranhaduras de gato apresentadas por um homem de 28 anos com infecção por *Bartonella* sp. detectada por PCR.

O contato com gatos é relatado como fator de risco para infecção por *B. henselae*.³⁴ Gatos que vivem em regiões geográficas quentes e úmidas têm um número maior de potenciais vetores e maiores níveis de bacteremia (7%–43%) e de soroprevalência anti-*B. henselae* (4%–81%).^{25,35} Isso sugere que a infecção por *Bartonella* sp. deva ser mais prevalente em países tropicais em desenvolvimento. Em Campinas, SP, Brasil, 90,2% dos gatos envolvidos no estudo apresentou positividade no teste para presença de DNA da *B. henselae* no sangue.³⁶

Além dos gatos, outros animais de estimação que já foram descritos como reservatórios são porquinhos da índia, coelhos e cães.³⁷

Os carrapatos foram comprovados como potenciais vetores,³⁷ e o contato com esses artrópodes foi associado à infecção por *Bartonella* sp. nos doadores de sangue do Hemocentro da Unicamp (Campinas, SP).³⁴

Pacientes imunocompetentes infectados com *B. henselae* podem desenvolver a doença da arranhadura do gato (DAG), que é caracterizada por uma linfadenite regional autolimitada associada à febre.

Para Bass et al.,³⁸ em sua revisão, a incidência da DAG é proporcional à densidade da população de gatos, à idade deles e à exposição dos humanos a esses animais. Os autores também relacionam a incidência da doença à prevalência e ao grau da infestação por pulgas, *Ctenocephalides felis*, a climas quentes e úmidos, relacionados com posição geográfica e sazonalidade, reforçando que a doença seja mais prevalente em regiões tropicais.

A linfadenite é precedida da lesão primária, de poucos dias até várias semanas após a arranhadura ou mordedura do gato, supostamente pela exposição dérmica às bactérias presentes nas fezes das pulgas dos felinos. Esta se caracteriza por uma pápula eritematosa, não pruriginosa, no local do trauma ou numa extremidade deste, quando se trata de arranhadura. Em dois a três dias torna-se vesiculosa e crostosa, permanecendo por alguns dias, evoluindo para uma mácula que pode ter de dois a três meses de duração. A lesão persiste por 7–21 dias ou mesmo permanece durante a linfonodomegalia. Raras vezes, a lesão cutânea é a única expressão clínica, mesmo havendo antecedente da arranhadura ou mordedura. A presença da lesão de inoculação deve ser exaustivamente procurada na história e no exame físico, pois o índice de encontro da lesão primária pode chegar a mais de 90%.²⁵ Após esse período pode haver uma cicatriz superficial, lembrando a cicatriz deixada pela varicela. Seu tamanho é de poucos milímetros a 1 cm de diâmetro.³⁰

A histopatologia das lesões cutâneas simula a dos linfonodos, constituindo-se de formação de granulomas com área necrótica central, circundadas por linfócitos e

histiócitos e com infiltrado neutrofílico. O pus pode estar loculado, o que tem importância durante a aspiração. Difere das demais doenças granulomatosas porque nessas não é comum o encontro de microabscessos e granulomas concomitantemente.³⁹ Os achados histopatológicos em linfonodos podem ser confundidos com aqueles encontrados na doença de Hodgkin, inclusive com células semelhantes às de Reed-Stenberg.⁴⁰ Podem ser observados microabscessos onde clusters bacterianos podem ser identificados pela coloração de Warthin-Starry, sobretudo nas lesões mais novas.²⁶

Púrpura, embora rara, pode ser grave.⁴¹ Exantema maculopapular, eritema multiforme e eritema nodoso são para Warwick⁴² as expressões cutâneas que acompanham a DAG. Para esse autor, o eritema nodoso é o mais frequente deles, no que concorda Carithers,⁴³ que não considera uma surpresa essa associação, já que o eritema nodoso aparece no curso de outras doenças granulomatosas, como tuberculose e sarcoidose. Eritema nodoso pode acontecer associado a quadros típicos, mas usualmente acontece acompanhando linfonodomegalia difusa e não regional.⁴⁴

A. B. henselae também causa um amplo espectro de condições clínicas, como febre de origem indeterminada, manifestações esplênicas e hepáticas, encefalopatias, doenças oculares, endocardites, dentre outras.¹

Pacientes infectados por *B. quintana* ou *B. henselae*, especialmente aqueles imunodeficientes, podem desenvolver angiomatose bacilar, que é caracterizada por lesões angioproliferativas.²¹ Especificamente nos casos de infecção por *B. henselae*, estas lesões podem também ser associadas à peliose, uma rara condição caracterizada por pequenos espaços císticos preenchidos com sangue presentes no fígado, frequentemente diagnosticada apenas por biópsia, podendo causar insuficiência ou ruptura hepática e até mesmo ser fatal.^{21,45} A peliose bacilar pode acometer também outros órgãos.⁴⁶

Lesões cutâneas são a principal manifestação da angiomatose bacilar, mas a doença pode acontecer sem comprometer a pele em até 45% dos casos.⁴⁷ Podem ser lesões solitárias; no entanto, mais frequentemente, são múltiplas e dispersas pelo corpo. Podem ser pápulas, placas, tumores angiomatosos, raramente hiperqueratóticos, ou nódulos com superfície normocrômica. Colarete descamativo da base da lesão é

característico. São semelhantes ao granuloma piogênico. Friáveis, podem sangrar fácil e abundantemente. A apresentação como placas endurecidas e hiperpigmentadas é menos frequente. Há descrições de comprometimento de mucosa oral, anal, conjuntival, gastrointestinal, genital feminina e de vias aéreas. A AB pode ser acompanhada por doença visceral disseminada tanto em imunodeficientes quanto em imunocompetentes.^{38,48,49} A figura 2 mostra o caso de lesão angiomasosa única no terceiro interdígito da mão direita de uma mulher de 26 anos, com febre, candidíase oral e emagrecimento há dois meses. A sorologia anti-HIV foi reagente. O exame anátomo-patológico foi compatível com angiomatose bacilar e à coloração de Warthin-Starry observaram-se *clumps* bacterianos. Bacilos Gram-negativos foram observados por microscopia eletrônica de transmissão de fragmento cutâneo.

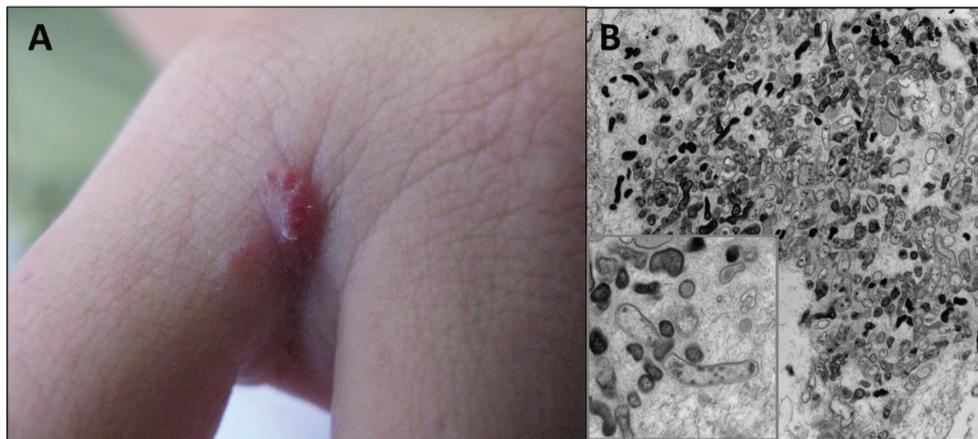


Figura 2. Angiomatose bacilar: A, Lesão angiomasosa única no terceiro interdígito da mão direita de mulher; B, Microscopia eletrônica de transmissão de fragmento cutâneo com inúmeros bacilos Gram-negativos de distribuição intra e extracelular ($\times 1.200$, inset $\times 16.000$).

O diagnóstico diferencial com sarcoma de Kaposi pode ser clinicamente impossível, sobretudo com lesões sarcomatosas recentes. As duas doenças podem coexistir. Quaisquer outras lesões angiomasosas fazem diagnóstico diferencial.^{26,30}

Histologicamente são expressas por três características principais: 1) angioproliferação disposta em lóbulos, com vasos formados por células endoteliais proeminentes; em áreas de celularidade mais densa, podem ser observadas atipias e

mitoses; 2) predomínio de neutrófilos no infiltrado celular e ocasional leucocitoclasia; 3) presença de *clumps* bacterianos intersticial ou intracelular encontrados à coloração de Warthin-Starry, imuno-histoquímica, à microscopia eletrônica de transmissão ou microscopia confocal.^{26,30,50}

Foi aventado que a diferença entre a resposta angiogênica e granulomatosa, observadas na AB e na DAG, respectivamente, parece ser determinada pelo grau de imunocompetência do hospedeiro.^{51,52} A concomitância de lesões com características clínico-patológicas da DAG e da AB, também relatada após o uso de corticosteroides, com a demonstração de um mesmo agente, colabora com a essa interpretação.⁵³

As *Bartonella* spp. podem causar bacteremia cíclica assintomática em humanos e animais. Essa infecção crônica pode resultar potencialmente em endocardite e ser fatal.¹ Cerca de 31% das endocardites são cultura-negativa e, dessas, até 30% são causadas por *Bartonella* spp.²⁰ Seis espécies de *Bartonella* foram associadas à endocardite, mas 95% das endocardites por esses agentes são causadas por *B. quintana* ou *B. henselae*.⁵⁴ Vasculites podem acontecer e, inclusive, simular quadros de vasculite sistêmica com positividade de ANCA (anticorpo anticitoplasma de neutrófilos) (fig. 3).⁵⁵ A figura 3 mostra um caso de vasculite cutânea apresentada por um homem branco de 42 anos, com antecedente de arranhadura de gato e febre há 2 meses. As lesões cutâneas apareceram nas pernas duas semanas antes. O diagnóstico de endocardite por *B. henselae* foi confirmado por sorologia, PCR e cultura.



Figura 3. Vasculite cutânea na perna de um homem de 42 anos com antecedente de arranhadura de gato e febre com diagnóstico de endocardite por *B. henselae* confirmada por PCR, sorologia e cultura.

A *B. henselae* pode causar inflamação hepática inespecífica e crônica em adultos e crianças. Também pode ser responsável por angiomatose e peliose bacilar no fígado, além de hepatite granulomatosa, com ou sem necrose. As *Bartonella* spp. não são incluídas em diretrizes para triagem de hepatites criptogênicas e é possível que parte dos 40% de casos de hepatite de novo que ocorrem depois de transplante hepático estejam relacionados a infecção por essas bactérias.⁵⁶

Muitas vezes identificadas como expressão clínica de DAG atípica, formas não clássicas da doença devem ser consideradas separadamente. Exantema morbiliforme, urticária, eritema marginado, granuloma anular, vasculite leucocitoclástica^{32,41} são descritos. A figura 4 mostra um caso de granuloma anular apresentado por mulher de 52 anos que referia lesão semelhante à da imagem no local de uma arranhadura de gato no antebraço esquerdo sete anos antes. As lesões se disseminaram. Apresentava mialgia e artralgia intensas que dificultavam a deambulação. Na tomografia torácica e abdominal havia linfonodomegalia múltipla mediastinal e retroperitoneal. Estava em uso de deflazacorte 7,5 mg/d, metotrexato 15 mg/semana e hidroxiclороquina 400 mg/d há 2 anos com diagnóstico de sarcoidose. O exame anatomopatológico da pele era compatível com granuloma anular. O DNA de *B. henselae* foi amplificado em fragmento de linfonodo mediastinal e no sangue da paciente.



Figura 4. Granuloma anular apresentado por uma mulher de 52 anos. O DNA de *B. henselae* foi amplificado em fragmento de linfonodo mediastinal e no sangue da paciente.

Paniculite piogranulomatosa foi descrita em um cão cujo dono tinha lesões semelhantes. Ambos melhoraram com tratamento para infecção por *Bartonella* sp.⁵⁷ Os autores acompanharam uma mulher de 32 anos, com paniculite esclerosante com reação granulomatosa à histologia na perna direita e história de anemia recorrente de origem desconhecida, dependente de corticosteroide há 4 anos. Apresentou microscopia eletrônica com bactérias Gram-negativas dentro de um eritrócito. Teve boa evolução com tratamento com eritromicina. Com a suspensão do antibiótico após seis semanas, as lesões recorreram e não responderam mais à antibioterapia. A paciente teve posteriormente pesquisa do DNA de *B. henselae* positiva em amostra sanguínea (fig. 5).



Figura 5. Paniculite esclerosante na perna direita de uma mulher de 32 anos com histórico de anemia recorrente com origem desconhecida. A paciente teve posteriormente pesquisa do DNA de *B. henselae* positiva no sangue.

As manifestações cutâneas podem aparecer associadas ou não à manifestação granulomatosa do fígado, baço, coração, ossos e linfonodos mesentéricos e/ou mediastinais.³⁰

Um crescente número de possíveis manifestações parainfecciosas ou pós-infecciosas imunes têm sido descritas em associação com a infecção por *Bartonella* spp..⁴¹ Considerando o amplo espectro da infecção e as potenciais complicações

associadas às *Bartonella* spp., a infecção deveria ser considerada pelos médicos com mais frequência entre diagnósticos diferenciais de condições idiopáticas. Na tabela 1 estão listadas condições que deveriam incluir a infecção por *Bartonella* sp. como diagnóstico diferencial.

Tabela 1. Manifestações idiopáticas potencialmente associadas à infecção por *Bartonella* spp.

Febre prolongada
Anemia recorrente ou grave
Hepatite
Serosite
Linfonodopatia crônica
Fadiga crônica
Uveíte
Retinite
Neurite
Exantema maculopapuloso febril
Púrpura
Urticária
Eritema nodoso
Eritema multiforme
Eritema marginado
Granuloma anular
Vasculites leucocitoclásticas
Reações granulomatosas
Reações angioproliferativas

Possibilidade de transmissão por transfusão sanguínea

Uma vez que as *Bartonella* spp. podem causar infecção assintomática, a extensão da infecção pode estar sendo subestimada. A soroprevalência global para *Bartonella* sp. em humanos varia de 1,5% a 77,5%.⁵⁸ Em estudo com 437 pacientes saudáveis da zona rural do Brasil, em Piau (MG), a soroprevalência foi de 12,8% para *B.*

quintana e 13,7% para *B. henselae*.⁵⁹ Em outro estudo, realizado com 125 doadores de sangue no Rio de Janeiro (RJ), 43 (34,4%) foram soropositivos para *B. henselae*.¹³

Hospedeiros assintomáticos com infecção eritrocitária podem doar sangue. Em um estudo recente com 500 doadores de sangue de Campinas (SP), anticorpos anti-*B. quintana* e *B. henselae* foram detectados em 32,0% (136/500) e 16,2% (78/500) dos doadores, respectivamente. O mesmo estudo encontrou 3,2% dos doadores de sangue com infecção sanguínea para *Bartonella* spp. e em 1,2% deles a bacteremia por *B. henselae* foi documentada com isolados obtidos a partir do sangue doado.³

A transfusão de sangue representa um risco potencial para transmitir essas bactérias. Gatos foram experimentalmente infectados com *B. henselae* e *Bartonella clarridgeiae* por inoculação intravenosa e intramuscular com sangue de gatos conhecidamente infectados.⁶⁰ Além da transmissão em gatos, a transmissão transfusional foi documentada em camundongos imunocompetentes.⁷ Um estudo que usou microscopia eletrônica de transmissão e cultura documentou a capacidade de a *B. henselae* sobreviver em sangue estocado a 4°C por 35 dias.⁶¹ Existem dois relatos de transmissão da infecção a humanos por punctura percutânea acidental com sangue contaminado.^{62,63} A real prevalência global entre doadores de sangue não é conhecida, e uma triagem do sangue doado não é rotineiramente feito para esses patógenos.

Diagnóstico laboratorial

Não existe um diagnóstico laboratorial padrão ouro para as infecções causadas por *Bartonella* spp.. É cada vez mais claro que nenhum método diagnóstico disponível atualmente confirmará a infecção com *Bartonella* sp. em todos os pacientes imunocompetentes infectados, uma vez que esse grupo apresenta baixa bacteremia, o que dificulta ainda mais a detecção.¹⁹ Essa dificuldade do diagnóstico laboratorial é outro fator que contribui para a negligência em relação a esse patógeno. Hoje é evidente a necessidade de combinação de várias técnicas para diminuir resultados falso-negativos.^{3,64} Os diagnósticos laboratoriais mais utilizados são sorologia por imunofluorescência indireta (IFI), cultura ou PCR.⁶⁵⁻⁶⁷

A IFI é o método diagnóstico mais utilizado por causa de sua simplicidade. Entretanto, os métodos imunológicos apresentam algumas limitações, como a reação cruzada entre as espécies e com diversos patógenos, o que acarretaria falso-positivos. A possibilidade de falso-negativos também existe, uma vez que os antígenos de *kits* comerciais são restritos a poucas espécies.^{68,69} Outros fatores que devem ser considerados são a heterogeneidade entre as cepas e genótipos de *Bartonella* spp., as diferenças de parâmetros de análise entre laboratórios e a subjetividade das leituras dos resultados de IFA. Vários trabalhos demonstram que não há correlação entre PCR e sorologia positiva.⁶⁴ Em geral, o teste sorológico não deve ser utilizado como única ferramenta diagnóstica e, em caso de positividade, deve ser interpretado apenas como uma exposição anterior à *Bartonella* sp.. O teste sorológico deve ser utilizado em conjunto com outras técnicas, como cultura e PCR, para garantir a fidelidade do diagnóstico.⁷⁰

O uso de técnicas microbiológicas convencionais para detectar e isolar as *Bartonella* spp. é pouco eficiente devido à natureza fastidiosa dessas bactérias, ao baixo número de bactérias circulantes em organismos infectados e à bacteremia cíclica. O isolamento requer um longo tempo de incubação (de seis a oito semanas) e condições especiais de crescimento (meios de cultura especiais, enriquecidos com sangue além de 35°C, em atmosfera saturada de água e contendo 5% de CO₂).^{35,71,72} Raramente se obtém sucesso no isolamento primário em hospedeiros não reservatórios e/ou imunocompetentes, assim como em humanos com DAG.⁷¹⁻⁷⁴ A cultura líquida de *Bartonella* spp. aumenta a sensibilidade de detecção da infecção por essas bactérias por métodos moleculares.^{72,73,75}

Não existe um consenso sobre os melhores *primers* e condições a serem usadas na PCR para detecção de DNA de *Bartonella*. Além dos *primers* que determinam a região a ser amplificada e, portanto, a sensibilidade da reação, a técnica da PCR escolhida também influencia no sucesso do diagnóstico. A PCR de dupla amplificação pode aumentar muito a sensibilidade da detecção, assim como a PCR em tempo real.^{35,67,75,76} As vantagens dos métodos diagnósticos moleculares, como a PCR, são a rapidez do resultado e a possibilidade de identificação da espécie causadora da infecção.⁷⁷ Por outro lado, existem limitações como a possibilidade de resultados falso-

positivos (por contaminação de amostras anteriormente positivas) ou resultados falso-negativos (por terem quantidade de DNA inferior ao limite de detecção). Além disso, encontrar o DNA do patógeno na amostra não prediz, com garantia total, uma infecção ativa.^{78,79}

A histologia não é frequentemente utilizada como método diagnóstico, mas pode ter grande utilidade para casos de angiomatose bacilar, verruga peruana e DAG ou quando há comprometimento tecidual, mesmo que extracutâneo. Os achados histopatológicos cutâneos foram descritos anteriormente.

Terapêutica

Não existe esquema terapêutico que garanta a erradicação das bartonelas do organismo. Isso pode ser mais facilmente demonstrado pelo aparecimento de verruga peruana mesmo em pacientes tratados com antibióticos durante a febre de Oroya. Por outro lado, o tratamento antimicrobiano não altera a taxa de cura em pacientes com linfadenomegalia causada por *Bartonella* spp..⁸⁰

Como não existem revisões sistemáticas sobre o assunto, as decisões de tratamento são baseadas em relatos de casos que testam um número limitado de pacientes. Pacientes com doença sistêmica causada por *Bartonella* spp. devem ser tratados com gentamicina e doxiciclina, mas cloranfenicol tem sido proposto para o tratamento no caso de bacteremia causada por *B. bacilliformis* (doença de Carrión). A gentamicina em combinação com doxiciclina é considerada o melhor tratamento para endocardite e FT, e a rifampicina ou a estreptomicina podem ser também usadas para tratar a verruga peruana.⁵ A eritromicina é o antibiótico de escolha nos casos de AB e peliose hepática e deve ser administrado por no mínimo dois meses.¹

Prevenção

Como mencionado previamente, o contato com gatos é o maior fator de risco para a transmissão da DAG e outras bartoneloses. Infestações por pulgas, livre acesso à rua e ambientes com muitos gatos são fatores que aumentam a possibilidade de infecção dos felinos. Os proprietários de gatos devem, portanto, evitar a infestação por pulgas, mantê-los dentro de casa e afastados de gatos sem domicílio. O Conselho

Consultivo Europeu sobre Doenças do Gato sugere que pessoas imunodeficientes adotem gatos com mais de um ano, sem pulgas, em boa saúde, e que não sejam provenientes de abrigos ou casas com múltiplos gatos.⁸¹ Para prevenir a FT, as pessoas devem evitar o contato com piolhos do corpo e melhorar os hábitos de higiene pessoal. A doença de Carrión pode ser prevenida pelo uso de repelentes e de roupas que protejam da picada de flebótomos nas áreas onde a doença é endêmica.⁸²

Além desses métodos preventivos relevantes, a divulgação de informação sobre a infecção por *Bartonella* sp. à população médica e à comunidade em geral é necessária para evitar a ocorrência de bartoneloses. Negligenciar a doença certamente contribui para a disseminação da infecção e de casos não tratados adequadamente ao redor do mundo.

Conclusão

As bartoneloses são associadas a um amplo espectro de sintomas, condições debilitantes e desfecho potencialmente fatal. Ectoparasitas são envolvidos na transmissão das *Bartonella* sp.. Essas doenças são frequentemente negligenciadas por profissionais da saúde e pesquisadores. A infecção pode ser assintomática e pode ter um potencial impacto na morbidade, por exemplo, em pacientes com hanseníase (como desencadeantes de reações hansênicas do tipo 2), pacientes com anemia falciforme (associado a crises dolorosas por vaso-oclusão) e hepatite ou cirrose criptogênica. O diagnóstico é desafiador porque os médicos não consideram a possibilidade de bartoneloses e, quando isso acontece, há limitações técnico-laboratoriais para um diagnóstico conclusivo. Deveria haver incentivo para mais pesquisas relacionadas à infecção por *Bartonella* spp.. Há limitados recursos para a pesquisa por esses agentes, uma vez que as bartoneloses não constam nem mesmo da lista de doenças negligenciadas da Organização Mundial da Saúde.⁸³ Mas essas doenças possivelmente podem ser controladas, prevenidas e até mesmo erradicadas usando medidas factíveis e efetivas.

Suporte financeiro

Bolsa de doutorado CNPq 159717/2013-2 (Drummond, MR); Bolsa produtividade CNPq 301900/2015-9 (Velho, PENF).

Contribuição dos autores

Karina de Almeida Lins: Aprovação da versão final do manuscrito; concepção e planejamento do estudo; elaboração e redação do manuscrito; revisão crítica da literatura; revisão crítica do manuscrito.

Marina Rovani Drummond: Aprovação da versão final do manuscrito; elaboração e redação do manuscrito; revisão crítica da literatura; revisão crítica do manuscrito.

Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho: Aprovação da versão final do manuscrito; concepção e planejamento do estudo; elaboração e redação do manuscrito; revisão crítica da literatura; revisão crítica do manuscrito.

Conflito de interesses

Nenhum.

Referências

1. Maguina C, Guerra H, Ventosilla P. Bartonellosis. Clin Dermatol. 2009;27(3):271-80.
2. Dujardin JC, Herrera S, do Rosario V, Arevalo J, Boelaert M, Carrasco HJ, et al. Research priorities for neglected infectious diseases in Latin America and the Caribbean region. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(10):e780.
3. Pitassi LHU, Diniz P, Scorpio DG, Drummond MR, Lania BG, Barjas-Castro ML, et al. *Bartonella* spp. Bacteremia in Blood Donors from Campinas, Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(1):12.
4. Pulliainen AT, Dehio C. Persistence of *Bartonella* spp. stealth pathogens: from subclinical infections to vasoproliferative tumor formation. FEMS Microbiol Rev. 2012;36(3):563-99.
5. Angelakis E, Raoult D. Pathogenicity and treatment of *Bartonella* infections. Int J Antimicrob Agents. 2014;44(1):16-25.

6. Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins K, Chi B, Yamamoto K, Roberts-Wilson J, et al. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J Clin Microbiol.* 1996;34(8):1952-6.
7. Silva MN, Vieira-Damiani G, Ericson ME, Gupta K, Gilioli R, Almeida AR, et al. *Bartonella henselae* transmission by blood transfusion in mice. *Transfusion.* 2016;56:1556-1559.
8. Correa FG, Pontes CLS, Verzola RMM, Mateos JCP, Velho P, Schijman AG, et al. Association of *Bartonella* spp. bacteremia with Chagas cardiomyopathy, endocarditis and arrhythmias in patients from South America. *Braz J Med Biol Res.* 2012;45(7):644-51.
9. Pons MJ, Lovato P, Silva J, Urteaga N, Mendoza JD, Ruiz J. Carrion's disease after blood transfusion. *Blood Transfusion.* 2016;14(6):527-30.
10. 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.
11. Ellis DI, Dunn WB, Griffin JL, Allwood JW, Goodacre R. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenomics.* 2007;8(9):1243-66.
12. Minadakis G, Chochlakis D, Kokkini S, Gikas A, Tselentis Y, Psaroulaki A. Seroprevalence of *Bartonella henselae* antibodies in blood donors in Crete. *Scand J Infect Dis.* 2008;40(10):846-7.
13. Lamas CC, Mares-Guia MA, Rozental T, Moreira N, Favacho ARM, Barreira J, et al. *Bartonella* spp. infection in HIV positive individuals, their pets and ectoparasites in Rio de Janeiro, Brazil: Serological and molecular study. *Acta Tropica.* 2010;115(1-2):137-41.
14. Sun JM, Fu GM, Lin JF, Song XP, Lu LA, Liu QY. Seroprevalence of *Bartonella* in Eastern China and analysis of risk factors. *Bmc Infectious Diseases.* 2010;10:4.
15. Mansueto P, Pepe I, Cillari E, Arcoleo F, Micalizzi A, Bonura F, et al. Prevalence of antibodies anti-bartonella henselae in western sicily: children, blood donors, and cats. *J Immunoassay Immunochem.* 2012;33(1):18-25.
16. Noden BH, Tshavuka FI, van der Colf BE, Chipare I, Wilkinson R. Exposure and Risk Factors to *Coxiella burnetii*, Spotted Fever Group and Typhus Group Rickettsiae, and *Bartonella henselae* among Volunteer Blood Donors in Namibia. *Plos One.* 2014;9(9).
17. Aydin N, Bulbul R, Telli M, Gultekin B. Seroprevalence of *Bartonella henselae* and

- Bartonella quintana* in Blood Donors in Aydin Province, Turkey. *Mikrobiyol Bul.* 2014;48(3):477-83.
18. Muller A, Reiter M, Schotta AM, Stockinger H, Stanek G. Detection of *Bartonella* spp. in Ixodes ricinus ticks and *Bartonella* seroprevalence in human populations. *Ticks and Tick-Borne Dis.* 2016;7(5):763-7.
19. Breitschwerdt EB. Bartonellosis: One Health Perspectives for an Emerging Infectious Disease. *Emerging Infectious Diseases Journal.* 2014;55(1):46-58.
20. Edouard S, Nabet C, Lepidi H, Fournier PE, Raoult D. *Bartonella*, a Common Cause of Endocarditis: a Report on 106 Cases and Review. *J ClinMicrobiol.* 2015;53(3):824-9.
21. Harms A, Dehio C. Intruders below the Radar: Molecular Pathogenesis of *Bartonella* spp. *ClinMicrobiol Rev.* 2012;25(1):42-78.
22. Pons MJ, Gomes C, del Valle-Mendoza J, Ruiz J. Carrion's Disease: More Than a Sand Fly-Vectored Illness. *Plos Pathogens.* 2016;12(10).
23. Gomes C, Pons MJ, Mendoza JD, Ruiz J. Carrion's disease: an eradicable illness? *InfectDis Poverty.* 2016;5.
24. Gomes C, Ruiz J. Carrion's Disease: the Sound of Silence. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(1):51.
25. Dehio C. Molecular and cellular basis of *Bartonella* pathogenesis. *Annu Rev of Microbiol.* 2004;58:365-90.
26. Chian CA, Arrese JE, Pierard GE. Skin manifestations of *Bartonella* infections. *Int J Dermatol.* 2002;41(8):461-6.
27. Minnick MF, Anderson BE, Lima A, Battisti JM, Lawyer PG, Birtles RJ. Oroya Fever and Verruga Peruana: Bartonellosis Unique to South America. *Plos Negl Trop Dis.* 2014;8(7).
28. Garcíacaceres U, García FU. Bartonellosis - an immunodepressive disease and the life of Daniel Alcides Carrión. *AmJ Clin Pathol.* 1991;95(4):S58-S66.
29. Alexander B. A review of bartonellosis in Ecuador and Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 1995;52(4):354-9.
30. Velho PENF. Estudo das bartoneloses humanas e da *Bartonella henselae*: infecção experimental, microbiologia, microscopia de luz e eletrônica de transmissão. [tese] Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2001.

31. Foucault C, Brouqui P, Raoult D. *Bartonella quintana* characteristics and clinical management. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(2):217-23.
32. Pierard-Franchimont C, Quatresooz P, Pierard GE. Skin diseases associated with *Bartonella* infection: Facts and controversies. *Clin Dermatol.* 2010;28(5):483-8.
33. Maurin M, Raoult D. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* infections. *ClinMicrobiol Rev.* 1996;9(3):273-+.
34. Diniz PP, Velho PE, Pitassi LH, Drummond MR, Lania BG, Barjas-Castro ML, et al. Risk Factors for *Bartonella* species Infection in Blood Donors from Southeast Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(3):e0004509.
35. Guptill L. Feline Bartonellosis. *Vet Clin North AmSmall Anim Pract.* 2010;40(6):1073.
36. Drummond MR, Lania BG, Diniz P, Gilioli R, Demolin DMR, Scorpio DG, et al. Improvement of *Bartonella henselae* DNA Detection in Cat Blood Samples by Combining Molecular and Culture Methods. *J Clin Microbiol.* 2018;56(5).
37. Mazur-Melewska K, Mania A, Kemnitz P, Figlerowicz M, Sluzewski W. Cat-scratch disease: a wide spectrum of clinical pictures. *Postepy Dermatol Alergol.* 2015;32(3):216-20.
38. Bass JW, Vincent JM, Person DA. The expanding spectrum of *Bartonella* infections:II. Cat-scratch disease. *Pediatr Infect Dis J.* 1997;16(2):163-79.
39. Shessarenko N. Doença da arranhadura do gato: aspectos clínico-epidemiológicos e laboratoriais em 38 pacientes.[dissertação] São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 1998.
40. Guccion JG, Gibert CL, Ortega LG, Hadfield TL. Cat scratch disease and acquired immunodeficiency disease: Diagnosis by transmission electron microscopy. *Ultrastruct Pathol.* 1996;20(3):195-202.
41. Chaudhry AR, Chaudhry MR, Papadimitriou JC, Drachenberg CB. *Bartonella henselae* infection-associated vasculitis and crescentic glomerulonephritis leading to renal allograft loss. *Transpl Infect Dis.* 2015;17(3):411-7.
42. Warwick WJ. The cat-scratch syndrome, many diseases or one disease? *Prog Med Virol.* 1967;9:256-301.
43. Carithers HA. Cat-scratch disease. An overview based on a study of 1,200 patients. *Am J Dis Child.* 1985;139(11):1124-33.

44. Schattner A, Uliel L, Dubin I. The cat did it: erythema nodosum and additional atypical presentations of *Bartonella henselae* infection in immunocompetent hosts. *BMJ Case Rep.* 2018;2018.
45. Wang SY, Ruggles S, Vade A, Newman BM, Borge MA. Hepatic rupture caused by peliosis hepatis. *J Pediatr Surg.* 2001;36(9):1456-9.
46. Tsokos M, Erbersdobler A. Pathology of peliosis. *Forensic Sci Int.* 2005;149(1):25-33.
47. Mohle-Boetani JC, Koehler JE, Berger TG, LeBoit PE, Kemper CA, Reingold AL, et al. Bacillary angiomatosis and bacillary peliosis in patients infected with human immunodeficiency virus: clinical characteristics in a case-control study. *Clin Infect Dis.* 1996;22(5):794-800.
48. Loutit JS. *Bartonella* infections. *Curr Clin Top Infect Dis.* 1997;17:269-90.
49. Cockerell CJ, LeBoit PE. Bacillary angiomatosis: a newly characterized, pseudoneoplastic, infectious, cutaneous vascular disorder. *J Am Acad Dermatol.* 1990;22(3):501-12.
50. 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.
51. Kemper CA, Lombard CM, Deresinski SC, Tompkins LS. Visceral bacillary epithelioid angiomatosis: possible manifestations of disseminated cat scratch disease in the immunocompromised host: a report of two cases. *Am J Med.* 1990;89(2):216-22.
52. Tompkins LS. Rochalimaea infections. Are they zoonoses? *Jama.* 1994;271(7):553-4.
53. Schlossberg D, Morad Y, Krouse TB, Wear DJ, English CK, Littman M. Culture-proved disseminated cat-scratch disease in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Intern Med.* 1989;149(6):1437-9.
54. Spach DH. Endocarditis caused by *Bartonella*. [Publicação On-line]; 2005 [Acesso em 06 jan 2019]. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/endocarditis-caused-by-bartonella>
55. Teoh LSG, Hart HH, Soh MC, Christiansen JP, Bhally H, Philips MS, et al. *Bartonella henselae* aortic valve endocarditis mimicking systemic vasculitis. *BMJ Case Rep.* 2010;2010:bcr0420102945
56. Velho P, Ericson ME. Cryptogenic Hepatitis and Bartonellosis. *Dig Dis Sci.*

2012;57(4):1107-8.

57. Rossi MA, Balakrishnan N, Linder KE, Messa JB, Breitschwerdt EB. Concurrent *Bartonella henselae* infection in a dog with panniculitis and owner with ulcerated nodular skin lesions. *Vet Dermatol.* 2015;26(1):60-3, e21-2.
58. Lamas C, Curi A, Boia MN, Lemos ERS. Human bartonellosis: seroepidemiological and clinical features with an emphasis on data from Brazil - A review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz.* 2008;103(3):221-35.
59. da 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(8):853-9.
60. Abbott RC, Chomel BB, Kasten RW, FloydHawkins KA, Kikuchi Y, Koehler JE, et al. Experimental and natural infection with *Bartonella henselae* in domestic cats. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1997;20(1):41-51.
61. Magalhaes RF, Pitassi LHU, Salvadego M, de Moraes AM, Barjas-Castro ML, Velho P. *Bartonella henselae* survives after the storage period of red blood cell units: is it transmissible by transfusion? *Transfus Med.* 2008;18(5):287-91.
62. 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.
63. Oliveira AM, Maggi RG, Woods CW, Breitschwerdt EB. Suspected needle stick transmission of *Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffii* to a veterinarian. *J Vet Intern Med.* 2010;24(5):1229-32.
64. 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.* 2011;71(4):430-7.
65. Vermeulen MJ, Verbakel H, Notermans DW, Reimerink JH, Peeters MF. Evaluation of sensitivity, specificity and cross-reactivity in *Bartonella henselae* serology. *J Med Microbiol.* 2010;(59 Pt 6):743-5.
66. 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(1):8-30.
67. Guptill L. Bartonellosis. *Vet Microbiol.* 2010;140(3-4):347-59.
68. Parra E, Segura F, Tijero J, Pons I, Nogueras MM. Development of a real-time PCR for *Bartonella* spp. detection, a current emerging microorganism. *Mol Cell Probes.* 2017;32:55-9.
69. Dalton MJ, Robinson LE, Cooper J, Regnery RL, Olson JG, Childs JE. Use of *Bartonella* antigens for serologic diagnosis of cat-scratch disease at a national referral center. *Arch Intern Med.* 1995;155(15):1670-6.
70. Breitschwerdt EB. Bartonellosis, One Health and all creatures great and small. *Vet Dermatol.* 2017;28(1):96-e21.
71. Boulouis HJ, Chang CC, Henn JB, Kasten RW, Chomel BB. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet Res.* 2005;36(3):383-410.
72. Duncan AW, Maggi RG, Breitschwerdt EB. A combined approach for the enhanced detection and isolation of *Bartonella* species in dog blood samples: Pre-enrichment liquid culture followed by PCR and subculture onto agar plates. *J Microbiol Methods.* 2007;69(2):273-81.
73. Maggi RG, Duncan AW, Breitschwerdt EB. Novel chemically modified liquid medium that will support the growth of seven *Bartonella* species. *J Clin Microbiol.* 2005;43(6):2651-5.
74. Okaro U, Addisu A, Casanas B, Anderson B. *Bartonella* Species, an Emerging Cause of Blood-Culture-Negative Endocarditis. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(3):709-46.
75. Diaz MH, Bai Y, Malaria L, Winchell JM, Kosoy MY. Development of a novel genus-specific real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bartonella* species and genotypes. *J Clin Microbiol.* 2012;50(5):1645-9.
76. Pennisi MG, La Camera E, Giacobbe L, Orlandella BM, Lentini V, Zummo S, et al. Molecular detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in clinical samples of pet cats from Southern Italy. *Res Vet Sci.* 2010;88(3):379-84.
77. Gutierrez R, Vayssier-Taussat M, Buffet JP, Harrus S. Guidelines for the Isolation, Molecular Detection, and Characterization of *Bartonella* Species. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2017;17(1):42-50.
78. Yang S, Rothman RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses,

limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis.* 2004;4(6):337-48.

79. Li H, Tong Y, Huang Y, Bai J, Yang H, Liu W, et al. Complete Genome Sequence of *Bartonella quintana*, a Bacterium Isolated from Rhesus Macaques. *J Bacteriol.* 2012;194:6347.

80. Rolain JM, Brouqui P, Koehler JE, Maguina C, Dolan MJ, Raoult D. Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(6):1921-33.

81. Pennisi MG, Marsilio F, Hartmann K, Lloret A, Addie D, Belak S, et al. *Bartonella* Species Infection in Cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg.* 2013;15(7):563-9.

82. cdc.gov [Internet]. *Bartonella* Infection (Cat Scratch Disease, Trench Fever and Carón's disease) - Prevention. [Acesso em: 06 jan 2019]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/bartonella/prevention/index.html>.

83. World Health Organization. Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: WHO, 2017.

4.2 Artigo 2: A influência do tempo de crescimento na identificação de cepas de *Bartonella henselae* por espectrometria de massas MALDI-TOF (artigo submetido para publicação)

A influência do tempo de crescimento na identificação de cepas de *Bartonella henselae* por espectrometria de massas MALDI-TOF

Karina de Almeida Lins^{1*}, Cristiane Santos Cruz Piveta², Carlos Emilio Levy²,
Alessandra Sussulini³, Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho¹

¹ Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil

² Departamento de Patologia Clínica, Hospital das Clínicas, Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil

³ Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil

Palavras chave: Bartonella. Espectrometria de Massas MALDI-TOF. Diagnóstico.

Resumo

As *Bartonella* spp. são bactérias fastidiosas, gram-negativas e intracelulares facultativas, responsáveis por doenças infecciosas negligenciadas, emergentes, reemergentes e mundialmente distribuídas. Esses patógenos são bem adaptados a reservatórios mamíferos e a transmissão ocorre principalmente por meio de artrópodes sugadores de sangue. Os sintomas podem variar de bacteremia assintomática a condições mais graves, de acordo com o estado imunológico do paciente. A *Bartonella henselae* é a espécie mais comum em infecções humanas e está associada à doença da arranhadura do gato, que é transmitida entre gatos e humanos por meio de pulgas e caracterizada por linfadenopatia regional autolimitada. Pacientes imunodeficientes infectados são vulneráveis a desenvolver complicações fatais. O diagnóstico da infecção por *Bartonella* sp. é um ponto chave para a contenção dessas doenças, mas características como a natureza fastidiosa e a baixa reatividade bioquímica dessas bactérias tornam essa tarefa desafiadora. A combinação de cultura por tempo prolongado e métodos moleculares tem sido utilizada para aumentar a sensibilidade, mas envolve procedimentos caros, demorados e trabalhosos, de modo que alternativas mais eficientes são necessárias. A espectrometria de massa MALDI-TOF surgiu como uma técnica revolucionária para identificar microrganismos de forma mais rápida, fácil e econômica em relação aos métodos convencionais, sendo promissora no estudo de bactérias incomuns e de difícil cultivo como a *Bartonella* sp.. Neste estudo, avaliamos o potencial de MALDI-TOF MS para identificar e distinguir três diferentes cepas de *B. henselae* com diferentes tempos de crescimento, 14 e 28 dias. Observou-se que as cepas com o mesmo tempo de crescimento têm impressões digitais espectrométricas similares e são indistinguíveis, mas as cepas com tempos de crescimento diferentes mostraram incongruências em seus espectros de massas. Sugere-se que a *B. henselae* pode sofrer alterações ultraestruturais durante o período de incubação que podem afetar suas impressões digitais espectrométricas. Uma vez que o tempo de crescimento é um parâmetro de difícil

controle no cultivo dessas bactérias fastidiosas e uma potencial fonte de falhas de identificação na análise por MALDI-TOF MS, entradas no banco de dados de cepas de *B. henselae* com diferentes tempos de crescimento devem ser consideradas para evitar resultados falso-negativos.

Introdução

As instigantes bactérias pertencentes ao gênero *Bartonella* são fastidiosas, gram-negativas, transmitidas por vetores e responsáveis por doenças emergentes e reemergentes no mundo todo [1]. As condições causadas pela infecção por *Bartonella* sp. têm sido descritas há mais de 1000 anos, mas as últimas décadas de pesquisas não têm sido suficientes para elucidar completamente a transmissão e a patologia dessas bactérias furtivas [2]. Insuficientemente estudada em comparação com os microrganismos mais comuns, os desafios clínicos e diagnósticos da *Bartonella* sp. são mais complexos do que se supõe atualmente [1, 3]. Embora as bartoneloses não estejam incluídas entre as 20 condições classificadas como Doenças Negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde, pesquisadores consideram e sugerem sua inclusão, uma vez que essas doenças envolvem condições crônicas e debilitantes que afetam principalmente pessoas que vivem em situação de pobreza, e reforçam a necessidade de pesquisas e esforços em saúde pública para contê-las [4, 5].

As *Bartonella* spp. são patógenos intracelulares facultativos que causam infecção intraeritrocitária recorrente em reservatórios hospedeiros mamíferos, transmitidos principalmente através de artrópodes hematófagos [6]. A maioria das espécies é zoonótica [7]. Os sintomas dependem fortemente da espécie infectante e do estado imunológico do indivíduo, variando de bacteremia assintomática ou doenças autolimitadas a condições mais graves e até mesmo fatais [8].

Entre as espécies de *Bartonella* associadas a doenças humanas, *Bartonella henselae* é a mais comum. Os indivíduos infectados podem desenvolver a doença da arranhadura do gato, uma condição caracterizada por linfadenopatia regional autolimitada, possivelmente acompanhada por sintomas inespecíficos, como febre ou fadiga [3]. Os gatos domésticos são os principais reservatórios e foi comprovado que a transmissão entre os gatos requer a presença de pulgas [9]. O contato com gatos é

considerado um fator de risco e a transmissão para humanos está associada com arranhões ou mordeduras de animais infectados, provavelmente através da inoculação de fezes contaminadas de vetores na pele lesionada [10]. Além das manifestações clássicas, a infecção por *B. henselae* também está relacionada a condições como febre prolongada de origem desconhecida, endocardite, angiomatose bacilar, peliose bacilar, neurorretinite, uveíte, encefalopatia, anemia hemolítica, osteomielite e outras. Pacientes imunodeficientes têm maior probabilidade de desenvolver doenças graves [11].

O diagnóstico de infecção por *Bartonella* sp. tem sido considerado uma tarefa desafiadora. O isolamento dessas bactérias de crescimento lento geralmente requer de uma a seis semanas de incubação em condições específicas, e sua baixa reatividade bioquímica torna inviável a identificação por métodos baseados em características fenotípicas [12]. Por outro lado, os métodos moleculares têm possibilitado uma identificação mais sensível e precisa, mas ainda envolvem procedimentos demorados, caros e trabalhosos [12, 13]. Não existe uma única metodologia padrão ouro e plataformas de múltiplos passos têm sido sugeridas para superar alguns problemas do diagnóstico da infecção por *Bartonella* sp. [14], mas existem limitações e resultados falso-negativos ainda são possíveis; portanto, é necessário o estabelecimento de métodos mais rápidos e precisos.

Nesse contexto, o advento da espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz e tempo de voo (MALDI-TOF MS) revolucionou a rotina de identificação de patógenos microbianos e está progressivamente substituindo os métodos convencionais em laboratórios de microbiologia clínica [15].

A análise MALDI-TOF MS é baseada na comparação de espectros de massas. Um espectro de referência pode ser determinado como uma impressão digital para cada espécie e armazenado em um banco de dados. Assim, a identificação bacteriana é realizada quando um espectro obtido de uma bactéria desconhecida coincide com um espectro de referência. Esse procedimento requer apenas uma pequena quantidade de colônias isoladas e pode ser facilmente realizado imediatamente após a detecção do crescimento. Uma das principais vantagens é a economia de tempo para análise, de 24-48 horas normalmente requeridas na realização de métodos convencionais para menos

de uma hora, o que pode ser decisivo para a vida de pacientes críticos [16]. O método é confiável, reprodutível [17] e econômico [18] e o potencial de identificação bacteriana pode ser melhorado à medida em que mais entradas em bancos de dados são obtidas, incluindo para espécies bacterianas raras, e com atualizações de *software*. Além dos grandes avanços que a MALDI-TOF MS proporcionou, algumas potenciais aplicações como a identificação direta de amostras positivas de hemocultura, tipagem de subespécies e a descoberta de biomarcadores de resistência antimicrobiana também têm sido exploradas [19].

Essa técnica tem se mostrado promissora na identificação de bactérias incomuns e de difícil cultivo, como a *Bartonella* spp. [20, 21]. Um estudo determinou com sucesso um espectro de referência único para cada uma das 20 cepas representando 17 espécies de *Bartonella* analisadas e identificou corretamente 36 de 39 cepas de *Bartonella* sp. testadas a nível de espécie [22], porém, espectros de referência para *Bartonella* spp. não estão disponíveis em bancos de dados comerciais fornecidos pelos fabricantes até o momento. Além disso, o tempo de incubação necessário para a obtenção das colônias não foi considerado naquele estudo. O tempo de crescimento é uma potencial fonte de variações no espectro de massas de um microrganismo [23], o que pode ser problemático para a identificação de bactérias fastidiosas. Portanto, mais estudos sobre o uso de MALDI-TOF MS para identificar cepas de *Bartonella* spp. são necessários.

Neste estudo, o potencial uso da MALDI-TOF MS na investigação da *Bartonella* spp. foi explorado. O poder discriminatório entre três diferentes cepas de *B. henselae* foi avaliado e, devido ao caráter fastidioso dessa bactéria, considerou-se a influência do tempo de incubação na identificação.

Métodos

Três cepas de *B. henselae* isoladas de três gatos diferentes de Campinas, Brasil, foram fornecidas pela Coleção de Microrganismos do Instituto Adolfo Lutz (número de registro no *World Data Center for Microorganisms* 282): IAL 3714, IAL 3715 e IAL 3716. Suas identidades foram previamente confirmadas por amplificação do DNA por PCR e sequenciamento na região 16S rRNA [24]. As cepas foram cultivadas em meio

sólido preparado com 6 g de meio *BD™ Bordet Gengout Agar* em 117 ml de água destilada e 1,167 ml de glicerol e, após esterilização e resfriamento até 50 ° C, suplementação com 30% de sangue de carneiro. A incubação foi realizada a 35 ° C em ambiente enriquecido com CO₂ e umidificado, por 14 e 28 dias.

As análises por MALDI-TOF MS foram realizadas usando o sistema Microflex MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics), calibrado diariamente com *Bruker Bacterial Test Standard* (BTS, Bruker). Considerando a presença e ausência de picos como impressões digitais espectrométricas, os espectros de referência para cada cepa em cada tempo de crescimento foram adquiridos de acordo com os protocolos do fabricante e armazenados em banco de dados. Por fim, as mesmas cepas foram novamente cultivadas para aquisição de novos espectros e comparação com os espectros de referência previamente obtidos por meio de *software*.

Para aquisição de espectros de referência, a extração bacteriana foi realizada preparando-se uma suspensão homogênea de duas ou três colônias isoladas coletadas em 300 µL de água estéril. A suspensão foi precipitada com etanol (900 µL) duas vezes e o precipitado resultante foi tratado com uma mistura de ácido fórmico e acetonitrila. O extrato bacteriano (1 µL) foi aplicado em oito poços de amostra da placa metálica (Bruker) e deixou-se secar em temperatura ambiente. As amostras foram então sobrepostas por 1 µL de solução de matriz, composta de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma) saturado com 2,5% (v/v) de ácido trifluoroacético e 50% (v/v) de acetonitrila, permitindo-se, em seguida, a cocristalização da matriz com a amostra.

O *software* FlexControl 3.0 (Bruker) foi utilizado para aquisição de espectros. A análise foi realizada em uma faixa de m/z de 2000-20000 Da no modo linear positivo. Os espectros resultaram da soma de vários disparos de laser em cinco regiões diferentes da mesma amostra. O *software* FlexAnalysis 2.4 (Bruker) foi utilizado para inspeção visual e controle de qualidade dos espectros obtidos. *Outliers* e *flatlines* foram rejeitados e picos de resolução > 500 foram selecionados. Um espectro de referência foi então determinado utilizando pelo menos 20 espectros obtidos para cada cepa em cada tempo de crescimento.

O *software* Biotyper 3.0 (Bruker) foi usado para a comparação dos espectros das cepas novamente cultivadas com os espectros de referência. Quatro replicatas do extrato bacteriano (obtido conforme descrito anteriormente) das cepas novamente cultivadas foram transferidas diretamente para a placa metálica. Imediatamente após a secagem à temperatura ambiente, 1 μ L de matriz foi adicionado e deixado para secar. A aquisição e análise dos espectros foram então realizadas através do *software*. De acordo com as recomendações do fabricante, a identificação em nível de espécie é obtida quando os espectros de uma cepa teste demonstram a melhor correspondência com um espectro no banco de dados, com um *score* ≥ 2.0 . Valores de *score* ≥ 1.7 e <2.0 são definidos como identificação confiável do gênero, e valores de *score* $<1,7$ indicam que não houve identificação confiável. Os valores de *score* podem variar de 1.0 a 3.0.

Resultados

A Tabela 1 mostra os valores de *score* obtidos a partir das quatro replicatas de cada tipo de cepa de *B. henselae* e tempo de crescimento em comparação com as entradas no banco de dados obtidas anteriormente. As colunas representam os espectros de referência e as linhas representam os espectros das cepas testadas, novamente cultivadas. De maneira geral, valores de *score* > 2 foram obtidos na comparação entre espectros de cepas de *B. henselae* com o mesmo tempo de crescimento, independentemente do tipo. Isso sugere que seus espectros de massa são semelhantes e essas cepas são indistinguíveis por meio dessa técnica. No entanto, quando os espectros das cepas com 14 e 28 dias foram comparados, independentemente do tipo, foram observados valores de *score* inferiores (<2), sugerindo diferenças espectrométricas entre cepas da mesma espécie com tempos de crescimento diferentes.

Tabela 1. Valores de *score* obtidos na análise comparativa pelo Biotyper entre três cepas de *B. henselae* (IAL 3714, IAL 3715 e IAL 3716) com dois tempos de crescimento diferentes (14 e 28 dias).

			Espectros de referência para cepas de <i>B. henselae</i>						
			14 dias			28 dias			
			IAL 3714	IAL 3715	IAL 3716	IAL 3714	IAL 3715	IAL 3716	
Espectros das cepas de <i>B. henselae</i> testadas, novamente cultivadas	14 dias	IAL 3714	2.515	2.276	2.145	1.886	1.556	1,489	
			2.551	2.073	2.202	1.857	1.602	1.731	
			2.529	2.163	2.247	1.783	1.508	1.589	
			2.441	2.150	2.132	1.655	1.170	1.085	
		IAL 3715	2.090	2.678	2.287	1.440	1.747	1.839	
			2.017	2.688	2.406	1.397	1.651	1.658	
	28 dias	IAL 3714	2.037	2.624	2.221	1.147	1.476	1.225	
			1.956	2.546	2.386	1.072	1.037	1.372	
			IAL 3716	2.072	2.288	2.705	1.358	1.433	1.473
				2.147	2.369	2.738	1.477	1.233	1.616
		IAL 3715	2.237	2.379	2.680	1.671	1.346	1.169	
			2.127	2.365	2.682	1.134	1.462	1.593	
28 dias	IAL 3714	1.825	1.093	0.456	2.390	1.923	2.004		
		1.992	1.736	1.572	2.527	2.041	2.082		
		1.905	1.572	1.408	2.451	2.186	2.128		
		1.892	1.674	1.357	2.359	2.026	2.092		
	IAL 3715	1.579	1.384	1.109	1.809	2.018	2.065		
		1.821	1.801	1.711	2.063	2.346	2.273		
IAL 3716	1.862	1.573	1.644	2.137	2.088	2.362			
	1.909	1.354	1.597	2.230	2.265	2.548			
	1.414	0.835	1.354	2.068	2.137	2.231			
	1.569	0.838	1.234	2.033	2.185	2.491			
IAL 3716	1.581	1.170	0.758	1.956	2.177	2.225			
	1.334	0.503	0.641	1.998	2.014	2.226			

As Figuras 1 a 3 mostram a comparação entre os espectros de massas das três cepas de *B. henselae*, com 14 e 28 dias de incubação. Considerando os diferentes tempos de crescimento da mesma cepa, embora alguns picos sejam comuns em ambos os espectros, outros picos estão presentes em um espectro e ausentes no outro, e vice-versa. Essas diferenças podem levar a uma baixa similaridade na análise comparativa do *software* e, conseqüentemente, a possíveis erros de identificação.

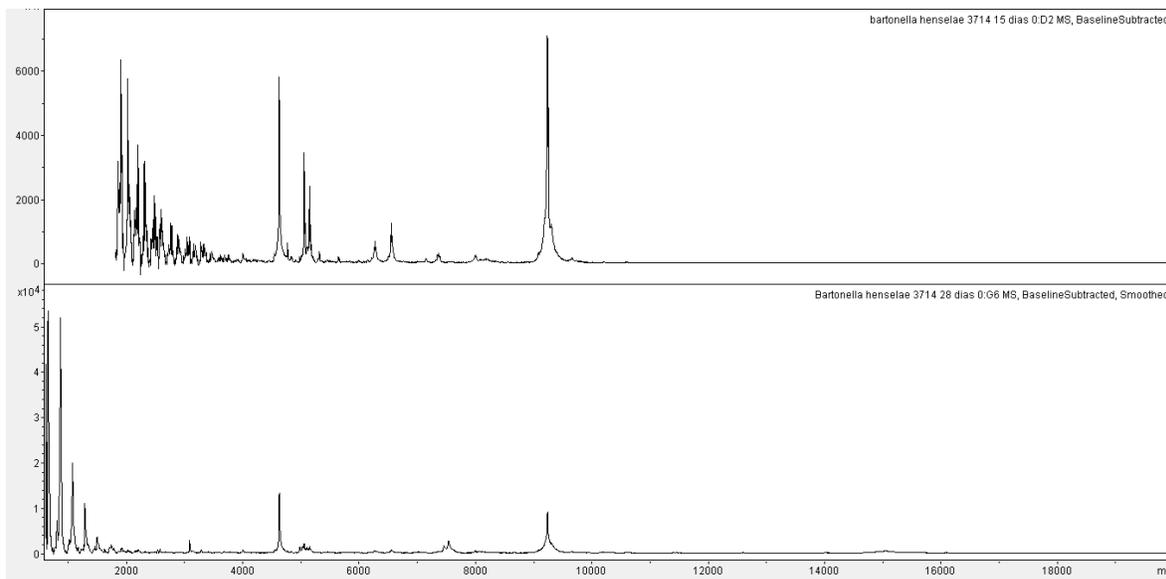


Figura 1. Comparação de espectros de massa de *B. henselae* IAL 3714 cepas com 14 dias e 28 dias de incubação.

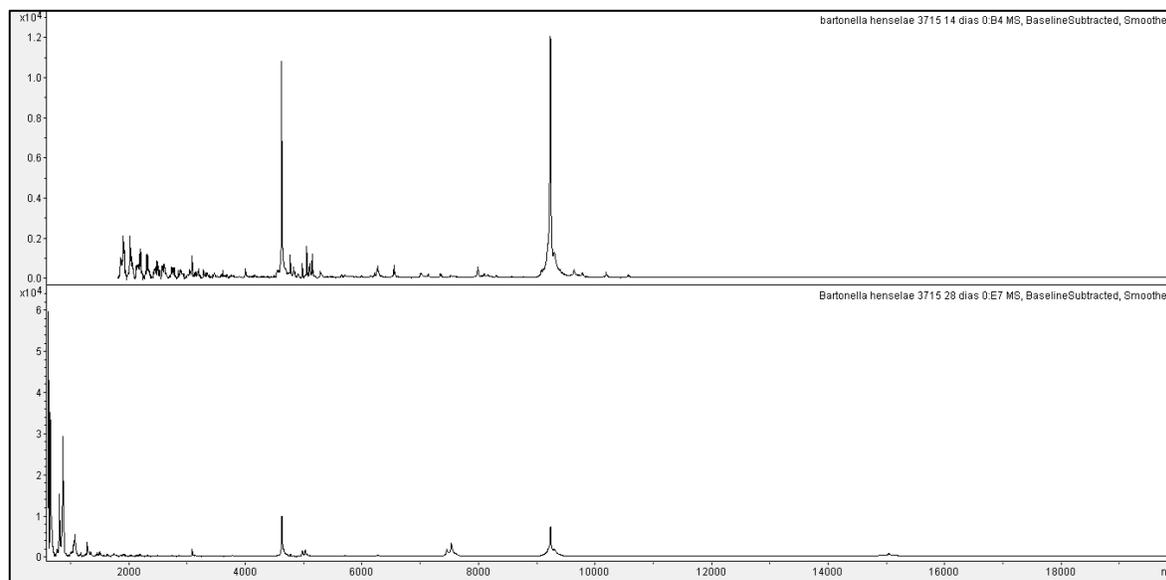


Figura 2. Comparação de espectros de massa de *B. henselae* IAL 3715 cepas com 14 dias e 28 dias de incubação.

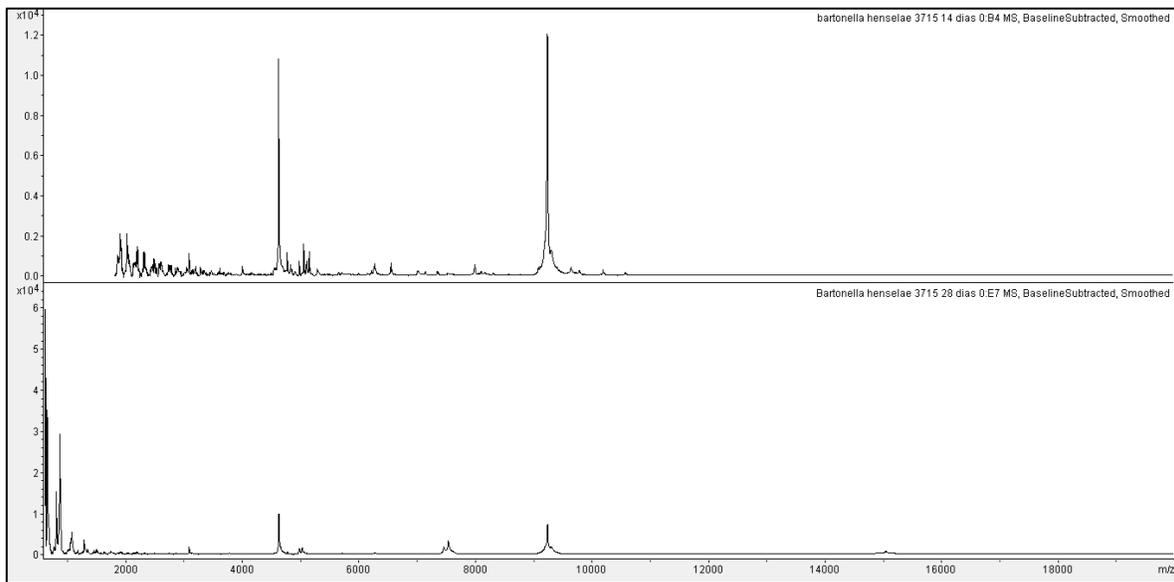


Figura 3. Comparação dos espectros de massa das cepas de *B. henselae* IAL 3716 com 14 dias e 28 dias de incubação.

Discussão

A MALDI-TOF MS mostrou-se uma ferramenta viável para a identificação das cepas testadas de *B. henselae* com inquestionável redução de custos, tempo e mão de obra. Em comparação aos métodos moleculares, que exigiriam extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento genético, demandando de 12 a 24 horas, a MALDI-TOF MS demanda até dez minutos para ser realizada, com um custo médio de dez a 15 vezes menor. O principal custo está na aquisição do equipamento, o que pode ser inviável para alguns laboratórios. Apesar da identificação por MALDI-TOF MS apresentar várias vantagens em relação a identificação molecular de cepas de *B. henselae*, ela ainda exige a obtenção de colônias isoladas, o que pode ser problemático para esse microrganismo exigente. A identificação por MALDI-TOF MS diretamente de hemocultura positiva é uma abordagem promissora e tem sido utilizada com sucesso para algumas bactérias [19], mas esta aplicação precisa de melhorias e não foi relatada para *Bartonella* spp. ainda. Além disso, o sequenciamento do gene 16S rRNA ainda é o padrão ouro para a resolução de ambiguidades e erros de identificação [25].

Fournier et al. [22] já haviam obtido com sucesso espectros de referência MALDI-TOF MS para várias espécies de *Bartonella*, mas apenas o banco de dados do

fabricante é acessível no *software* utilizado, e espectros de referência para *Bartonella* spp. não estavam disponíveis no momento deste estudo. Croxatto et al. [26] relataram que estudos que avaliam o desempenho da identificação de microrganismos de rotina por MALDI-TOF MS mostram que a identificação incorreta está associada principalmente à ausência de espectros de referência em banco de dados. Com base nesses fatos, a inclusão de espectros de referência para bactérias incomuns e / ou negligenciadas, como *Bartonella* spp., em bancos de dados comerciais, pode melhorar a pesquisa e o diagnóstico das infecções causadas por esses patógenos e deve ser considerado pelos fabricantes.

Embora o MALDI-TOF MS tenha se mostrado confiável e reprodutível para identificação bacteriana, sabe-se que algumas variáveis, como o tempo de crescimento da bactéria, podem afetar a reprodutibilidade da análise [23, 26]. Neste estudo, utilizando o mesmo equipamento e procedimentos experimentais, considerando os valores de *score* obtidos pelo *software* Biotyper, observou-se que as diferentes cepas de *B. henselae* testadas com o mesmo tempo de crescimento são indistinguíveis, apresentando impressões digitais espectrométricas similares. Porém, cepas de *B. henselae* com diferentes tempos de crescimento, 14 e 28 dias, apresentaram diferenças significativas em suas impressões digitais espectrométricas, de forma que cepas com 14 dias de crescimento não corresponderam às cepas com 28 dias, independentemente de serem do mesmo tipo ou não. Períodos de incubação prolongados levam à utilização de nutrientes e à produção de resíduos metabólicos, o que podem modificar quimicamente o meio, exigindo que a bactéria se adapte às mudanças ambientais [23]. Diante disso, supõe-se que diferenças espectrométricas entre cepas com diferentes tempos de crescimento podem estar associadas a alterações ultraestruturais da *B. henselae* ao longo dos períodos de incubação, como também pôde ser observado à microscopia eletrônica em linhagens que foram recuperadas após passagens *in vivo* em camundongos [27].

Arnold et al. [23] se propuseram a utilizar MALDI-TOF MS para monitorar o crescimento de uma cultura de *Escherichia coli* periodicamente de 6 a 84 horas. Eles observaram que os espectros de massas podem variar qualitativa e quantitativamente de

acordo com o tempo de crescimento da bactéria, e recomendam fortemente que parâmetros experimentais como o tempo de incubação sejam padronizados para garantir resultados confiáveis. Nossos achados em relação às diferenças espectrométricas entre cepas de *B. henselae* com diferentes tempos de crescimento corroboram este estudo anterior, mas chamamos atenção para o fato de que, diferentemente da *E. coli* e outras bactérias facilmente cultiváveis, o tempo de crescimento não pode ser controlado com precisão para microrganismos fastidiosos como *Bartonella* spp.. Estudos de revisão [16] relatam que a confiabilidade e a precisão da identificação de microrganismos por MALDI-TOF MS são aumentadas em função do aumento da quantidade e qualidade de entradas no banco de dados confiáveis para a mesma espécie. Portanto, sugere-se que entradas de banco de dados de cepas de *Bartonella* spp. com diferentes tempos de crescimento devem ser consideradas para evitar a falha da identificação dessas bactérias fastidiosas.

Em conclusão, os espectros de massas das diferentes cepas de *B. henselae* utilizadas neste estudo, com o mesmo tempo de crescimento, foram indistinguíveis. Por outro lado, os espectros de massas de cepas de *B. henselae* com diferentes tempos de crescimento apresentaram diferenças importantes, o que representa uma preocupação sobre como o tempo de crescimento da cepa pode comprometer a identificação dessa bactéria por MALDI-TOF MS. Entradas em bancos de dados de cepas de *B. henselae* com diferentes tempos de crescimento devem ser consideradas para evitar erros de identificação.

Referências

1. Breitschwerdt EB. Bartonellosis: One Health Perspectives for an Emerging Infectious Disease. *Iilar Journal*. 2014;55(1):46-58. doi: 10.1093/ilar/ilu015. PubMed PMID: WOS:000338127500004.
2. Kaiser PO, Riess T, O'Rourke F, Linke D, Kempf VAJ. *Bartonella* spp.: Throwing light on uncommon human infections. *International Journal of Medical Microbiology*. 2011;301(1):7-15. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.06.004. PubMed PMID: WOS:000289826200002.

3. Harms A, Dehio C. Intruders below the Radar: Molecular Pathogenesis of *Bartonella* spp. *Clinical Microbiology Reviews*. 2012;25(1):42-78. doi: 10.1128/cmr.05009-11. PubMed PMID: WOS:000299137400002.
4. Dujardin JC, Herrera S, do Rosario V, Arevalo J, Boelaert M, Carrasco HJ, et al. Research priorities for neglected infectious diseases in Latin America and the Caribbean region. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(10):e780. Epub 2010/11/05. doi: 10.1371/journal.pntd.0000780. PubMed PMID: 21049009; PubMed Central PMCID: PMC2964298.
5. Hotez PJ, Aksoy S, Brindley PJ, Kamhawi S. What constitutes a neglected tropical disease? *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(1):e0008001. doi: 10.1371/journal.pntd.0008001. PubMed PMID: 31999732.
6. Eicher SC, Dehio C. *Bartonella* entry mechanisms into mammalian host cells. *Cellular Microbiology*. 2012;14(8):1166-73. doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01806.x. PubMed PMID: WOS:000306405000002.
7. Chomel BB, Kasten RW. Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. *J Appl Microbiol*. 2010;109(3):743-50. Epub 2010/02/13. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04679.x. PubMed PMID: 20148999.
8. Angelakis E, Raoult D. Pathogenicity and treatment of *Bartonella* infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;44(1):16-25. Epub 2014/06/17. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.04.006. PubMed PMID: 24933445.
9. Abbott RC, Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, Kikuchi Y, Koehler JE, et al. Experimental and natural infection with *Bartonella henselae* in domestic cats. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1997;20(1):41-51. Epub 1997/01/01. PubMed PMID: 9023040.
10. Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB, Kasten RW, Vayssier-Taussat M, Birtles RJ, et al. Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. *Vet Res*. 2009;40(2):29. Epub 2009/03/17. doi: 10.1051/vetres/2009011. PubMed PMID: 19284965; PubMed Central PMCID: PMC2695021.

11. Florin TA, Zaoutis TE, Zaoutis LB. Beyond cat scratch disease: widening spectrum of *Bartonella henselae* infection. *Pediatrics*. 2008;121(5):e1413-25. Epub 2008/04/30. doi: 10.1542/peds.2007-1897. PubMed PMID: 18443019.
12. Gutierrez R, Vayssier-Taussat M, Buffet JP, Harrus S. Guidelines for the Isolation, Molecular Detection, and Characterization of *Bartonella* Species. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2017;17(1):42-50. Epub 2017/01/06. doi: 10.1089/vbz.2016.1956. PubMed PMID: 28055575.
13. Drummond MR, Gilioli R, Velho PE. Bartonellosis diagnosis requires careful evaluation. *Braz J Infect Dis*. 2010;14(3):217. Epub 2010/09/14. PubMed PMID: 20835501.
14. 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(1):8-30. Epub 2010/03/17. doi: 10.1111/j.1476-4431.2009.00496.x. PubMed PMID: 20230432.
15. Seng P, Rolain JM, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, Raoult D. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol*. 2010;5(11):1733-54. Epub 2010/12/08. doi: 10.2217/fmb.10.127. PubMed PMID: 21133692.
16. Hou TY, Chiang-Ni C, Teng SH. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2019;27(2):404-14. doi: 10.1016/j.jfda.2019.01.001. PubMed PMID: 30987712.
17. Westblade LF, Garner OB, MacDonald K, Bradford C, Pincus DH, Mochon AB, et al. Assessment of Reproducibility of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Bacterial and Yeast Identification. 2015; 53(7):2349-52. doi: 10.1128/JCM.00187-15.
18. Tan KE, Ellis BC, Lee R, Stamper PD, Zhang SX, Carroll KC. Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-bench study for assessing the impact on time to identification and

cost-effectiveness. J Clin Microbiol. 2012;50(10):3301-8. Epub 2012/08/03. doi: 10.1128/jcm.01405-12. PubMed PMID: 22855510; PubMed Central PMCID: PMC3457442.

19. Florio W, Tavanti A, Barnini S, Ghelardi E, Lupetti A. Recent Advances and Ongoing Challenges in the Diagnosis of Microbial Infections by MALDI-TOF Mass Spectrometry. Front Microbiol. 2018;9:1097. doi: 10.3389/fmicb.2018.01097. PubMed PMID: 29896172; PubMed Central PMCID: PMC5986882.

20. Biswas S, Rolain JM. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. J Microbiol Methods. 2013;92(1):14-24. Epub 2012/11/17. doi: 10.1016/j.mimet.2012.10.014. PubMed PMID: 23154044.

21. Ye N, Zhang B, Ling H, Huang Y, Xu Y, Wang Z. Use of MALDI-TOF MS for Rapid Identification of Clinical Bacterial Strains that Are Uncommon or Difficult to Identify. Ann Clin Lab Sci. 2018;48(5):646-53. Epub 2018/10/31. PubMed PMID: 30373871.

22. Fournier PE, Couderc C, Buffet S, Flaudrops C, Raoult D. Rapid and cost-effective identification of *Bartonella* species using mass spectrometry. J Med Microbiol. 2009;58(Pt 9):1154-9. Epub 2009/06/17. doi: 10.1099/jmm.0.009647-0. PubMed PMID: 19528172.

23. Arnold RJ, Karty JA, Ellington AD, Reilly JP. Monitoring the Growth of a Bacteria Culture by MALDI-MS of Whole Cells. 1999;71(10):1990-6. doi: 10.1021/ac981196c.

24. Drummond MR, Lania BG, Diniz PP, Vissotto de Paiva Gilioli R, Demolin DM, Rodrigues Scorpio D, et al. Improvement of *Bartonella henselae* DNA Detection in Cat Blood Samples by Combining Molecular and Culture Methods. J Clin Microbiol. 2018;56(5):e01732-17. doi: 10.1128/jcm.01732-17. PubMed PMID: 29540455.

25. Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, et al. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods With Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. Journal of clinical microbiology. 2010;48(4):1169-75. doi: 10.1128/JCM.01881-09. PubMed PMID: 20164271.

26. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Diagnostic Microbiology. *FEMS microbiology reviews*. 2012;36(2):380-407. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x. PubMed PMID: 22092265.
27. Duarte MI, Oliveira MS, Shikanai-Yasuda MA, Mariano ON, Takakura CF, Pagliari C, et al. Haemobartonella-like microorganism infection in AIDS patients: ultrastructural pathology. *J Infect Dis*. 1992;165(5):976-7. Epub 1992/05/01. PubMed PMID: 1569354.

5 DISCUSSÃO GERAL

Os artigos apresentados como resultados na presente dissertação seguem uma ordem lógica e estratégica. O primeiro artigo, além de contextualizar e descrever as principais manifestações clínicas das bartoneloses humanas, chama atenção para as dificuldades e limitações diagnósticas e a decorrente necessidade de desenvolvimento de metodologias mais eficientes e, diante desta demanda, o segundo artigo apresenta e avalia a MALDI-TOF MS como possível alternativa para o diagnóstico dessas doenças, com potencial de aplicação ainda pouco explorado.

As bartoneloses humanas são descritas na literatura como doenças infecciosas emergentes e complexas, que apresentam um amplo e crescente espectro de sintomas e prevalência entre diferentes mamíferos e potenciais vetores, constituindo-se, para alguns autores, como um problema de saúde pública subestimado (70). O estudo e levantamento das principais manifestações clínicas das bartoneloses e publicação nos Anais Brasileiros de Dermatologia é uma forma de contribuir para o conhecimento sobre essas doenças e, conseqüentemente, aumentar as chances de diagnóstico e tratamento corretos e precoces, o que pode ser decisivo para a vida de pacientes.

Dentre as manifestações cutâneas mencionadas no artigo de revisão, destacam-se a verruga peruana, causada por *B. bacilliformis*, pápulas ou nódulos na doença da arranhadura do gato, causada por *B. henselae*, e angiomatose bacilar, causada por *B. henselae* ou *B. quintana*, mas muitas outras podem estar associadas à infecção por essas bactérias, o que representa um desafio para médicos e pesquisadores. O fato de que as *Bartonella* spp. são capazes de causar diferentes doenças sem nenhum sinal típico em comum, de até mesmo uma única espécie ser capaz de manifestar vários sintomas diferentes e, em outros casos, diferentes espécies provocarem uma única doença, instiga pesquisadores e até mesmo os leva a considerá-las controversas (13). Um estudo exemplifica estes aspectos supostamente contraditórios relatando o caso de uma família em que um mesmo gato infectou diferentes indivíduos que apresentaram características clínicas e evoluções distintas, demonstrando a complexidade dos aspectos clínicos das bartoneloses (71). Para Harms e Dehio (10) as informações a respeito das *Bartonella* spp. estão fragmentadas e pesquisas deveriam

unir o conhecimento disponível de diversas áreas para melhorar a compreensão a respeito dessas doenças na perspectiva *One Health*, isto é, de integração entre saúde humana, animal e ambiental para adoção de medidas de prevenção e controle efetivas nos níveis local, regional, nacional e global. Isso reforça a necessidade de mais pesquisas, revisões e divulgações científicas a respeito das bartoneloses.

Apesar da diversidade e emergência das condições associadas a infecção por *Bartonella* spp., por serem bactérias pouco conhecidas elas raramente são consideradas como hipótese diagnóstica por médicos, o que pode conduzir a terapias antimicrobianas inespecíficas e ineficientes e ao agravamento do estado do paciente (4, 72, 73). Além das manifestações clássicas, essas bactérias podem estar associadas a muitas outras condições graves e idiopáticas que deveriam ser investigadas quanto a possibilidade de bartonelose, como endocardite de cultura negativa, linfadenopatia crônicas, febre de origem desconhecida, anemia e fadiga recorrentes, uveíte crônica e reações granulomatosas ou angioproliferativas de origem indeterminada (39). É importante citar também a hepatite criptogênica como condição possivelmente associada com infecção por *Bartonella* sp., pois existem relatos de pacientes transplantados infectados que podem ter contraído infecção antes da recepção do fígado, através do transplante ou por transfusão sanguínea, de modo que casos de hepatite recorrente podem estar associados com essa doença, e nenhuma triagem preventiva é realizada para transplantes hepáticos (74).

Mesmo quando a infecção por *Bartonella* sp. é considerada como hipótese diagnóstica, as limitações laboratoriais podem levar a conclusões tardias, custosas e até mesmo incertas diante da possibilidade de resultados falso-negativos. Além de representar um grave risco de evolução fatal em casos de pacientes imunodeficientes, a dificuldade de diagnóstico das bartoneloses agrava ainda mais a negligência dessas doenças. Por serem pouco cultiváveis, essas bactérias raramente são detectadas em rotinas comuns de laboratórios de microbiologia clínica e existem poucos laboratórios no mundo capacitados para sua investigação (73). Um estudo recente de revisão sobre as *Bartonella* spp. como uma causa emergente de endocardite, por exemplo, discute o fato de que a hemocultura apresenta uma sensibilidade em torno de 20% na detecção dessas

bactérias, de modo que se tem recorrido principalmente à amplificação do DNA da bactéria presente em tecidos valvulares por PCR (20).

A combinação de métodos moleculares e cultura numa plataforma múltipla para o diagnóstico tem sido apontada como uma estratégia útil para aumentar a sensibilidade do diagnóstico das bartoneloses. Um relato recentemente publicado descreve o caso de um paciente com suspeita de infecção que apresentou sorologia e PCR convencional de sangue total negativas para *Bartonella* sp., porém, PCR *nested* positiva na cultura líquida do sangue e, infelizmente, o paciente veio a óbito dois dias após a obtenção do resultado positivo (73). Esse estudo exemplifica o fato de que não existe necessariamente uma correlação entre os resultados obtidos a partir de diferentes metodologias e reforça a ideia de que a combinação de técnicas aumenta as chances de detecção, porém, a requisição tardia de testes e demora na liberação de um resultado pode conduzir a um desfecho fatal (73). Portanto, mesmo que a combinação de técnicas tenha proporcionado alguns avanços no diagnóstico das bartoneloses, a demanda pelo desenvolvimento de metodologias mais eficientes ainda persiste.

Diante da revolução tecnológica que tem provocado em rotinas de laboratórios de microbiologia clínica, a MALDI-TOF MS demonstra-se um método com grande potencial de aplicação e possíveis melhorias na eficiência do diagnóstico dessas doenças. Nesse contexto, o segundo artigo apresentado descreve que, em comparação a métodos moleculares, considerando a análise da bactéria isolada, MALDI-TOF-MS se mostrou um método mais fácil, rápido e de menor custo para a identificação de *Bartonella* spp. (64). Métodos moleculares envolvem as etapas de extração de DNA, PCR e sequenciamento genético, exigindo no mínimo oito horas de trabalho de um profissional altamente treinado (38), enquanto MALDI-TOF MS requer apenas a deposição do material bacteriano na placa, sobreposição da matriz e inserção da placa no equipamento para aquisição de espectros e comparação com o banco de dados através do programa, o que pode levar cerca de dez minutos. Eventualmente pode ser requerida a etapa de extração de proteínas para otimização dos resultados, aumentando o tempo de análise para cerca de 30 minutos, o que ainda muito inferior ao tempo e complexidade técnica exigidos para na execução de métodos moleculares. Na prática do Hospital das Clínicas

da Universidade Estadual de Campinas, Brasil, onde parte dos experimentos foram realizados, verificou-se que o custo da análise pela MALDI-TOF MS pode ser de dez a 15 vezes menor em relação aos custos envolvidos em métodos moleculares. A maior demanda financeira está na aquisição do equipamento, o que pode ser limitante para alguns laboratórios.

Para Biswas e Rolain, “existem duas etapas no trato com bactérias pouco cultiváveis: crescimento e identificação. A MALDI-TOF MS pode acelerar o segundo passo, mas não o primeiro. Portanto, a identificação ainda será lenta, dependendo do crescimento lento” (59). Em vista disso, o fato de métodos moleculares não demandarem o isolamento em cultura para possível detecção ainda é bastante vantajoso em relação a MALDI-TOF MS.

Nesse contexto, uma possível alternativa para eliminar a necessidade de isolamento na identificação das bactérias por MALDI-TOF MS, seria a realização da análise diretamente da hemocultura. Estudos têm demonstrado identificação correta de diferentes microrganismos presentes em mais de 80% das hemoculturas testadas, variando de acordo com o tipo de microrganismo e o protocolo utilizado para o tratamento da amostra (57). Entretanto, os componentes presentes em uma amostra de hemocultura constituem-na como uma matriz complexa e a possibilidade da presença de mais de um tipo de microrganismo na amostra pode comprometer a análise (53). Também é necessário que a hemocultura tenha uma concentração mínima de colônias para possibilitar a detecção através da técnica (57), o que pode ser limitante em casos de bactérias de crescimento lento. Essa aplicação ainda é bastante desafiadora, e a identificação de *Bartonella* spp. pela MALDI-TOF MS diretamente da hemocultura ainda não foi relatada na literatura. Mais estudos são necessários para avaliar essa possibilidade.

Embora já tenham sido obtidos em estudos prévios (64), entradas com espectros de referência para *Bartonella* spp. não estão disponíveis, até a data deste estudo, no banco de dados comercial fornecido pela Bruker utilizado no experimento. Conforme mencionado anteriormente, falhas de identificação de bactérias são atribuídas, em grande parte, justamente à falta de espectros de referência em bancos de dados (53).

No contexto das bartoneloses, isso contribuí ainda mais para o subdiagnóstico dessas doenças e, portanto, reforça-se a necessidade de entradas com espectros de referência de qualidade para bactérias incomuns, como *Bartonella* spp., em bancos de dados comerciais fornecidos pelos fabricantes.

Apesar de o banco de dados não possuir entradas para espécies de *Bartonella*, o sistema permite a criação de um banco de dados particular para a inserção de espectros de referência por parte do usuário, o que possibilitou a realização desse estudo. Além disso, o fato desses espectros terem sido inseridos no banco de dados do equipamento utilizado no Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Unicamp, um hospital terciário que recebe casos de alta complexidade, abre portas para a possível identificação dessa bactéria a partir de amostras de pacientes investigadas na rotina do hospital.

Quanto a avaliação da influência do tempo de crescimento na identificação de cepas de *B. henselae* por MALDI-TOF MS, os resultados observados foram bastante interessantes. Os valores de *score* obtidos na comparação cepas com o mesmo tempo de crescimento foram ≥ 2 , indicando alta correlação e similaridade entre os espectros, independentemente de serem cepas do mesmo tipo ou não. Cepas diferentes da mesma espécie não apresentaram divergências espectrométricas e foram, portanto, indistinguíveis através dos métodos utilizados no estudo. Por outro lado, os valores de *score* obtidos na comparação de cepas com tempos de crescimento diferentes, independentemente do tipo, foram < 2 indicando baixa correlação e similaridade entre os mesmos. Esses resultados sugerem que o tempo de crescimento pode provocar alterações nas impressões digitais espectrométricas da *B. henselae*, gerando baixos valores de *score* na comparação com entradas de referência em bancos de dados e, conseqüentemente, possível comprometimento na identificação dessas bactérias.

Meios de cultura são ambientes relativamente fechados e possuem uma quantidade limitada de nutrientes. Assim, tempos prolongados de incubação levam ao consumo nos nutrientes e produção de metabólitos que podem alterar o meio, ao qual as bactérias possuem a capacidade de se adaptar rapidamente, o que pode afetar seus espectros de massas (67). Um trabalho de estudo das bartoneloses através de

microscopia eletrônica da *B. henselae* demonstrou que essas bactérias sofrem alterações ultraestruturais em função de diferentes passagens e tempos de crescimento, o que também corrobora com os resultados observados (49).

Considerando que o tempo de crescimento não é um parâmetro facilmente controlável no cultivo dessas bactérias, a inserção de espectros de referência de cepas de *B. henselae* com diferentes tempos de crescimento é sugerida para evitar falhas de identificação. Estudos tem demonstrado que a inserção de entradas em bancos de dados de espectros múltiplos de espécies bem caracterizadas podem aumentar a eficiência de identificação dessa bactérias (53). Além disso, picos comuns a um número mínimo de cepas de uma mesma espécie podem ser utilizados para construir um “super-espectro”, que pode otimizar a identificação dessas espécies (59).

Os resultados obtidos nesse estudo podem contribuir para a melhoria na identificação de cepas de *B. henselae* por MALDI-TOF MS e, possivelmente, para o futuro estabelecimento dessa técnica como uma alternativa com novas possibilidades em relação aos métodos atualmente utilizados.

6 CONCLUSÃO

Constatou-se através da revisão da literatura que as bartoneloses são doenças negligenciadas com um amplo espectro de manifestações clínicas, sobretudo cutâneas, que, por serem pouco conhecidas, são pouco consideradas como hipótese diagnóstica em muitas condições graves a elas associadas. A baixa suspeição leva à solicitação tardia exames diagnósticos específicos que, mesmo quando solicitados, possuem limitações laboratoriais que podem conduzir a resultados falso-negativos, contribuindo para a prescrição de tratamentos inespecíficos e ineficazes e comprometimento progressivo do estado de saúde de pacientes, podendo evoluir para óbito. Com a elaboração e publicação de um artigo de revisão que enfatiza essas questões, contribuiu-se para a necessária divulgação a respeito das bartoneloses e, conseqüentemente, maior consideração dessas doenças por parte de médicos e pesquisadores.

Quanto à avaliação do potencial de identificação das cepas de *B. henselae*, a MALDI-TOF MS revelou-se uma alternativa bastante promissora. Na verificação da influência do tempo de crescimento dessas bactérias em sua identificação, observou-se que isolados *B. henselae* com o mesmo tempo de crescimento, independentemente das cepas, apresentam espectros de massas similares quando comparados pelo programa e, portanto, são indistinguíveis por MALDI-TOF MS. Porém, cepas com tempos de crescimentos diferentes apresentaram diferenças qualitativas e quantitativas em seus espectros de massas, os quais apresentaram baixa similaridade quando comparados através do programa. Portanto, o tempo de crescimento é uma fonte de alterações nas impressões digitais espectrométricas dessas bactérias e, conseqüentemente, pode contribuir para falhas de identificação. Os resultados obtidos neste estudo contribuem para o conhecimento e possível futuro estabelecimento da MALDI-TOF MS como uma alternativa na identificação de cepas de *Bartonella* spp..

7 REFERÊNCIAS

1. Drancourt M, Tran-Hung L, Courtin J, Lumley H, Raoult D. *Bartonella quintana* in a 4000-year-old human tooth. *J Infect Dis.* 2005;191(4):607-11.
2. Maguiña C, Gotuzzo E. Bartonellosis. New and old. *Infect Dis Clin North Am.* 2000;14(1):1-22.
3. Anstead GM. The centenary of the discovery of trench fever, an emerging infectious disease of World War 1. *The Lancet Infectious diseases.* 2016;16(8):e164-72.
4. Breitschwerdt EB. Bartonellosis: One Health Perspectives for an Emerging Infectious Disease. *Iilar Journal.* 2014;55(1):46-58.
5. Garcia-Quintanilla M, Dichter AA, Guerra H, Kempf VAJ. Carrion's disease: more than a neglected disease. *Parasites & Vectors.* 2019;12(1):1-12.
6. Dujardin JC, Herrera S, do Rosario V, Arevalo J, Boelaert M, Carrasco HJ, et al. Research priorities for neglected infectious diseases in Latin America and the Caribbean region. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(10):e780.
7. Relman DA, Loutit JS, Schmidt TM, Falkow S, Tompkins LS. The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. *N Engl J Med.* 1990;323(23):1573-80.
8. Rodriguez-Noriega E, Morfin-Otero R. From 1990 to 2020: The 30-Year History of the Identification of Difficult to Culture Pathogens. *Infectious Diseases in Clinical Practice.* 2020;28(3):121-2.
9. Kaiser PO, Riess T, O'Rourke F, Linke D, Kempf VA. *Bartonella* spp.: throwing light on uncommon human infections. *Int J Med Microbiol.* 2011;301(1):7-15.
10. Harms A, Dehio C. Intruders below the Radar: Molecular Pathogenesis of *Bartonella* spp. *Clinical Microbiology Reviews.* 2012;25(1):42-78.
11. Chomel BB, Kasten RW. Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. *J Appl Microbiol.* 2010;109(3):743-50.
12. Deng H, Pang Q, Zhao B, Vayssier-Taussat M. Molecular Mechanisms of *Bartonella* and Mammalian Erythrocyte Interactions: A Review. *Frontiers in cellular and infection microbiology.* 2018;8:431.
13. Pierard-Franchimont C, Quatresooz P, Pierard GE. Skin diseases associated with *Bartonella* infection: Facts and controversies. *Clinics in Dermatology.* 2010;28(5):483-8.

14. Angelakis E, Raoult D. Pathogenicity and treatment of *Bartonella* infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;44(1):16-25.
15. Kirby JE, Nekorchuk DM. Bartonella-associated endothelial proliferation depends on inhibition of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(7):4656-61.
16. Lamas C, Curi A, Boia MN, Lemos ERS. Human bartonellosis: seroepidemiological and clinical features with an emphasis on data from Brazil - A review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2008;103(3):221-35.
17. Boulouis HJ, Chang CC, Henn JB, Kasten RW, Chomel BB. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Veterinary Research*. 2005;36(3):383-410.
18. Mogollon-Pasapera E, Otvos L, Giordano A, Cassone M. *Bartonella*: emerging pathogen or emerging awareness? *International journal of infectious diseases*. 2009;13(1):3-8.
19. Frank HK, Boyd SD, Hadly EA. Global fingerprint of humans on the distribution of *Bartonella* bacteria in mammals. *PLoS neglected tropical diseases*. 2018;12(11):e0006865.
20. Okaro U, Addisu A, Casanas B, Anderson B. *Bartonella* Species, an Emerging Cause of Blood-Culture-Negative Endocarditis. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30(3):709-46.
21. Hotez PJ, Aksoy S, Brindley PJ, Kamhawi S. What constitutes a neglected tropical disease? *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(1):e0008001.
22. Mardosaitė-Busaitienė D, Radzijeuskaja J, Balčiauskas L, Bratchikov M, Jurgelevičius V, Paulauskas A. Prevalence and diversity of *Bartonella* species in small rodents from coastal and continental areas. *Scientific Reports*. 2019;9(1):1-10.
23. Maguina C, Guerra H, Ventosilla P. Bartonellosis. *Clin Dermatol*. 2009;27(3):271-80.
24. Gomes C, Ruiz J. Carrion's Disease: the Sound of Silence. *Clinical Microbiology Reviews*. 2018;31(1):51.
25. Sanchez CN, Ugarte-Gil CA, Solórzano N, Maguiña C, Pachas P, Blazes D, et al. *Bartonella bacilliformis*: A Systematic Review of the Literature to Guide the Research Agenda for Elimination. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(10):e1819.

26. cdc.gov [internet]. Atlanta: Centers for disease control and prevention [updated 2019-12-18; cited 2020-07-26]. Available from: <https://www.cdc.gov/bartonella/prevention/index.html>.
27. Mosepele M, Mazo D, Cohn J. *Bartonella* Infection in Immunocompromised Hosts: Immunology of Vascular Infection and Vasoproliferation. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012;2012:612809.
28. Nelson CA, Moore AR, Perea AE, Mead PS. Cat scratch disease: U.S. clinicians' experience and knowledge. *Zoonoses and public health*. 2018;65(1):67-73.
29. Tappero JW, Mohle-Boetani J, Koehler JE, Swaminathan B, Berger T, LeBoit P, et al. The epidemiology of bacillary angiomatosis and bacillary peliosis. *JAMA*. 1993;269(6):770-5.
30. Chian CA, Arrese JE, Pierard GE. Skin manifestations of *Bartonella* infections. *International Journal of Dermatology*. 2002;41(8):461-6.
31. Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins K, Chi B, Yamamoto K, Roberts-Wilson J, et al. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J Clin Microbiol*. 1996;34(8):1952-6.
32. Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB, Kasten RW, Vayssier-Taussat M, Birtles RJ, et al. Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. *Vet Res*. 2009;40(2):29.
33. Diniz PP, Velho PE, Pitassi LH, Drummond MR, Lania BG, Barjas-Castro ML, et al. Risk Factors for *Bartonella* species Infection in Blood Donors from Southeast Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(3):e0004509.
34. Drummond MR, Lania BG, Diniz PP, Vissotto de Paiva Gilioli R, Demolin DM, Rodrigues Scorpio D, et al. Improvement of *Bartonella henselae* DNA Detection in Cat Blood Samples by Combining Molecular and Culture Methods. *J Clin Microbiol*. 2018;56(5):e01732-17.
35. Magalhaes RF, Pitassi LHU, Salvadego M, de Moraes AM, Barjas-Castro ML, Velho P. *Bartonella henselae* survives after the storage period of red blood cell units: is it transmissible by transfusion? *Transfusion Medicine*. 2008;18(5):287-91.

36. Silva MN, Vieira-Damiani G, Ericson ME, Gupta K, Gilioli R, de Almeida AR, et al. *Bartonella henselae* transmission by blood transfusion in mice. *Transfusion*. 2016;56(6 Pt 2):1556-9.
37. Pitassi LHU, Diniz P, Scorpio DG, Drummond MR, Lania BG, Barjas-Castro ML, et al. *Bartonella* spp. Bacteremia in Blood Donors from Campinas, Brazil. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 2015;9(1):12.
38. Drummond MR. Comparison of molecular methods for detection of *Bartonella* spp. in blood donors at the Blood Bank of Campinas/SP [tese]. Campinas; Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas; 2018.
39. Drummond MR, Gilioli R, Velho PE. Bartonellosis diagnosis requires careful evaluation. *Braz J Infect Dis*. 2010;14(3):217.
40. 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*. 2007;69(2):273-81.
41. Maggi RG, Duncan AW, Breitschwerdt EB. Novel Chemically Modified Liquid Medium That Will Support the Growth of Seven *Bartonella* Species. *J Clin Microbiol*. 2005;43(6):2651-5.
42. Gutierrez R, Vayssier-Taussat M, Buffet JP, Harrus S. Guidelines for the Isolation, Molecular Detection, and Characterization of *Bartonella* Species. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2017;17(1):42-50.
43. Vermeulen MJ, Herremans M, Verbakel H, Bergmans AM, Roord JJ, van Dijken PJ, et al. Serological testing for *Bartonella henselae* infections in The Netherlands: clinical evaluation of immunofluorescence assay and ELISA. *Clinical microbiology and infection*. 2007;13(6):627-44.
44. Sander A, Berner R, Ruess M. Serodiagnosis of cat scratch disease: response to *Bartonella henselae* in children and a review of diagnostic methods. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2001;20(6).

45. Vermeulen MJ, Verbakel H, Notermans DW, Reimerink JHJ, Peeters MF. Evaluation of sensitivity, specificity and cross-reactivity in *Bartonella henselae* serology. *Journal of medical microbiology*. 2010;59(Pt 6).
46. Parra E, Segura F, Tijero J, Pons I, Nogueras MM. Development of a real-time PCR for *Bartonella* spp. detection, a current emerging microorganism. *Mol Cell Probes*. 2017;32:55-9.
47. Santos LSd. Infection by *Bartonella* spp. in leprosy patients with chronic reactions [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas; 2018.
48. Velho PENF, Moraes AMd. Diagnosis of *Bartonella*spp. infection: study of a bacillaryangiomatosis case. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2006;81(4):349-53.
49. Velho PENF. Estudo das bartoneloses humanas e *Bartonella henselae* : infecção experimental, microbiologia, microscopia de luz e eletronica de transmissão [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas; 2001.
50. Breitschwerdt EB, Maggi RG, Chomel BB, Lappin MR. Bartonellosis: an emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 2010;20(1):8-30.
51. Tapp RA, Roy AF, Corstvet RE, Wilson VL. Differential detection of *Bartonella* species and strains in cat scratch disease diagnostics by polymerase chain reaction amplification of 16S ribosomal RNA gene. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2001;13(3):219-29.
52. Diaz MH, Bai Y, Malania L, Winchell JM, Kosoy MY. Development of a novel genus-specific real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bartonella* species and genotypes. *J Clin Microbiol*. 2012;50(5):1645-9.
53. Florio W, Tavanti A, Barnini S, Ghelardi E, Lupetti A. Recent Advances and Ongoing Challenges in the Diagnosis of Microbial Infections by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Front Microbiol*. 2018;9:1097.
54. Hou TY, Chiang-Ni C, Teng SH. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2019;27(2):404-14.
55. Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem*. 1975;47(2):219-25.

56. Holland RD, Wilkes, J.G., Rafii, F., Sutherland, J.B., Persons, C.C., Voorhees, K.J. and Lay, J.O., Jr. Rapid Identification of Intact Whole Bacteria Based on Spectral Patterns using Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization with Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1996;10(10):1227-32.
57. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Diagnostic Microbiology. *FEMS microbiology reviews*. 2012;36(2):380-407.
58. Sauer SK, Magdalena. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8(1):74-82.
59. Biswas S, Rolain JM. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. *J Microbiol Methods*. 2013;92(1):14-24.
60. Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, et al. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods With Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(4):1169-75.
61. Carbonnelle E, Grohs P, Jacquier H, Day N, S T, Dewailly A, et al. Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification. *J Microbiol Methods*. 2012;89(2):133-6.
62. Faron M, Buchan B, Hyke J, Madisen N, Lillie J, Granato P, et al. Multicenter Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper CA System for the Identification of Clinical Aerobic Gram-Negative Bacterial Isolates. *PLoS One*. 2015;10(11):e0141350.
63. Rychert J, Burnham C, Bythrow M, Garner O, Ginocchio C, Jennemann R, et al. Multicenter evaluation of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of Gram-positive aerobic bacteria. *J Clin Microbiol*. 2013;51(7):2225-31.
64. Fournier PE, Couderc C, Buffet S, Flaudrops C, Raoult D. Rapid and cost-effective identification of *Bartonella* species using mass spectrometry. *J Med Microbiol*. 2009;58(Pt 9):1154-9.
65. El Hamzaoui B, Laroche M, Almeras L, Bérenger J, Raoult D, Parola P. Detection of *Bartonella* spp. in fleas by MALDI-TOF MS. *PLoS neglected tropical diseases*. 2018;12(2):e0006189.

66. El Hamzaoui B, Laroche M, Parola P. Detection of *Bartonella* spp. in *Cimex lectularius* by MALDI-TOF MS. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2019;64:130-7.
67. Arnold RJ, Karty JA, Ellington AD, Reilly JP. Monitoring the Growth of a Bacteria Culture by MALDI-MS of Whole Cells. *Anal Chem*. 1999;71(10):1990-6.
68. Rother ET. Systematic literature review X narrative review. *Acta paul enferm*. 2007;20(2):v-vi.
69. Ikryannikova L, Filimonova A, Malakhova M, Savinova T, Filimonova O, Ilina E, et al. Discrimination between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mitis* based on sorting of their MALDI mass spectra. *Clinical Microbiology and Infection : the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2013;19(11):1066-71.
70. Cheslock M, Embers M. Human Bartonellosis: An Underappreciated Public Health Problem? *Tropical medicine and infectious disease*. 2019;4(2):69.
71. Song A, Gory M, Roussi J, Salomon J, Cremieux A, Perronne C, et al. Familial occurrence of cat-scratch disease, with varying clinical expression. *Scand J Infect Dis*. 2007;39(8):728-30.
72. Edouard S, Nabet C, Lepidi H, Fournier PE, Raoult D. *Bartonella*, a Common Cause of Endocarditis: a Report on 106 Cases and Review. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015;53(3):824-9.
73. Drummond MR, dos Santos LS, Silva MNd, Almeida ARd, Diniz PPVdP, Angeram i, et al. False Negative Results in Bartonellosis Diagnosis. *Vector-borne and zoonotic diseases*. 2019;19(6):453-4.
74. Velho P, Ericson ME. Cryptogenic Hepatitis and Bartonellosis. *Digestive Diseases and Sciences*. 2012;57(4):1107-8.

8 ANEXOS

ANEXO 1: Autorização dos editores da Associação Brasileira de Dermatologia para inclusão do artigo “Manifestações cutâneas das bartoneloses” na presente dissertação

04/12/2020

Gmail - Solicitação de autorização para inclusão de artigo em dissertação de mestrado



Karina Lins <ka.alins@gmail.com>

Solicitação de autorização para inclusão de artigo em dissertação de mestrado

Vanessa Zampier <vanessa@sbd.org.br>
 Para: ka.alins@gmail.com
 Cc: pvelho@unicamp.br

2 de dezembro de 2020 15:43

Prezada dra. Karina, boa tarde.

Os editores autorizaram desde que citeм devidamente a publicação.

Obrigada por nos contatar.

Att.,



Vanessa Zampier

Coordenadora de Biblioteca II
 Departamento de Comunicação

T: + 55 21 2253 6747

E: vanessa@sbd.org.br | www.sbd.org.br

Av. Rio Branco, 30/18º andar | Rio de Janeiro, RJ - Brasil



De: Karina Lins [mailto:ka.alins@gmail.com]

Enviada em: terça-feira, 1 de dezembro de 2020 12:21

Para: vanessa@sbd.org.br; Paulo Eduardo Velho <pvelho@unicamp.br>

Assunto: Solicitação de autorização para inclusão de artigo em dissertação de mestrado

Prezados,

Meu nome é Karina de Almeida Lins, estou concluindo o Mestrado em Clínica Médica, pela Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, sob orientação do Prof. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho.

04/12/2020

Gmail - Solicitação de autorização para inclusão de artigo em dissertação de mestrado

Minha dissertação de mestrado, com o título "Bartoneloses humanas: o desafio do diagnóstico e o potencial uso da espectrometria de massas MALDI-TOF", será apresentada em um formato alternativo, onde artigos produzidos pelo aluno, como primeiro autor, podem ser incluídos nos resultados do trabalho.

Portanto, estou entrando em contato a fim de obter permissão para reutilizar o material incluído no seguinte artigo publicado na revista Anais Brasileiros de Dermatologia para inclusão em minha dissertação de mestrado:

Lins KA, Drummond MR, Velho PENF. Cutaneous manifestations of bartonellosis. An Bras Dermatol. 2019;94:594-602

Em português: Lins KA, Drummond MR, Velho PENF. Cutaneous manifestations of bartonellosis. An Bras Dermatol. 2019;94:594-602 (será incluída no trabalho apenas a versão em português)

Esta dissertação é apenas para uso acadêmico e não se destina a fins comerciais, publicitários ou promocionais. Pretendo fazer duas cópias impressas da minha dissertação. Uma dessas cópias será exposta na biblioteca da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brasil. Além disso, uma versão eletrônica da tese estará disponível no Banco de Teses da Universidade. Desde já agradeço muito.

Atenciosamente,

Karina de Almeida Lins

Mestranda em Clínica Médica

Laboratório de Dermatologia Aplicada e Infecções por Bartonela

Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp

ANEXO 2: Certidão de cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº AAE3DA5

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **AAE3DA5**
 Usuário: **Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho**
 CPF/CNPJ: **576.812.289-34**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Bartonella henselae

Bartonella henselae

Título da Atividade: **Uso do MALDI-TOF MS na identificação e diferenciação de cepas de Bartonella henselae**

Equipe

Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho UNICAMP
Karina de Almeida Lins UNICAMP

Data do Cadastro: **11/05/2020 09:18:53**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **15:01** de **10/10/2020**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO 3: Certificado de apresentação de trabalho no congresso *7th Conference on Mass Spectrometry*

