

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ



THAIS NASCIMENTO DE ANDRADE OLIVEIRA

OCORRÊNCIA DE *Bartonella* spp. NO SANGUE E UNHAS DE FELINOS DOMÉSTICOS DA REGIÃO SUL DA BAHIA – AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO, PERFIL HEMATOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

ILHÉUS – BAHIA

2018

THAIS NASCIMENTO DE ANDRADE OLIVEIRA

OCORRÊNCIA DE *Bartonella* spp. NO SANGUE E UNHAS DE FELINOS DOMÉSTICOS DA REGIÃO SUL DA BAHIA – AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO, PERFIL HEMATOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Tese apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal

Área de concentração: Ciência Animal

Orientador: Profa. Dra. Fabiana Lessa Silva

ILHÉUS-BAHIA

2018

THAIS NASCIMENTO DE ANDRADE OLIVEIRA

OCORRÊNCIA DE *Bartonella* spp. NO SANGUE E UNHAS DE FELINOS DOMÉSTICOS DA REGIÃO SUL DA BAHIA – AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO, PERFIL HEMATOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Ilhéus – BA, 26/06/2018

Fabiana Lessa Silva – *DSc*
UESC/DCAA
(Orientadora)

Renata Santiago Alberto Carlos – *DSc*
UESC/DCAA

Roueda Abou Said – *DSc*
UESC/DCAA

Poliana de Castro Melo – *DSc*
UESC/DCAA

Marcos Rogério André – *DSc*
FCAV-UNESP/DCAA

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família e aos meus Professores, que com muito respeito e humildade me ajudaram na condução destes anos de trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e pela graça alcançada realizando esse Doutorado.

À minha família pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis e na ausência.

A professora Fabiana Lessa Silva, pela orientação e pelo acolhimento dando-me a oportunidade de crescer profissionalmente.

Minha gratidão e admiração também a minha co-orientadora a professora Renata Santiago Alberto Carlos.

Ao professor Alexandre Dias Munhoz pela disponibilidade e paciência.

À amiga Paula Elisa Brandão Guedes, pela parceria e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia da UNESP Jaboticabal e ao Professor Marcos Rogério André pelo acolhimento e disponibilidade, essencial para conclusão do trabalho.

Aos funcionários do Hospital Veterinário da UESC pela colaboração e disponibilidade.

Aos membros da banca por colaborarem para o enriquecimento do trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz por possibilitar a realização e execução do projeto de pesquisa.

A CAPES e FAPESB pela concessão de bolsas de estudo, propiciando maior dedicação na execução desse trabalho.

OCORRÊNCIA DE *Bartonella* spp. NO SANGUE E UNHAS DE FELINOS DOMÉSTICOS DA REGIÃO SUL DA BAHIA – AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO, PERFIL HEMATOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

RESUMO

Os gatos domésticos são os hospedeiros naturais de diversas espécies de *Bartonella*, dentre elas *Bartonella henselae*, *B. koehlerae* e *B. clarridgeiae*, que são descritas como causadoras da Doença da Arranhadura do Gato (DAG). Os felinos são infectados através das fezes das pulgas da espécie *Ctenocephalides felis*. A transmissão aos seres humanos ocorre através das arranhaduras ou mordeduras de gatos infetados pela bactéria. Com o objetivo de determinar a prevalência da infecção por *B. henselae*, *B. koehlerae* e *B. clarridgeia*, bem como determinar a presença do agente das unhas dos animais infectados, foram coletados amostras de sangue e raspados de unhas de 188 gatos. As amostras de sangue foram submetidas a realização de hemograma, teste sorológico para diagnóstico de infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e Vírus da Leucemia Felina (FELV) e análise molecular para detecção do DNA de *Bartonella* spp. As amostras dos raspados das unhas foram submetidas à avaliação molecular para detecção do DNA de *Bartonella* spp. Dos 188 animais incluídos no estudo, em 39 (20,7%) houve detecção do DNA de *Bartonella* sp. nas amostras de sangue. Não houve presença de co-infecção com FIV-FELV. Com relação à análise hematológica, os animais positivos apresentaram hiperproteinemia e linfopenia. Os fatores de risco associados à infecção foram idade (<1 ano), acesso à rua e não ser castrado. Quanto a caracterização das espécies, foi detectado DNA de *B. henselae*, *B. koehlerae* e *B. clarridgeiae*. Nos animais positivos foi detectado DNA de *Bartonella* spp. em 35,9% (14/39) amostras. Conclui-se que a região estudada apresenta significativa prevalência de *Bartonella* spp. na população de gatos domésticos e que os fatores de risco associados a sua infecção são idade, acesso a rua, presença de pulgas e não ser castrado

Palavras chaves: hemoparasitas, gatos, bartonelose, *B. henselae*, *B. koehlerae* e *B. clarridgeiae*.

OCCURRENCE OF *Bartonella* spp. IN THE BLOOD AND BONES OF DOMESTICIANS OF THE SOUTHERN REGION OF BAHIA - EVALUATION OF RISK FACTORS, HEMATOLOGICAL PROFILE AND MOLECULAR CHARACTERIZATION

ABSTRACT

Domestic cats are the natural hosts of several species of *Bartonella*, among them *Bartonella henselae*, *B. koehlerae* and *Bartonella clarridgeiae*, which are described as causing cat scratch disease (DAG). Felines are infected through the feces of the fleas of the species *Ctenocephalides felis*. Transmission to humans occurs through the scratches or bites of cats infected by the bacteria. In order to determine the prevalence of infection by *B. henselae*, *B. koehlerae* and *B. clarridgeia*, as well as to determine the presence of the nail agent of the infected animals. blood samples were collected and nail scraped from 188 cats. The blood samples were submitted to a blood count, serological test for Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) and molecular analysis for the detection of *Bartonella* spp. Samples of nail scrapings will subsequently be used for culture and molecular evaluation. Of the 188 animals included in the study, 39 (20.7%) had DNA detection of *Bartonella* sp. in blood samples. There was no co-infection with FIV-FeLV. Regarding the hematological analysis, the positive animals presented hyperproteinemia and lymphopenia. The risk factors associated with infection were age (<1 year), street access and not castration. Regarding the species characterization, *B. henselae*, *B. koehlerae* and *B. clarridgeiae* DNA were detected. *Bartonella* spp. DNA was detected in positive animals. in 35.9% (14/39) samples. It is concluded that the region studied shows the prevalence of *Bartonella* spp. in the population of domestic cats and that the laughter factors associated with their infection are age, access to the street, presence of fleas and not being castrated.

Key words: hemoparasites, cats, bartonellosis, *B. henselae*, *B. koehlerae* e *B. clarridgeiae*.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1. Classificação taxonômica dos agentes etiológicos causadores das bartoneloses.	8
Tabela 1. Espécies e subespécies de <i>Bartonella</i> com potencial patogênico para o homem, seus reservatórios, vetores e hospedeiros acidentais	12
Tabela 2. Média e desvio padrão (DP) das variáveis hematológicas dos animais positivos e negativos para <i>Bartonella</i> spp e resultados obtidos pelo teste t student.	31
Tabela 3a. Fatores associados à infecção por <i>Bartonella</i> spp. em gatos positivos no teste molecular.	32
Tabela 3b. Associação entre gatos positivos e as variáveis acesso à rua, idade até um ano e animal não castrado.	33
Tabela 4. Protocolos utilizados nas reações de PCR convencional para amplificação do DNA dos diferentes genes de <i>Bartonella</i> spp.	38
Tabela 5. Espécies de <i>Bartonella</i> sequenciadas.	42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Invasão das células endoteliais e eritrócitos pela *Bartonella* spp. 16
- Figura 2. Mapa mostrando a localização das cidades de Ilhéus e Itabuna, 27
sul da Bahia.
- Figura 3. qPCR para *Bartonella* spp. para amplificação do gene *nuoG*. A: 30
Linhas referentes à amplificação da curva padrão do DNA plasmidial. B:
Regressão logarítmica da curva padrão.
- Figura 4. qPCR para *Bartonella* spp. dirigida para o gene *nuoG*. A: Linhas 31
referentes a amostras positivas para *Bartonella* spp. B: Regressão
logarítmica das amostras positivas na curva padrão.
- Figura 5. qPCR para *Bartonella* spp. tendo como alvo o gene *nuoG*. Figura 43
A: Linhas referentes a amostras positivas para *Bartonella* spp. Figura B:
Regressão logarítmica das amostras positivas na curva padrão.

SUMÁRIO

	Pag.	
1	INTRODUÇÃO	7
2	OBJETIVO GERAL	8
3	REVISÃO DE LITERATURA	8
	3.1 Bartoneloses	8
	3.1.1 Taxonomia	8
	3.1.2 Característica Bacteriológicas	9
	3.1.3 <i>Bartonella henselae</i>	10
	3.1.4 <i>Bartonella clarridgeiae</i>	11
	3.2.5 <i>Bartonella koehlerae</i>	11
	3.2 Transmissão e Vetores	12
	3.3 Patogenia e evasão do sistema imune	15
	3.4 Sinais Clínicos	17
	3.5 Epidemiologia	18
	3.6 Fatores de risco	18
	3.7 Diagnóstico	19
	3.7.1 Sorológico	19
	3.7.2 Molecular	20
	3.7.3 Cultura e isolamento	21
	3.8 Prevenção e Controle	21
	3.9 Tratamento	22
	3.10 Bartonelose em humanos	22
4	CAPÍTULO I	24
	4.1 INTRODUÇÃO	25
	4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	26
	4.2.1 Área de estudo	26
	4.2.2 Aspectos éticos	27
	4.2.3 Obtenção das amostras biológicas	27
	4.2.4 Exame hematológico	28
	4.2.5 Teste para FIV/FeLV	28
	4.2.6 Extração do DNA	28
	4.2.7 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR)	29
	4.2.8 Análise estatística	29
	4.3 RESULTADOS	30

4.3.1	PCR em tempo real quantitativo para <i>Bartonella</i> spp	30
4.3.2.	Alterações hematológicas	31
4.3.3	Fatores de Risco	32
4.4	DISCUSSÃO	33
4.5	CONCLUSÕES	35
5	CAPÍTULO II	36
5.1	INTRODUÇÃO	37
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS	38
5.2.1	Reação em Cadeia da Polimerase (cPCR)	38
5.2.2	Eletroforese em gel	39
5.2.3	Sequenciamento genético	40
5.2.4	Processamento do material das unhas	41
5.3	RESULTADOS	41
5.3.1	cPCR para <i>Bartonella</i> spp	41
5.3.2	Sequenciamento	42
5.3.3	qPCR das amostras das unhas	42
5.4	DISCUSSÃO	43
5.5	CONCLUSÕES	44
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
	ANEXOS	51
	ANEXO 1 Ficha clínica	51
	ANEXO 2 Termo de consentimento livre e esclarecido	52
	ANEXO 3 Ficha hematológica	53
	ANEXO 4 Protocolo de extração de DNA da PROMEGA	54
	ANEXO 5 Protocolo qPCR dirigido ao gene <i>nuoG</i>	55
	ANEXO 6 Protocolo de extração de DNA pelo método de Fenol-Clorofórmio	56

1 INTRODUÇÃO

As bartoneloses são zoonoses emergentes no mundo e podem ser transmitidas por diferentes ectoparasitas ou ainda por arranhadura e mordidas de felinos infectados (BRENNER et al., 1993). Os agentes causadores dessas enfermidades são bactérias pertencentes ao gênero *Bartonella*, que são hemotrópicas e adaptadas a diversas espécies de hospedeiros mamíferos, causando neles bacteremia intraeritrocitária crônica (BRENNER et al., 1993).

Os gatos domésticos, por serem os hospedeiros naturais das espécies *B. henselae*, *B. koehlerae* e *B. clarridgeiae*, são considerados os principais transmissores do agente para os seres humanos. As bactérias são transmitidas aos felinos através das fezes das pulgas (*Ctenocephalides felis*) infectadas (BOULOUIS et al., 2005). A transmissão aos seres humanos ocorre através das arranhaduras ou mordeduras de gatos infetados pelas bactérias (EDOUARD; RAOULT, 2010).

A maioria dos felinos infectados não apresenta sinais clínicos (CHOMEL; KASTEN, 2010). Em humanos, as infecções por *Bartonella* spp. podem determinar inúmeras moléstias, dentre as quais a doença da arranhadura do gato (DAG), angiomatose bacilar (AB), peliose hepática (PH), endocardite, febre de origem desconhecida, manifestações oculares, encefalopatia, meningite asséptica, hemiplegia aguda, demência, sintomas psiquiátricos agudos, abscessos hepatoesplênicos, bacteremia assintomática, osteomielite, eritema multiforme, eritema nodosum, adenopatia crônica, síndrome da fadiga crônica, lesões osteolíticas e neurológicas. *Bartonella henselae* é descrita como o principal agente causal dessas enfermidades (MOGOLLON; PASAPERA, 2009).

No Brasil, as enfermidades causadas pelas diversas espécies de *Bartonella* spp. não são de notificação compulsória, o que torna escassas as informações sobre a prevalência da infecção por esses agentes na população humana e animal. Adicionalmente, a prevalência dessas infecções provavelmente é subestimada devido a não inclusão destes agentes no diagnóstico diferencial de várias síndromes clínicas em humanos. Devido a isso, é difícil mensurar a real importância das doenças causadas por essas

bactérias no nosso meio. Até o momento, não existem estudos relativos às bartoneloses no estado da Bahia. Dessa forma, objetivou-se avaliar a frequência de infecção por *B. henselae*, *B. koehlerae* e *B. clarridgeiae* em felinos domésticos dos municípios de Ilhéus e Itabuna, Bahia, correlacionando a infecção por esses agentes com as alterações hematológicas presentes, além de verificar a presença do DNA bacteriano em material coletados das unhas.

2 OBJETIVO GERAL

Determinar a prevalência de infecção por *Bartonella* spp. em felinos naturalmente infectados e atendidos no Hospital Veterinário da UESC e no Centro de Controle de Zoonoses de Itabuna-BA.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 As Bartoneloses

3.1.1 Taxonomia

As bartoneloses são zoonoses amplamente dispersas por todo o mundo, causadas por alfaproteobactérias Gram negativas. O nome *Bartonella* foi dado em homenagem a Alberto Leonardo Barton Thompson que, em 1905, descreveu o agente da doença de Carrion, *Bartonella bacilliformis*, que permaneceu como única espécie pertencente ao gênero até o ano de 1993 (BRENNER et al., 1993). O quadro 1 demonstra a classificação taxonômica do gênero *Bartonella*.

Quadro 1. Classificação taxonômica dos agentes etiológicos causadores das bartoneloses.

Classificação: Reino Bactéria
Filo Proteobacteria
Classe Alfaproteobacteria

Ordem *Rhizobiales*
Família *Bartonellaceae*
Gênero *Bartonella*

A família *Bartonellaceae* representa a unificação dos antigos gêneros *Rochalimae* e *Grahamella* (BRENNER et al., 1993). Após estudo do gene 16s rRNA, constatou-se que *B. bacilliformis* era geneticamente semelhante às espécies *Rochalimaea quintana* e *R. henselae*, tendo sido então espécies incorporadas ao gênero *Bartonella* (BRENNER et al., 1993). Atualmente, o gênero *Bartonella* é composto por aproximadamente 33 espécies e/ou subespécies (BUFFET et al., 2013). As espécies apontadas como agentes causais de moléstias em seres humanos são: *B. bacilliformis*, *B. quintana*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *B. henselae*, *B. elizabethae*, *B. grahamii*, *B. washoensis*, *B. koehlerae*, *B. clarridgeiae*, *B. rochalimae* e *B. tamiae* (MOGOLLON-PASAPERA, 2009).

As principais espécies que infectam os felinos são *B. henselae* (BOULOUIS et al., 2005; BREITSCHWERDT; KORDICK, 2000; BRUNT et al., 2006), *B. clarridgeiae* (CLARRIDGE et al., 1995; BRUNT et al., 2006), *B. koehlerae* (AVIDOR et al., 2004; BRUNT et al., 2006; CHOMEL et al., 2006), *B. quintana* e *B. bovis* (BRUNT et al., 2006). Já foi demonstrada a ocorrência de co-infecção por mais de uma dessas espécies (BREITSCHWERDT; KORDICK, 2000). No Brasil, até o momento, foram descritas em felinos domésticos as espécies *B. henselae* e *B. clarridgeiae* (STAGGEMEIER et al., 2010)

3.1.2. Características bacteriológicas

As espécies de *Bartonella* são pequenos bacilos (ou cocobacilos) Gram-negativos, de formato ligeiramente curvado, pleomórficos e aeróbios, com dimensão que pode variar entre 1 a 2 µm. São catalase, oxidase, urease e nitrato-redutase negativas (EDOUARD; RAOULT, 2010). Podem ser flageladas ou não. Algumas possuem estruturas semelhantes a fímbrias que auxiliam na invasão aos eritrócitos (BREITSCHWERDT; KORDICK, 2000).

3.1.3. *Bartonella henselae*

Na década de 1980, *B. henselae* foi identificada como agente etiológico da angiomatose bacilar (RELMAN et al., 1990) e mais tarde foi reconhecida como agente causador da DAG, cuja transmissão está associada à arranhadura e mordida de gatos infectados. Atualmente inúmeras enfermidades são descritas no homem como consequência de infecções por esta bactéria, entre as quais a doença da arranhadura do gato (DAG), endocardite, encefalopatia e meningite asséptica (CHOMEL et al., 2006; MOGOLLON-PASAPERA, 2009; SOUZA et al., 2010).

Bartonella henselae apresenta uma relevante diversidade genética de cepas com diferente potencial patogênico. Esta espécie foi classificada, com base na comparação da sequência do gene 16S do RNA ribossomal, em dois grupos genotípicos principais, tipos I (Houston) e II (Marseille). Esta classificação permite uma divisão filogenética consistente dentro desta espécie, embora dentro destes grupos sejam descritos vários subgrupos (GUPTILL, 2010). Alguns autores referem a existência de um terceiro genótipo, denominado Berlin-2 (EDOUARD; RAOULT, 2010).

Apenas o genoma de *B. henselae* Houston-1 está totalmente sequenciado (EDOUARD; RAOULT, 2010). Estudos sugerem que o tipo I seja filogeneticamente derivado do grupo II (BOUCHOUICHA et al., 2009). A diversidade genética das bactérias dessa espécie é maior em gatos infectados do que em humanos (BRUNT et al., 2006).

Co-infecções por *B. henselae* 16S rRNA tipos I e II, ou *B. henselae* e *B. clarridgeia* são relatadas em gatos, assim como co-infecções com *Mycoplasma* spp., agente etiológico da micoplasmose eritrocítica (hemobartonelose) (BOUCHOUICHA et al., 2009).

Há também evidências que suportam a existência de variação genética durante o próprio curso da infecção em gatos, garantindo a capacidade de permanecer em circulação nos animais infetados durante longos períodos de tempo, escapando à ação do sistema imunitário (GUPTILL, 2010).

3.1.4 *Bartonella clarridgeiae*

Bartonella clarridgeiae é uma espécie flagelada (BREITSCHWERDT; KORDICK, 2000). Esta bactéria foi descrita como causadora de endocardite e hepatopatia em cães (KORDICK et al., 1999). Gatos podem apresentar co-infecção por *B. henselae* e *B. clarridgeiae*. A avaliação histopatológica de tecidos de gatos experimentalmente co-infectados por *B. henselae* (tipo II) e *B. clarridgeiae* revelaram hiperplasia dos linfonodos periféricos, hiperplasia folicular esplênica, colangite linfocítica/pericolangite linfocítica, hepatite, miocardite linfoplasmocítica e nefrite linfocítica intersticial (KORDICK et al., 1999).

Bartonella clarridgeiae foi sugerida como um possível agente causador de DAG após anticorpos anti-*B. clarridgeiae* terem sido encontrados em um caso suspeito de DAG e em um paciente com abscesso de parede torácica (CHOMEL et al., 2006). Além disso, anticorpos específicos contra *B. clarridgeiae* foram detectados em 3,7% de 724 pacientes com linfadenopatia (SANDER et al., 2000).

3.1.5 *Bartonella koehlerae*

A *Bartonella koehlerae* é considerada, dentre as espécies de *Bartonella* que acometem felinos, a que apresenta crescimento mais fastidioso e, por isso, é a espécie menos frequentemente isolada (AVIDOR et al., 2004). A descoberta desta espécie foi feita por Droz e colaboradores (1999), que fizeram a cultura e isolamento a partir de amostras de sangue de dois gatos domésticos. Após a descoberta da nova espécie, os primeiros relatos de *B. koehlerae* ocorreram em dois gatos na Califórnia (CHOMEL et al., 2009) e em um gato de rua na França (AVIDOR et al., 2004). O estudo realizado por Avidor e colaboradores (2004) apresentou ainda o primeiro relato de caso humano de endocardite por *B. koehlerae*.

3.2 Transmissão e Vetores

No ciclo epidemiológico de *Bartonella* spp., é necessário um hospedeiro vertebrado, no qual ocorre uma bacteremia intraeritrocitária crônica, e um vetor artrópode, responsável pela transmissão da bactéria entre os hospedeiros naturais e hospedeiros sensíveis (JACOMO et al., 2002). A localização intraeritrocitária de *Bartonella* spp. favorece a ingestão deste agente pelos vetores artrópodes durante o repasto sanguíneo. No entanto, a detecção de DNA de *Bartonella* spp em espécies hematófagas de artrópodes não implica necessariamente em capacidade vetorial. A detecção do DNA do agente pode ocorrer apenas pela ingestão de sangue a partir de um hospedeiro com bacteremia, sem que o artrópode tenha potencial para transmitir a infecção (BILLETER et al., 2008).

Cada espécie de *Bartonella* possui vetores e hospedeiros preferenciais: piolho do corpo humano (*Pediculus humanus humanus*) como vetor da *B. quintana*, flebotomíneo (*Lutzomyia verrucarum*) como vetor da *B. bacilliformis* na espécie humana, e pulgas (*Ctenocephalides felis*) como vetores da *Bartonella* em felinos (CHOMEL et al., 2009). A grande diversidade de ectoparasitas que atuam como vetores sugere uma adaptação seletiva das espécies de *Bartonella* com os hospedeiros mamíferos e os vetores (TSAI et al., 2011). A tabela 1 apresenta as principais espécies de *Bartonella*, seus hospedeiros naturais e acidentais e os vetores responsáveis pela transmissão do agente.

Tabela 1. Espécies e subespécies de *Bartonella* com potencial patogênico para o homem, seus reservatórios, vetores e hospedeiros acidentais.

<i>Bartonella</i>	Hospedeiro natural	Vetor	Hospedeiro acidental
<i>Bartonella alsatica</i>	Coelho (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Pulga de coelho? (<i>Spilopsyllus cuniculi</i>)	Homem
<i>Bartonella bacilliformis</i>	Homem	Mosca (<i>Lutzomia verrucarum</i>)	Nenhum

<i>Bartonella clarridgeiae</i>	Gato (<i>Felis catus</i>)	Pulga de gato (<i>Ctenocephalides felis</i>)	Homem e cão
<i>Bartonella elizabethae</i>	Rato (<i>Rattus norvegicus</i>)	Pula de rato (<i>Xenopsylla cheopis</i>)	Homem e cão
<i>Bartonella henselae</i>	Gato (<i>Felis catus</i>)	Pulga de gato (<i>Ctenocephalides felis</i>)	Homem, cão e cavalo
<i>Bartonella koehlerae</i>	Gato (<i>Felis catus</i>)	Pulga de gato (<i>Ctenocephalides felis</i>)	Homem e cão
<i>Bartonella melophagi</i>	Ovelha (<i>Ovis aries</i>)	(<i>Melophagus ovinus</i>)	Homem
<i>Bartonella quintana</i>	Homem	Piolho (<i>Pediculus humanis</i>)	Cão e gato
<i>Bartonella rochalimae</i>	Caninos	Pulgas? (<i>Pulex irritans</i>)	Homem

Fonte: Adaptado de Chomel; Kasten, 2010.

Pulgas da espécie *Ctenocephalides felis* são os vetores naturais da infecção em felinos, pois, quando infectadas, eliminam a bactéria viável nas fezes, contaminando as patas e dentes do animal e possibilitando a transmissão para o homem (LAPPIN et al., 2006; SOUZA et al., 2010). *Bartonella henselae* pode sobreviver nas fezes das pulgas entre 3 a 9 dias, funcionando como uma importante fonte de contaminação ambiental (STILES, 2011). Em estudo realizado com gatos infectados e não infectados que viviam no mesmo ambiente e livres de pulgas, não houve transmissão da infecção, demonstrando que entre os felinos a pulga é a principal fonte de transmissão (CHOMEL et al, 1996). *Bartonella henselae* já foi identificada em diferentes espécies de ixodídeos e estes têm sido apontados como vetores potenciais de transmissão da bactéria entre gatos, cães, seres humanos e outros hospedeiros mamíferos (GUPTILL, 2010). O DNA desta bactéria já foi detectado em carrapatos das espécies *Ixodes pacificus* e *I. ricinus*, colhidos em humanos (CHANG et al., 2001; CHUNG et al., 2004; SANOGO et al., 2003) e em *I. scapularis*, *I. persulcatus*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Dermacentor*

reticulatus coletados no ambiente ou de seus respectivos hospedeiros (TSAI et al., 2011).

A detecção de *B. henselae* em diferentes espécies de ixodídeos levantou a hipótese destes artrópodes funcionarem como potenciais vetores da transmissão do agente a outros hospedeiros, principalmente aos seres humanos (TSAI et al., 2011). Em estudo realizado com infecção experimental de *I. ricinus* por *B. henselae*, comprovou-se que a bactéria foi transmitida ao longo dos diferentes estádios evolutivos do artrópode e também foi comprovada a transmissão do agente, viável e infectante (COTTÉ et al., 2008).

No ambiente natural, a transmissão ocorre quando os gatos apresentam lesões cutâneas (arranhadura, mordedura, abrasão ou picada de artrópode), que servem como portas de entrada para a infecção a partir das bactérias que foram liberadas nas fezes de pulgas (BREITSCHWERDT et al., 2010). O ato de higienização praticado pelos gatos, em si próprios e em outros gatos, espalham as fezes das pulgas presentes na pelagem, contribuindo para a disseminação do agente (STILES, 2011).

Em um estudo experimental, verificou-se que *B. henselae* pode ser transmitida por via intravenosa e intramuscular, através da inoculação de sangue de gatos infectados em gatos saudáveis (GUPTILL et al., 1997; KORDICK et al., 1999). Em outro estudo, verificou-se também infecção experimental em gatos através da inoculação da bactéria, obtida a partir de crescimento em meio de cultura, através das vias intravenosa, subcutânea, intradérmica e oral (BRUNT et al., 2006).

Estudos têm sido realizados na tentativa de confirmar a transmissão vertical de bactérias do gênero *Bartonella*. Esses agentes já foram isolados a partir da placenta, embriões e neonatos de roedores selvagens das espécies *Sigmondon hispidus* e *Peromyscus leucopus* (KOSOY et al., 1998). No entanto, em outro estudo não foi observada transmissão entre roedores fêmeas experimentalmente infectadas com *B. grahamii* e *B. taylorii* e sua prole (BOWN et al., 2004). Transmissão horizontal também não foi observada entre roedores machos infectados e fêmeas livre de livre infecção mantidos no mesmo ambiente e livres de vetores (BOWN et al., 2004).

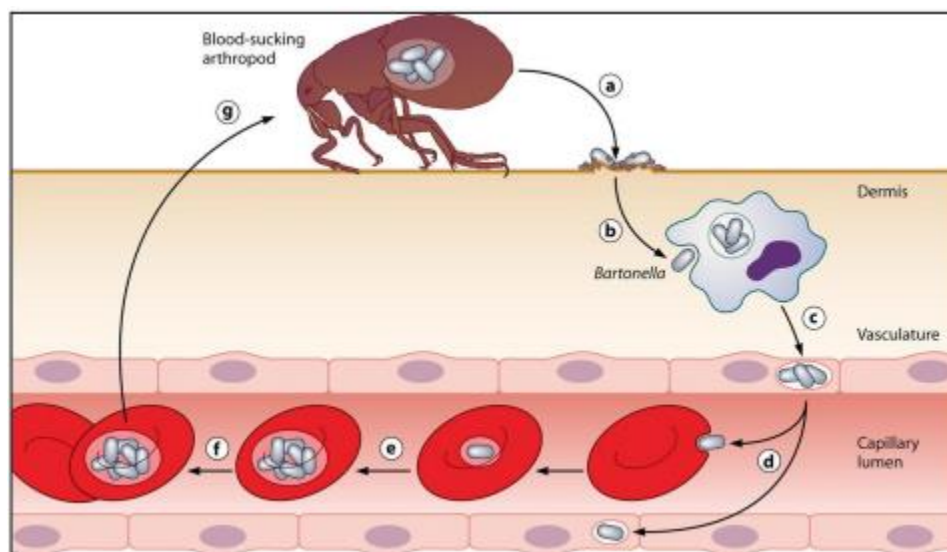
3.3 Patogenia e evasão do sistema imune

As bactérias do gênero *Bartonella* são intracelulares facultativas encontradas geralmente em eritrócitos, causando invasão e lise, e nas células endoteliais, nas quais induzem proliferação (RESTO-RUIZ et al., 2003). As bartoneloses podem causar angiogênese através de dois mecanismos: diretamente, pelo desencadeamento da proliferação e inibição da apoptose das células endoteliais, suprimindo a ativação das caspases e a fragmentação de DNA; indiretamente pela liberação de fatores de crescimento endotelial por macrófagos infectados (ANDERSSON; KEMPF, 2004; DEHIO, 2003).

Após serem inoculadas no organismo dos hospedeiros vertebrados, as bactérias do gênero *Bartonella* passam por um período de replicação em células do endotélio vascular para posteriormente ganharem a corrente sanguínea e infectarem eritrócitos, permitindo assim, a persistência da bacteremia e, conseqüentemente, favorecendo a transmissão vetorial contínua (HARMS; DEHIO, 2012).

A figura 1 ilustra as fases de infecção, invasão celular e multiplicação das bactérias do gênero *Bartonella* nos hospedeiros vertebrados. A infecção ocorre a partir das bactérias presentes nas fezes de pulgas (a), as quais penetram na pele do hospedeiro vertebrado através de feridas cutâneas decorrentes de briga ou abrasão em gatos, e secundárias a mordidas ou arranhaduras de gatos em humanos. Após inoculação, as bactérias são fagocitadas por células de defesa presentes na derme (b), seguindo-se a invasão das células endoteliais e replicação no interior dessas células (c). A seguir, as bactérias ganham a circulação, podendo invadir eritrócitos ou outras células do endotélio vascular (d). No interior dos eritrócitos, ocorre replicação (e) e persistência, favorecendo bacteremia crônica e a transmissão da bactéria para outros artrópodes (f) (HARMS; DEHIO, 2012).

Figura1. Invasão das células endoteliais e eritrócitos por *Bartonella* spp.



Fonte: HARMS; DEHIO, 2012.

A localização intraeritrocitária é o principal mecanismo de evasão da bactéria, devido à ausência de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) na superfície dos eritrócitos que são, portanto, incapazes de apresentar antígenos do patógeno às células do sistema imune (BREITSCHWERDT et al., 2010).

Os eritrócitos infectados continuam realizando suas funções e têm o mesmo tempo de vida de eritrócitos não infectados, por isso os animais acometidos apresentam quadros de bacteremia prolongados. As bactérias são combatidas pelo sistema imune apenas quando liberadas para a corrente sanguínea, sendo opsonizadas e incapacitadas de invadir novas células (PULLIAINEM; DEHIO, 2012). A invasão dos eritrócitos sem causar hemólise preserva as bactérias, promovendo uma transmissão eficiente por vetores, além de proteger estes patógenos da imunidade do hospedeiro e potencialmente contribuir para diminuição da eficácia antimicrobiana (GUPTILL, 2003; KABEYA et al., 2006).

Em seres humanos, a medula óssea é considerada um possível nicho primário da *B. henselae*. Pesquisas *in vitro* demonstraram que essa espécie tem a capacidade de invadir células precursoras da medula óssea, o que contribui para a infecção eritrocitária prolongada (BREITSCHWERDT et al.,

2010). Embora a localização eritrocitária seja a mais frequente, *B. henselae* já foi detectada extracelularmente no sangue e em outros tecidos de animais infectados, como fígado e baço (STILES, 2011).

Avaliando o modo de invasão dos eritrócitos por *B. henselae*, verificou-se *in vitro* que a bactéria pode se apresentar em localização intracelular, epicelular e extracelular e que pequena percentagem dos eritrócitos é invadida. A ausência de flagelos na bactéria *B. henselae* sugere que esses agentes invadem as células do hospedeiro através de movimentos rotatórios, realizados por suas fímbrias tipo IV. Isto explica o menor nível de invasão dos eritrócitos por essa espécie em comparação com espécies flageladas de *Bartonella* (MEHOCK et al., 1998).

Os lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias do gênero *Bartonella* possuem estrutura diferente das demais bactérias Gram negativas, impossibilitando o reconhecimento pelos receptores do tipo Toll e receptores de reconhecimento padrão (PRRs), responsáveis pela identificação dessas moléculas e pela liberação de citocinas pró-inflamatórias. Desta forma, as bactérias deste gênero conseguem invadir o organismo sem incitar uma resposta inflamatória (PULLIAINEM; DEHIO, 2012).

Bartonella henselae induz a produção de IL-4 pelas células do sistema fagocítico mononuclear, resultando em resposta imune humoral com liberação de IgG em felinos. Aparentemente este anticorpo atua no controle da infecção, porém não é suficiente para eliminar o agente, pois bacteremia intermitente foi observada em gatos infectados apesar da produção de anticorpos específicos (GUPTILL, 2003; KABEYA et al., 2006).

3.4 Sinais Clínicos

Gatos domésticos em geral são portadores assintomáticos e apresentam uma bacteremia persistente, sendo considerados os principais transmissores da infecção por *B. henselae* para os seres humanos. Quando presentes, as principais manifestações clínicas em felinos são febre, desordens oculares e linfadenomegalia (CRISSIUMA et al., 2011). A uveíte é descrita como a alteração ocular mais comum. Uveíte anterior crônica foi descrita pela primeira vez em 1999 por Lappin e Black em um gato que apresentava

anticorpos anti-*B. henselae* no soro e intraocular, e que apresentou remissão dos sintomas após a administração de doxiciclina e exclusão de outras possíveis etiologias (STILES, 2011).

3.5 Epidemiologia

As bartoneloses têm distribuição mundial, havendo maior prevalência da infecção por este agente em áreas com condições ambientais mais favoráveis ao desenvolvimento dos vetores artrópodes, isto é, em regiões com temperatura e umidade mais elevadas (BREITSCHWERDT; KORDICK, 2000; GUPTILL, 2010; STILES, 2011).

Determinadas espécies mostram-se endêmicas em determinadas áreas como, por exemplo, a espécie *B. bacilliformis*, que é restrita à região dos Andes (Peru, Colômbia e Equador). Esta distribuição geográfica limitada está relacionada a presença dos vetores e hospedeiros naturais de cada espécie. As espécies *B. quintana* e *B. henselae* estão distribuídas mundialmente porque possuem hospedeiros (humanos e gatos) e vetores (piolhos e pulgas) também com distribuição mundial (CHOMEL et al., 2004)

A infecção de gatos por *B. henselae* tem sido extensamente documentada na literatura, tendo sido relatada em diversos países da Europa, Ásia, Oceania e América (BOULOUIS et al., 2005). Estudos no Brasil ainda são escassos (Figura 2) e têm demonstrado uma variação significativa na prevalência da infecção por *Bartonella* spp. em felinos, como observado nos estudos realizados por Staggemeier et al. (2010) e Braga et al. (2012), que encontraram prevalência de 25% e 4,5% no Rio Grande do Sul e no Maranhão, respectivamente. Até o presente momento, não há trabalhos publicados que tenham determinado a prevalência da infecção por estes agentes em felinos no estado da Bahia.

3.6 Fatores de risco

O acesso à rua e o contato com outros animais, especialmente outros gatos, é um importante fator de risco para a infecção. Assim, gatos de rua ou adotados de gatis e os que vivem em ambientes com outros gatos têm maior

probabilidade de serem infectados em relação aos animais sem acesso à rua e sem contato com outros gatos (CHOMEL; KASTEN, 2010).

As infecções por retrovírus, bem como uso de drogas imunossupressoras, associadas ao processo de envelhecimento são fatores que contribuem para o aparecimento de alterações clínicas nos animais infectados (BREITSCHWERDT et al., 2010).

Segundo Guptill (2010), animais mais velhos apresentam uma maior prevalência de anticorpos anti-*B. henselae* em relação aos os animais com idades inferiores a um ano. Porém, de acordo com outros autores, os gatos jovens têm maior probabilidade de apresentarem bacteremia (BOULOUIS et al., 2005; BRUNT et al., 2006; CHOMEL; KASTEN, 2010). A relação entre bacteremia e o sexo do animal não está comprovada (CHOMEL; KASTEN, 2010).

3.7 Diagnóstico

3.7.1 Sorológico

Anticorpos anti-*Bartonella* spp. podem ser detectados no soro de hospedeiros mamíferos por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio imunoenzimático (ELISA) e Imunoensaio Western Blot (BRUNT et al., 2006). É importante considerar que pode ocorrer reação cruzada entre antígenos de *B. henselae* e de *B. quintana* (BRUNT et al, 2006). Não há estudos que estimem a sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos utilizados no diagnóstico de infecção por *Bartonella* spp. em cães e em gatos. A RIFI é um teste que está bem caracterizado e validado em ensaios clínicos (GUPTIL, 2010).

Estudos demonstram que os gatos domésticos infectados por *B. henselae* têm se apresentado soronegativos quando avaliados no início da infecção. Portanto, resultados falso-negativos podem ocorrer nas fases iniciais da doença. Durante o período de bacteremia, gatos infectados naturalmente ou experimentalmente por *B. henselae* mantêm titulações entre 1:256 e 1:512. Elevadas concentrações de anticorpos geralmente se correlacionam com culturas positivas ou detecção de DNA de *Bartonella* no sangue

(BREITSCHWERDT, 2008). É importante considerar que resultados positivos nos testes sorológicos não significam que o animal esteja infectado naquele momento, uma vez que os anticorpos produzidos contra o agente podem ser detectados por meses a anos após a ocorrência da bacteremia (HACKETT et al., 2006).

3.7.2 Molecular

A reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é considerada uma técnica prática e segura para o diagnóstico da infecção por *Bartonella* spp. Ensaios de PCR que têm como alvo a região intergênica 16S-23S, que amplifica o DNA de diferentes espécies de *Bartonella*, resultam em produtos de diferentes tamanhos, de forma que um simples ensaio pode também ser usado para determinar as espécies de organismos infectantes (BRUNT et al., 2006).

Resultados positivos na PCR confirmam a presença do DNA microbiano, mas não provam que o micro-organismo está viável ou que o gato está clinicamente doente (BRUNT et al., 2006). Resultados falso-negativos podem ocorrer como consequência de bacteremia intermitente, tratamento com uso de antibióticos, ausência de DNA microbiano na amostra testada, ou pela presença de substâncias inibitórias ou ainda interferentes nos espécimes biológicos (BRUNT et al., 2006).

A PCR em tempo real (qPCR) tem substituído a PCR convencional em muitos laboratórios, pois não é apenas mais rápida, mas também mais sensível e específica em relação à sua antecessora. No trabalho realizado por Staggemeier et al (2014), a qPCR foi capaz de identificar o DNA da *Bartonella* em quatro amostras em que a PCR convencional foi negativa, demonstrando sua maior sensibilidade. Gutiérrez e colaboradores (2013) realizaram um trabalho no qual foi feita comparação da eficácia entre a técnica de High-Resolution Melt (HRM) qPCR e a cultura e isolamento de *B. henselae* como métodos de diagnóstico. Esses autores verificaram que a técnica molecular mostrou resultados superiores, detectando 94% de infecção, enquanto a cultura e o isolamento bacteriano foram capazes de detectar infecção somente em 35,7% dos casos.

3.7.3 Cultura e isolamento

As bactérias do gênero *Bartonella* apresentam crescimento lento. Sua cultura leva de cinco a 15 dias até formar colônias visíveis e o período de crescimento pode ser superior a 45 dias (EDOUARD; RAOULT, 2010). Tradicionalmente, suas culturas são semeadas em meio Ágar semi-sólido, enriquecido com sangue (de ovelha ou cavalo), crescendo sob temperatura de 35 a 37°C, sob atmosfera de CO₂ controlada a 5% (EDOUARD; RAOULT, 2010). Em isolamento primário, algumas espécies como, por exemplo, *B. henselae* apresentam-se como colônias de coloração esbranquiçada e de aparência rugosa, seca e com relevo, tendo uma pequena depressão no centro (EDOUARD; RAOULT, 2010).

O meio de cultura líquido denominado BAPGM (*Bartonella Alpha-Proteobacteria Growth Medium*) permite o crescimento de, pelo menos, sete espécies de *Bartonella*. Este meio é utilizado como pré-enriquecimento e, combinado com diagnósticos moleculares, aumentou o sucesso e a sensibilidade da cultura tanto para diagnóstico da infecção em animais como em humanos (DUNCAN et al., 2007).

Segundo Guptill; Yoran (2006), o isolamento de *Bartonella* spp. à partir da cultura de sangue ou tecido de um animal infectado é o método mais confiável para o diagnóstico definitivo de infecção ativa pelo agente.

3.8 Prevenção e Controle

Um das principais formas de controle das bartoneloses é o controle dos vetores (GUPTILL, 2010). Especialmente para as espécies *B. henselae*, *B. koehlerae* e *B. clarridgeiae*, as pulgas são necessárias para manutenção da carga bacteriana no ambiente e conseqüente transmissão para os mamíferos, portanto, o rigoroso controle destes vetores é sempre recomendado (BRUNT et al., 2006). Portanto, gatos estritamente domiciliados são menos expostos aos riscos de infecção, pois reduzem a exposição aos vetores e a outros animais infectados (BRUNT et al., 2006).

Os tutores dos animais devem ser esclarecidos sobre o modo como os gatos adquirem a infecção por *Bartonella* e como esta pode ser transmitida aos

humanos, incluindo a associação com a infestação por pulgas (GUPTILL, 2010). Pessoas imunossuprimidas e crianças devem evitar o contato com gatos cujo estado de saúde é desconhecido. O corte de unha dos animais é conveniente para reduzir o risco de arranhaduras. Além disso, aconselha-se que feridas infligidas por gatos sejam imediatamente lavadas com água e solução desinfetante (BRUNT et al., 2006; GULPTILL, 2010).

3.9 Tratamento

Devido à dificuldade no diagnóstico de bartonelose em felinos, ainda não há um protocolo terapêutico padronizado para esta espécie (BRUNT et al., 2006). Em gatos infectados com *B. henselae* ou *B. clarridgeiae*, antibióticos como doxiciclina, amoxicilina, amoxicilina-clavulanato, enrofloxacina, eritromicina, tetraciclina e rifampicina apresentaram resultados variáveis, promovendo eliminação do agente em alguns animais e em outros não (BRUNT et al., 2006).

3.10 Bartoneloses em humanos

Infecções por bactérias do gênero *Bartonella* têm sido associadas a uma variedade de doenças com curso agudo e subagudo em humanos (BOULOUIS et al., 2005), e que variam desde a simples ocorrência de linfadenopatia até um maior comprometimento orgânico caracterizado por doenças sistêmicas (BRUNT et al., 2006).

As enfermidades associadas a infecções por *Bartonella* em humanos incluem a angiomatose bacilar, doença da arranhadura do gato (DAG), neurorretinite, sintomas neurológicos (BRUNT et al., 2006) e endocardite (AVIDOR et al., 2004).

A DAG é enfermidade mais comumente relatada, sendo causada pela bactéria *B. henselae* e, menos frequentemente, por *B. clarridgeiae* (KAISER et al., 2011). Esta síndrome foi reconhecida pela primeira vez por Robert Debré em 1931, que estabeleceu a ligação entre o surgimento de doença no homem e o contato prévio com gatos; porém, sua descrição foi feita somente em 1950. O agente etiológico foi identificado em 1993, por Dolan e colaboradores, após

isolarem a bactéria *B. henselae* a partir de nódulos linfáticos de pacientes com a doença (EDOUARD; RAOULT, 2010; FLORIN et al., 2008).

A doença da arranhadura do gato é considerada uma afecção benigna, caracterizada por linfadenomegalia regional. Após arranhadura ou mordida de gato infectado, há formação de pápula e posteriormente pústula no local da inoculação. Após um período de uma a três semanas, desenvolve-se linfadenomegalia unilateral no local de drenagem linfática mais próximo de onde ocorreu a inoculação (EDOUARD; RAOULT, 2010; FLORIN et al., 2008). As adenopatias regridem espontaneamente em 1 a 6 meses, embora alguns raros casos possam durar por anos (EDOUARD; RAOULT, 2010). Cerca de um terço dos doentes apresentam sinais sistêmicos da doença como febre baixa, fadiga e mal-estar, podendo ocorrer, por vezes, cefaleia, anorexia e esplenomegalia (FLORIN et al., 2008; KAISER et al., 2011).

Cerca de 5 a 9% dos pacientes podem desenvolver a forma atípica da doença, na qual não se observa linfadenopatia regional, com o desenvolvimento de outras alterações que incluem síndrome óculo glandular de Parinaud, encefalite, endocardite, anemia hemolítica, hepatomegalia, esplenomegalia, glomerulonefrite, pneumonia, bacteriemia recidivante e osteomielite (FLORIN et al., 2008; LAMPS; SCOTT, 2004).

4. CAPÍTULO I

INFECÇÃO NATURAL POR *Bartonella* spp. EM FELINOS NO SUL DA BAHIA – PERFIL HEMATOLÓGICO E FATORES DE RISCO

4.1 INTRODUÇÃO

As bartoneloses são zoonoses amplamente dispersas por todo o mundo (BRENNER et al., 1993), causadas por pequenos bacilos (ou cocobacilos) Gram-negativos, de formato ligeiramente curvado, pleomórficos e aeróbios, com dimensões que podem variar entre 1 a 2 μm (EDOUART; RAOULT, 2010). O gênero *Bartonella* é atualmente composto por cerca de 33 espécies e subespécies de bactérias (BUFFET et al., 2013), sendo *B. bacilliformis*, *B. quintana*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *B. henselae*, *B. elizabethae*, *B. grahamii*, *B. washoensis*, *B. koehlerae*, *B. clarridgeiae*, *B. rochalimae* e *B. tamiiae* as principais causadoras de enfermidades no homem (MOGOLLON-PASAPERA, 2009). O gato doméstico é o hospedeiro natural das espécies *B. henselae*, *B. koehlerae* e *B. clarridgeiae*, sendo considerado o principal transmissor desses agentes para os seres humanos (SOUZA et al., 2010).

As bactérias do gênero *Bartonella* necessitam de um hospedeiro vertebrado e um vetor artrópode para completarem seu ciclo (JACOMO et al., 2002). Diversas espécies de mamíferos já foram descritas como hospedeiros naturais e susceptíveis. Nestes, as bactérias invadem os eritrócitos causando uma bacteremia crônica (CHOMEL; KASTEN, 2010). Os vetores artrópodes são os responsáveis pela transmissão do agente entre os hospedeiros naturais e susceptíveis (JACOMO et al., 2002). Para os felinos, as pulgas da espécie *Ctenocephalides felis* são os vetores naturais, sendo responsáveis por eliminar a bactéria viável nas fezes, com contaminação das patas e dentes desses animais, possibilitando a transmissão do agente para o homem (LAPPIN et al., 2006; SOUZA et al., 2010).

A maioria dos felinos infectados não apresenta alterações clínicas (CRISSIUMA et al., 2011). Quando presentes, essas alterações são inespecíficas e incluem febre, apatia, uveíte e linfadenopatia (CRISSIUMA et al., 2011). No entanto, as infecções por *Bartonella* spp. no homem podem determinar diversas enfermidades, tais como a doença da arranhadura do gato (DAG), angiomatose bacilar (AB), peliose hepática (PH), endocardite, febre de origem desconhecida, manifestações oculares, encefalopatia, meningite

asséptica, hemiplegia aguda, demência, sintomas psiquiátricos agudos, abscessos hepáticos e esplênicos, bacteremia assintomática, osteomielite, eritema multiforme, eritema nodoso, adenopatia crônica, síndrome da fadiga crônica, lesões osteolíticas e neurológicas (MOGOLLON; PASAPERA, 2009).

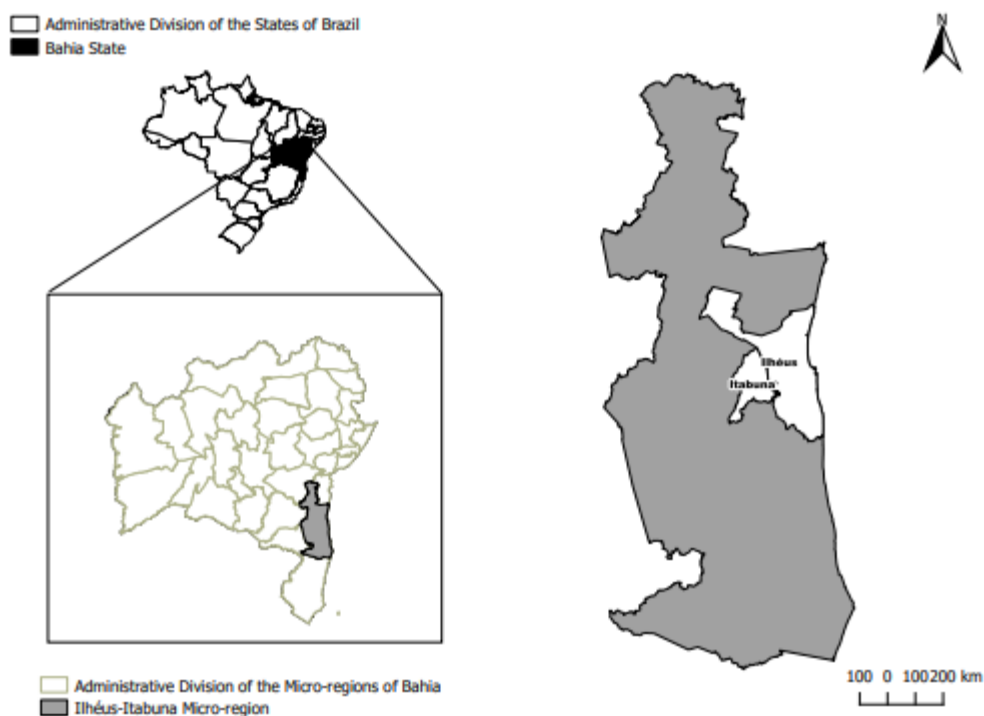
Embora alguns estudos tenham demonstrado o caráter endêmico deste agente no Brasil (BRAGA et al., 2012; SOUZA et al., 2010, STAGGEMEIER et al., 2010), nenhuma investigação foi realizada até o momento na Bahia. Diante deste cenário, objetivou-se determinar a prevalência da infecção por *Bartonella* spp. em gatos domésticos da região Sul da Bahia. Adicionalmente investigou-se as principais alterações clínicas e hematológicas presentes nos animais positivos, bem como os fatores de risco associados à infecção pelo agente na população de animais avaliada.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Área de estudo

O estudo foi desenvolvido nos municípios de Itabuna e Ilhéus, localizados da região Sul da Bahia. O município de Itabuna possui 401,029 km² de extensão, está localizado a aproximadamente 426 km da capital Salvador, possui 219.680 habitantes, sendo seu bioma representado pela mata Atlântica, com clima tropical úmido (IBGE, 2017). O município de Ilhéus encontra-se distante cerca de 460 km da capital baiana, apresenta área territorial de 1.584,693 km² e população estimada em 180.213 habitantes, seu bioma também é representado pela mata Atlântica e o clima também é tropical úmido (IBGE, 2017). A figura 2 ilustra o mapa da microrregião das cidades descritas.

Figura 2. Mapa mostrando a localização das cidades de Ilhéus e Itabuna, sul da Bahia.



Fonte: Tatiani Harvey/QGIS 2.18

4.2.2 Aspectos éticos

A metodologia utilizada na pesquisa foi julgada e aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC (CEUA / UESC), sob o protocolo nº013/2016. A inclusão dos animais no estudo foi feita por conveniência dos animais atendidos no Hospital Veterinário da UESC e Centro de Controle de Zoonoses de Itabuna. A obtenção de amostras biológicas só ocorreu após autorização por parte dos tutores e assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2).

4.2.3 Obtenção de amostras biológicas

Foram incluídos no estudo 188 felinos domésticos, domiciliados e semi domiciliados atendidos no Hospital Veterinário (HV) da UESC, em Ilhéus, e no

Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de Itabuna, no período de março a novembro de 2017.

Após autorização por parte dos tutores e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, realizou-se anamnese. Em seguida, os animais foram avaliados clinicamente e, após contenção física, foram colhidos aproximadamente 5 mL de sangue venoso por punção jugular ou cefálica. O sangue colhido de cada animal foi dispensado em dois tubos, ambos contendo EDTA. Um tubo foi destinado à realização dos exames hematológicos e o outro tubo foi imediatamente armazenado em freezer sob temperatura de -80° C para posterior extração de DNA e realização de diagnóstico molecular. Junto aos tutores foi aplicado um questionário, a fim de se investigar sobre o estilo de criação dos animais.

4.2.4 Hematologia

Os exames hematológicos foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do HV-UESC. A avaliação hematológica foi realizada manualmente com contagem da série eritrocitária e leucocitária em câmara de Neubauer. A hematoscopia foi realizada com a observação de esfregaços sanguíneos corados com panótico rápido com auxílio da objetiva de 100 x, contando-se 100 leucócitos para a realização da leucometria específica, contagem de plaquetas e avaliando-se toda a lâmina para pesquisa de alterações morfológicas e hemoparasitos.

Do total de 188 animais que fizeram parte do estudo, 89 (47,3%) foram provenientes do atendimento clínico, e apresentavam comorbidades diversas (problemas de pele, distúrbios reprodutivos, doenças do trato urinário, distúrbio gástricos, entre outros). Enquanto 99 (52,7%) foram classificados como pacientes hígidos visto que, não apresentam queixa de nenhuma afecção no momento da coleta.

4.2.5. Teste para FIV/FeLV

Adicionalmente, após realização do hemograma, o sangue dos animais foi testado para diagnóstico de infecção pelos Vírus da Imunodeficiência Felina

(FIV) e Vírus da Leucemia Felina (FeLV) com o Kit comercial Allere FIV/FeLV, com a finalidade de se investigar a ocorrência de co-infecções.

4.2.6 Extração de DNA

A extração de DNA genômico das amostras de sangue foi realizada do Laboratório de Genética do HV-UDESC, utilizando-se o kit comercial ReliaPrep da Promega, conforme recomendações do fabricante (Anexo 4)

4.3.6 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR)

Com a finalidade de detectar e fazer a quantificação do DNA de *Bartonella* spp. (número de cópias/ μL), as amostras de DNA foram submetidas à qPCR para amplificação de um fragmento de 83 pares de base (pb) do gene *nuoG*, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores F (5' CAATCTTCTTTTGCTTCACC-3') e R (5'- TCAGGGCTTTATGTGAATAC-3') e a sonda de hidrólise TexasRed-5'-TTYGTCATTTGAACACG-3'[BHQ2a-Q]3' (IDT).

As reações de PCR foram realizadas no Laboratório de Parasitologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal. A amplificação foi realizada utilizando-se o protocolo descrito previamente por André et al. (2016) (Anexo 5). Para obtenção da curva padrão, foi realizada uma diluição seriada com diferentes concentrações de DNA plasmidial [(2,0 x 10⁷ a 2,0 x 10⁰ cópias/ μL) (IDT Technologies)] contendo a sequência alvo de 83 pb do gene *nuoG* de *Bartonella* spp.

Todas as amostras foram processadas em duplicatas, para comparação e certificação da qualidade do processamento das mesmas. As réplicas de uma determinada amostra que mostraram valores de C_q (quantidade de ciclos) acima de 1,0 foram analisadas novamente. A eficiência de amplificação (*E*) foi calculada de acordo com o *slope* da curva padrão utilizando-se a fórmula ($E = 10^{-1/\text{slope}}$). Para determinar o limite de detecção da qPCR, a curva padrão (2,0 x 10⁷ a 2,0 x 10⁰ cópias/ μL) foi utilizada para verificar a quantidade de DNA que pode ser detectado com 95% de sensibilidade.

4.2.7 Análise estatística

Os dados obtidos na anamnese foram analisados no pacote estatístico EPI INFO 3.5.1 e posteriormente pelo teste Qui-quadrado com correção de Yates ou teste exato de Fischer. O odds ratio (OR) da análise foi calculado por meio de medidas de associação e intervalo de confiança (IC) de 95%. Por fim, realizou-se regressão logística multivariada não condicional, onde o modelo final foi criado por meio das variáveis de entrada e saída do sistema (backward).

Para determinar a influência da infecção em relação aos parâmetros hematimétricos foram utilizados o “T” de Student ou mann-whitney, com nível de significância de 95%

4.3 RESULTADOS

4.3.1 PCR em tempo real quantitativo para *Bartonella* spp.

A eficiência média de amplificação (E) dos ensaios de qPCR para *Bartonella* spp. foi de: $E = 91,2\%$; $slope = -3.562$; $r^2 = 0.996$. O limite de detecção foi de 10 cópias de plasmídeo/ μL , com 95% de sensibilidade. Os valores mínimo e máximo do número de cópias do gene *nuoG* de *Bartonella* spp. detectados foram de 1,42 e 395.000 cópias/ μL , respectivamente.

Das 188 amostras de sangue analisadas, 20,7% (39/188) foram positivas para *Bartonella* spp. (Figuras 4 e 5).

Figura 3: qPCR para *Bartonella* spp. para amplificação do gene *nuoG*. **Figura A:** Linhas referentes à amplificação da curva padrão do DNA plasmidial. **Figura B:** Regressão logarítmica da curva padrão.

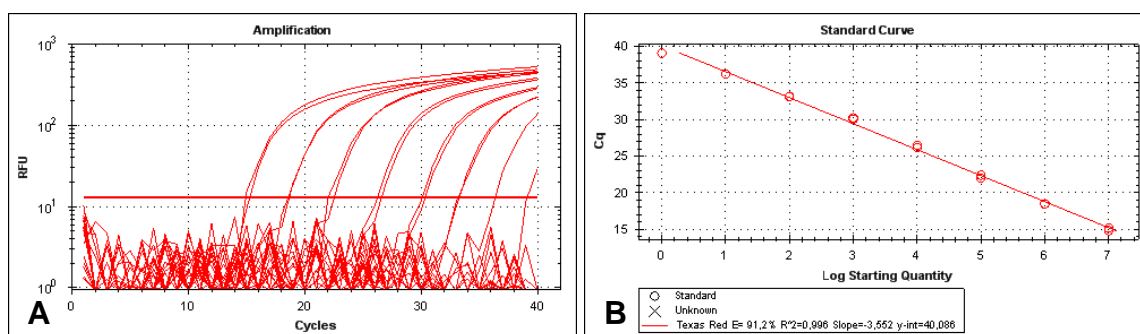
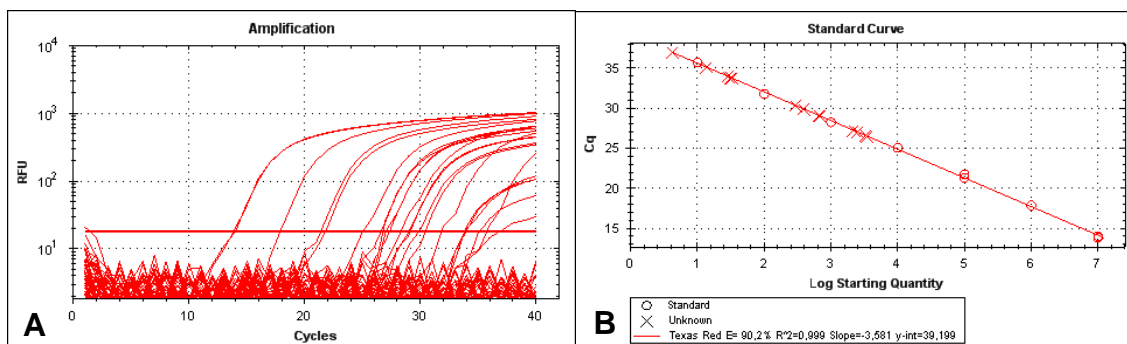


Figura 4: qPCR para *Bartonella* spp. dirigida para o gene *nuoG*. **Figura A:** Linhas referentes a amostras positivas para *Bartonella* spp. Verificar linhas ultrapassando a linha horizontal (linha de *threshold*). **Figura B:** Regressão logarítmica das amostras positivas na curva padrão.



4.3.2 Alterações Hematológicas

Observou-se valores mais elevados de plaquetas ($p=0,0082$) nos animais positivos para *Bartonella* spp (tabela 1). Não verificou-se a influência de comorbidades nos parâmetros hematológicos (tabela 2 e 3).

Média e desvio padrão (DP) das variáveis hematológicas dos animais positivos e negativos para *Bartonella* spp e resultados obtidos pelo teste t de *student*.

Variável	Média animais positivos	DP animais positivos	Média animais negativos	DP animais negativos	t <i>student</i> ($p<0,05$)
Hemácias	8,0	2,3	7,31	2,1	*
Hematócrito	33,5	6,8	32,4	8,5	*
Hemoglobina	10,8	2,2	10,8	2,6	*
Proteínas plasmáticas	7,2	9,3	7,4	10,9	*
Leucograma	15418,5	6869,7	1555,8	13510	*
Neutrófilos absolutos	9823,2	5682,2	10029	6652,6	*
Bastonetes	48,6	174,8	177,4	988,6	*

Linfócitos absolutos	3745,7	2261,3	2790,3	2139,2	*
Monócitos absolutos	586	465,8	531,6	603,9	*
Eosinófilos absolutos	999,1	740	970,2	1083	*
Basófilos absolutos	29,7	84,5	38,6	137,2	*
Plaquetas	337,5	99,3	289,3	167,5	0,0082

* valores de $p < 0,05$

Tabela 2. Média e desvio padrão (DP) das variáveis hematológicas dos animais positivos para *Bartonella* spp. e animais negativos para *Bartonella* spp. sem doença clínica e resultados obtidos pelo teste t de student.

Variável	Média animais saudáveis	DP animais saudáveis	Média animais negativos doentes	DP animais negativos doentes	t student ($p < 0,05$)
Hemácias	8,3	2,1	7,6	1,8	*
Hematócrito	34,2	5,8	34,7	7,6	*
Proteínas plasmáticas	7,2	0,6	8,2	7,0	*
Leucograma	14540	6296,2	12566	5199,6	*
Neutrófilos absolutos	8906,6	5602,1	8144,1	4519,1	*
Bastonetes	24,96	124,8	71,4	226	*
Linfócitos absolutos	3807	2123,7	2953,8	1774,5	*
Monócitos absolutos	485	399	480,3	435,4	*
Eosinófilos	991,4	722,8	918,9	830,6	*

absolutos					
Basófilos	35,36	94,2	52,3	176	*
absolutos					
Plaquetas	322,5	86,5	271,1	97,8	*

* valores de $p < 0,05$

Tabela 3. Média e desvio padrão (DP) das variáveis hematológicas dos animais positivos para *Bartonella* spp. comparados aos animais negativos para *Bartonella* spp. com doença clínica e resultados obtidos pelo teste t de *student*.

Variável	Média animais positivos doentes	DP animais positivos doentes	Média animais negativos doentes	DP animais negativos doentes	t student ($p < 0,05$)
Hemácias	7,5	2,1	7,0	2,2	*
Hematócrito	32,2	8,5	30,4	8,9	*
Proteínas plasmáticas	7,2	0,9	7,4	0,8	*
Leucograma	16987	7786	18179	17511	*
Neutrófilos absolutos	11460	5651,4	11687	7735	*
Bastonetes	90,8	240,1	270	1336	*
Linfócitos absolutos	3636,2	2569,2	2646,5	2418	*
Monócitos absolutos	766,4	534,4	576,6	720,5	*
Eosinófilos absolutos	1012,9	797,4	1015,3	1276,6	*
Basófilos absolutos	19,7	65,8	26,7	90,9	*
Plaquetas	325,7	120,4	297,3	201,9	*

* valores de $p < 0,05$

4.3.3. Fatores de risco

Do total de animais que fizeram parte do estudo, 167 foram atendidos no HV-UESC e 21 foram atendidos no CCZ de Itabuna. A avaliação estatística dos fatores de risco associados à infecção por *Bartonella* spp em gatos revelou que a idade (<1 ano), o acesso à rua, o estado reprodutivo e a presença de pulgas apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Tabelas 3a e 3b).

Tabela 4a. Fatores associados à infecção por *Bartonella* spp. em gatos positivos no teste molecular.

Variáveis		N	Gatos positivos	Prevalência (%)	OR	95% CI	P-valor
Idade < 1 ano	Sim	50	23	46	6,06	2,85-12,87	0,000002
	Não	138	17	12,3	1*		
Sexo	Macho	93	23	24,7	1,5	0,74-3,05	0,33
	Fêmea	95	17	17,9	1*		
Acesso à rua	Sim	101	31	30,7	3,8	1,70-8,62	0,001
	Não	87	9	10,3	1*		
Convívio com gatos	Sim	107	19	17,7	0,61	0,30-1,24	0,23
	Não	81	21	25,9	1*		
Convívio com cães	Sim	50	11	22	1	0,48-2,32	0,95
	Não	138	29	21	1*		
Animal não castrado	Sim	106	35	33	7,6	2,81-20,45	0,00001
	Não	82	5	6,1	1*		
FIV	Sim	176	2	1,1	0,7	0,15-3,45	0,96
	Não	12	38	3,1	1*		
FELV	Sim	3	0	0	0	-----	0,84
	Não	185	40	21,6	1*		
Ferida cutânea	Sim	28	6	21,4	1,0	0,37-2,66	0,8
	Não	159	34	21,3	1*		

Pulgas	Sim	63	24	38,1	4,2	2,02-8,70	0,0001
	Não	125	16	12,8	1*		

*Referência

Tabela 4b. Associação entre gatos positivos e as variáveis acesso à rua, idade até um ano e animal não castrado.

Variáveis	Odds ratio	Intervalo de confiança 95%	P valor (<0,05)
Acesso à rua	3,319	1,39-7,91	0,0069
Idade até um ano	3,529	1,55-8,01	0,0026
Animal não castrado	4,688	1,63-13,45	0,0041

p=0,003
likelihood= 0,0000

4.4 DISCUSSÃO

Resultados semelhantes ao nosso estudo foram observados por Staggemeier et al. (2014), que detectaram infecção por *Bartonella* spp em amostras de sangue de 25% dos gatos avaliados, os quais eram procedentes do Centro de Proteção Animal de dois municípios na região Sul do País, também utilizando técnica de diagnóstico molecular. Em um outro estudo desenvolvido por Souza et al. (2010), realizado em gatos provenientes de um abrigo da cidade de Vassouras (RJ), verificou-se 97,3% de animais positivos à PCR para detecção de *Bartonella* spp. Entretanto, o resultado do presente estudo foi superior ao encontrado por Braga et al. (2012), que investigaram através de PCR a presença de DNA de *Bartonella* spp em gatos domiciliados de área urbana de dois municípios de São Luiz (MA) e detectaram 4,5% de animais positivos. Ao analisar conjuntamente os resultados encontrados nesses estudos realizados anteriormente bem como as populações de felinos investigadas, observa-se que o percentual de infecção são mais elevados nas populações de gatos de abrigos, visto que frequentemente estes animais ficam confinados em grandes grupos e, em sua maioria, apresentam histórico de

parasitismo por pulgas, permitindo a manutenção do agente entre os animais. Portanto, a proximidade entre os gatos faz aumentar o risco de infecção (BRUNT et al., 2006). Contudo, no presente trabalho foram colhidas amostras de animais domiciliados de diferentes residências, demonstrando que a região estudada apresenta elevada ocorrência da infecção por *Bartonella* spp., pois os valores encontrados assemelham-se aos resultados obtidos pelos pesquisadores que avaliaram populações de felinos de abrigos.

A característica climática de cada região é outro fator importante que pode aumentar a prevalência dada infecção, pois influencia no desenvolvimento e multiplicação dos vetores. O clima da região desse estudo apresenta condições favoráveis para manutenção das pulgas (*C. felis*), vetores responsáveis pela transmissão do agente para os felinos. Segundo Dehio e colaboradores (2003), gatos que vivem em regiões mais quentes e úmidas, onde há maior quantidade de vetores, apresentam maior prevalência da infecção por *Bartonella* spp.

Alguns autores relatam que a maioria dos gatos com infecção natural ou experimental por *Bartonella* spp. não apresenta alterações laboratoriais (BREITSCHWERDT, 2010; GULPTILL; YORRAN, 2006). No presente estudo as amostras foram colhidas de animais provenientes de atendimento clínico que apresentavam, portanto, afecções diversas. No entanto, ainda assim não foram observadas diferenças significativas entre os achados hematológicos dos animais positivos e negativos para *Bartonella* spp, exceto na análise geral de plaquetas (tabela 1). Nesse estudo observamos que embora os valores das plaquetas entre os animais positivos e negativos permanecem dentro do valor de normalidade os animais positivos para *Bartonella* apresentam valores superiores quando comparados aos negativos. No entanto não foi encontrado dados semelhantes na literatura.

Durante a análise estatística com teste Qui-quadrado, a presença de pulgas demonstrou-se como fator de risco para infecção por *Bartonella* spp em felinos, no entanto após aplicação da regressão logística, esta variável não permaneceu como fator de risco, permitindo inferir que a presença de pulgas está, provavelmente, associada ao hábito do animal em ter acesso à rua, facilitando assim o contato com os vetores.

Chomel e Kasten (2010) e Brunt et al. (2006) relataram que a prevalência da infecção é maior nos animais até um ano de idade. No presente estudo, os animais com idade inferior a um ano tiveram maior prevalência de infecção e apresentaram seis vezes mais chances de se infectarem em relação aos animais das outras faixas etárias. Loureiro e Hagiwara (2007) têm associado este fato ao decréscimo da imunidade humoral dos filhotes, o que favorece picos de bacteremia nos gatos mais jovens e, portanto, maior prevalência de infecção.

O acesso à rua demonstrou ser outro importante fator de risco associado à infecção por *Bartonella* spp nesse estudo. Esse resultado está de acordo com o obtido por Alves et al. (2009), que detectaram um percentual de animais positivos no grupo dos gatos com acesso à rua (76,9%) em comparação com os gatos que não tinham acesso ao exterior (63,2%). No ambiente externo, os animais têm contato com outros gatos, além de facilitar a infestação por pulgas, fatores importantes para a aquisição da infecção.

Neste estudo, os gatos não castrados apresentaram risco 7,6 vezes maior de se infectarem com *Bartonella* spp. em relação aos gatos castrados. Na literatura consultada não foram encontrados resultados que associam o fato dos animais não serem castrados com a infecção por *Bartonella* spp. No entanto, a prevalência de infecção mais elevada em gatos não castrados parece estar diretamente relacionada ao fato destes animais terem mais acesso à rua e conseqüentemente terem mais contato com outros gatos. Aliado a isso, gatos inteiros frequentemente se envolvem em brigas com outros animais, causando feridas cutâneas, que posteriormente servirão de porta de entrada para o agente, o que aumenta as chances de infecção.

4.5. CONCLUSÕES

Conclui-se que a infecção por *Bartonella* spp., esta presente em felinos domésticos da região Sul da Bahia. Sendo os animais assintomáticos e sem alterações hematológicas significativas. O acesso à rua, animais não castrados e com idade inferior a um ano constituem importantes fatores de risco para infecção por *Bartonella* spp. na região.

5. CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES DE *Bartonella* PRESENTES NOS FELINOS NATURALMENTE INFECTADOS E SEU POTENCIAL DE INFECÇÃO PARA HUMANOS

5.1 INTRODUÇÃO

As bartonelas são bactérias gram negativas, fastidiosas, que infectam diversas espécies de mamíferos, causando nestes uma bacteremia intraeritrocitária crônica (KOSOY et al., 2012). Os gatos domésticos são os hospedeiros naturais das espécies *Bartonella henselae*, *B. koehlerae* e *B. clarridgeiae* (BOULOUIS et al., 2005; CHOMEL; KASTEN, 2010). Os felinos são infectados quando apresentam lesões cutâneas (arranhadura, mordedura, abrasão ou picada de artrópode), que servirão de porta de entrada para o agente presente nas fezes das pulgas (*Ctenocephalides felis*) (BREITSCHWERDT et al., 2010).

Nos seres humanos, as infecções por bactérias do gênero *Bartonella* têm sido associadas a uma grande variedade de manifestações clínicas (BOULOUIS et al., 2005), que podem variar desde uma simples linfadenopatia até um maior comprometimento orgânico caracterizado por doenças sistêmicas (BRUNT et al., 2006). A transmissão da *B. henselae*, *B. koehlerae* e *B. clarridgeiae* ao homem ocorre pela inoculação do agente através das arranhaduras ou mordeduras de gatos infetados pelas bactérias (EDOUARD; RAOULT, 2010).

Diversos estudos realizados em diferentes países demonstraram o caráter endêmico da infecção pelas bactérias do gênero *Bartonella* nas populações de felinos e humanos estudadas (BOULOUIS et al., 2005; CHOMEL et al., 2004; STAGGEMEIER et al., 2010). Entretanto, as pesquisas no Brasil ainda são escassas, principalmente em relação à caracterização molecular das espécies de *Bartonella*. Até o momento, apenas as espécies *B. henselae* e *B. clarridgeiae* foram descritas em felinos domésticos no país.

Objetivou-se com esse estudo realizar a caracterização molecular das espécies de *Bartonella* envolvidas nas infecções dos felinos provenientes dos municípios de Ilhéus e Itabuna, Bahia, bem como pesquisar a presença do DNA do agente em amostras de material coletado das unhas dos animais infectados.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR)

Um total de 14 amostras de sangue que apresentaram maiores valores de quantificação na qPCR para o gene *nuoG*, conforme metodologia realizada e descrita no capítulo I, foram selecionados e submetidos a ensaios de cPCR adicionais tendo como alvos quatro fragmentos gênicos de *Bartonella*: *gltA* (citrato sintase), *rpoB* (subunidade beta da RNA polimerase), *ftsZ* (cell division protein) e região *ITS* (região espaçadora intergênica do 16-23 rRNA) (Tabela 4). Para os ensaios tendo como alvos os genes *ITS* e *ftsZ*, foram incluídas mais quatro amostras, com intenção de obter maior número de produtos visando posterior sequenciamento, totalizando 18 amostras. As reações foram realizadas num volume total final de 25µL, contendo 0,8mM de deoxinucleotídeos (Life Technologies®), 0,5µM de cada oligonucleotídeo iniciador (IDT), 1,5mM de Cloreto de Magnésio (Life Technologies®), 1,25U de Taq DNA Polimerase (Life Technologies®), tampão da PCR, água ultra-pura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) q.s.p. 25µL e 5µL do DNA extraído. DNA de *B. henselae*, *B. clarridgeiae* e/ou *B. koehlerae*, foi utilizado como controle positivo nas reações de cPCR.

Tabela 4. Protocolos utilizados nas reações de PCR convencional para amplificação do DNA dos diferentes genes de *Bartonella* spp.

Região Gênica	Oligonucleotídeos iniciadores	Tamanho do produto	Ciclos de amplificações
<i>gltA</i>	CSH1f (5'-GCGAATGAAGCGTGCCTAAA-3') BhCS1137 (5'-AATGCAAAAAGAACAGTAAACA-3')	350 pb	94°C por 5 min. seguidos de 35 ciclos de 94°C por 30 seg., 54°C por 30 seg, 72°C por 1 min. e 72°C

				por 5 min.
<i>rpoB</i>	1615s ATYACYCATAARCGYCGTCTTT CTGCTCTTGG3')	(5'-	656 pb	95°C por 2 min. seguidos de 35 ciclos de 94°C por 30 seg., 53°C por 30 seg., 72°C por 1 min. e 72°C por 2 min.
	2267as GGATCTAAATCTTCYGTGAC GRATACG-3')	(5'-		
<i>ITS</i>	325s CTTCAGATGATGATCCCAAGCC TTYTGGCG-3')	(5'-	Espécie dependente	95°C por 2 min. 45 ciclos de 94°C por 15 seg., 66°C por 15 seg, 72°C por 15 seg. e 72°C por 5 min.
	1100as GAACCGACGACCCCCTGCTTG CAAAGCA-3'	(5'-		
<i>ftsZ</i>	F- CATATGGTTTTTCACTACTGCYG GTATGG-3')	(5'-	515 pb	94°C por 2 min. 40 ciclos de 94°C por 45 seg., 61°C por 45 seg., 72°C por 45 seg. e 72°C por 7 min.
	R- TTCTTCGCGAATACGATTAGCA GCTTC-3')	(5'-		

5.2.2 Eletroforese em gel

Os produtos da cPCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídeo (0,5 µL/mL) em tampão de corrida TEB pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA). A eletroforese foi realizada a 90V/150mA durante 50 minutos. Para a determinação do tamanho dos produtos amplificados, foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (Life Technologies®). Os resultados foram visualizados e analisados por meio de um transiluminador de luz ultravioleta (ChemiDoc MP Imaging System, Bio Rad®)

5.2.3 Sequenciamento genético

- **Purificação dos amplicómeros**

Após as reações de cPCR, foi realizada a purificação dos produtos amplificados utilizando-se o *Silica Bead DNA Gel Extraction Kit* (Fermentas, São Paulo-SP), de acordo com as recomendações do fabricante.

- **Quantificação dos amplicómeros**

A quantificação do DNA foi realizada em aparelho Nanodrop (Thermo Scientific), por meio da leitura da absorbância de cada amostra.

- **Sequenciamento**

Os sequenciamentos dos amplicómeros obtidos foram realizadas no Centro de Recurso Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO- FCAV/UNESP).

- **Análise do sequenciamento**

A qualidade dos eletroferogramas obtidos por meio do sequenciamento dos produtos amplificados foi visualmente analisada no programa FinchTV 1.4.0. Adicionalmente, as sequências consenso foram obtidas pela análise das sequências *forward* e *reverse* utilizando o programa CAP3 (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/MobylyePortal/portal.py>). Com o propósito de realizar a análise de identidade das sequências, os fragmentos gênicos amplificados foram confrontados com outros previamente depositados no Genbank por meio do Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

5.2.4 Processamento das amostras das unhas

- **Extração do DNA**

As amostras das unhas dos animais que tiveram resultados positivos na qPCR realizada à partir das amostras de sangue (39 animais - Capítulo 1) foram selecionadas para realização de PCR quantitativo. Para extração do DNA, foi utilizado o método do Fenol-Clorofórmio (Anexo 6).

- **Reação em Cadeia da Polimerase (qPCR) para amplificação do gene *nuoG***

Para investigação da presença do DNA de *Bartonella* spp. nas amostras de material coletado das unhas dos gatos, foi realizado o qPCR tendo como alvo o gene *nuoG*, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores F (5'-CAATCTTCTTTTGCTTCACC-3') e R (5'-TCAGGGCTTTATGTGAATAC-3') e a sonda de hidrólise TexasRed-5'-TTYGTCATTTGAACACG-3'[BHQ2a-Q]3'(IDT). As reações de qPCR foram realizadas no Laboratório de Parasitologia da UNESP- Jaboticabal. A amplificação foi realizada utilizando protocolo previamente descrito por André et al. (2016) (Anexo 5).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 cPCR para diagnóstico da infecção por *Bartonella* spp.

No ensaio de cPCR tendo como alvo o gene *gltA*, 42,8% das amostras (6/14) foram positivas, enquanto 71,42% (10/14) foram positivas para o gene *rpoB*. No ensaio que teve como alvo o gene ITS, apenas 22,2% (4/18) das amostras foram positivas, enquanto 72,2% (13/18) foram positivas no ensaio para o gene *ftsZ*.

5.3.2 Sequenciamento

Nas reações de cPCR, 10 amostras amplificaram novamente o DNA de pelo menos um dos genes testados. A partir desse resultado, foram selecionados para sequenciamento os amplicómeros do gene que apresentou melhor desempenho (Tabela 5).

Tabela 5. Espécies de *Bartonella* sequenciadas.

Amostra	Gene sequenciado	Resultado
3	<i>rpoB</i>	<i>B. henselae</i>
21	<i>ftsZ</i>	<i>B. henselae</i>
40	<i>rpoB</i>	<i>B. henselae</i>
78	<i>ftsZ</i>	<i>B. henselae</i>
102	<i>ftsZ</i>	<i>B. henselae</i>
155	<i>rpoB</i>	<i>B. henselae</i>
167	ITS	<i>B. koehlerae</i>
170	<i>rpoB</i>	<i>B. henselae</i>
176	<i>ftsZ</i>	<i>B. henselae</i>
180	<i>rpoB</i>	<i>B. clarridgeae</i>

5.3.3 qPCR das amostras de unhas para diagnóstico da infecção de *Bartonella* spp.

A eficiência média de amplificação (E) dos ensaios de qPCR para diagnóstico da infecção por *Bartonella* spp. foi de: $E = 90,7\%$; $slope = -3.566$; $r^2 = 0.970$. Os valores mínimo e máximo do número de cópias do gene *nuoG* de *Bartonella* spp. detectados foram de 4,32 e 108.000 cópias/ μL , respectivamente.

Das 39 amostras de material das unhas analisadas por meio do qPCR tendo como alvo o gene *nuoG*, 35,9% (14/39) foram positivas para *Bartonella* spp. (Figura 10).

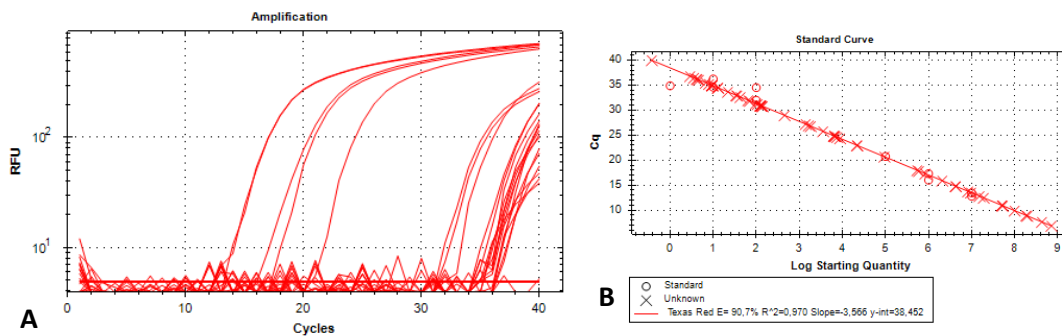


Figura 5: qPCR para *Bartonella* spp. tendo como alvo o gene *nuoG*. **Figura A:** Linhas referentes a amostras positivas para *Bartonella* spp. Verificar linhas ultrapassando a linha horizontal (linha de *threshold*). **B:** Regressão logarítmica das amostras positivas na curva padrão.

5.4 DISCUSSÃO

Os felinos podem ser infectados pelas espécies *B. henselae* (BREITSCHWERDT et al., 2010), *B. clarridgeiae* (BRUNT et al., 2006), *B. koehlerae* (AVIDOR et al., 2004; BRUNT et al., 2006; CHOMEL et al., 2006), *B. quintana* e *B. bovis* (BRUNT et al., 2006), sendo os hospedeiros naturais das três primeiras espécies de *Bartonella* (STAGGEMEIER et al., 2010). Diversos estudos realizados demonstraram a ocorrência de infecção por *B. henselae* no Brasil e em outros países do mundo (BOUCHOUICHA et al., 2009; BRAGA et al., 2012; EDOUARD. RAOULT, 2010; KORDICK et al., 1999). No entanto, a descoberta da espécie *B. koehlerae* é relativamente recente (DROZ et al., 1999) e ainda há poucos relatos na literatura sobre infecção por essa espécie de *Bartonella* (AVIDOR et al., 2004), sendo que até o momento essa espécie ainda não havia sido descrita no Brasil. Segundo Braga e colaboradores (2012), a identificação pouco frequente de *B. koehlerae* deve-se ao fato desta espécie apresentar crescimento mais lento em comparação às demais, dificultando seu isolamento através da cultura. Embora menos frequente, *B. koehlerae* já foi isolada de isolada de pacientes humanos com endocardite (AVIDOR et al., 2004), demonstrando o seu potencial zoonótico. Atualmente há apenas dois relatos na literatura de infecção por *B. clarridgeiae* em gatos no Brasil (BRAGA et al., 2012; STAGGEMEIER et al., 2010). Portanto, o presente estudo descreve pela primeira vez a ocorrência de infecção por *B. koehlerae*

em felinos no Brasil e é o terceiro a identificar infecção por *B. clarridgeiae* em gatos no nosso país. Além disso, esse é o primeiro trabalho realizado no Brasil que teve êxito na identificação do DNA das três espécies de *Bartonella* que têm os gatos domésticos como hospedeiros naturais.

As bartoneloses são doenças zoonóticas que podem ser transmitidas aos seres humanos através de mordidas ou arranhaduras de gatos infectados (EDOUCARD; RAOULT, 2010).

Estes resultados enfatizam a importância de se adotar medidas preventivas para controle da infecção por *Bartonella* nos felinos.

5.5 CONCLUSÕES

As espécies de *B. henselae*, *B. clarridgeiae* e *B. koehlerae* estão presentes nos felinos domésticos residentes da região Sul da Bahia, sendo a *B. henselae* a espécie mais prevalente. Os gatos positivos são potenciais transmissores da infecção para os humanos e outros mamíferos através da inoculação do agente presente nas unhas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos a partir deste estudo permitem concluir que a infecção por *Bartonella* spp. é uma zoonose prevalente nos felinos domésticos da região, especialmente na população semi-domiciliada e não castrada. Isso enfatiza a importância de adoção de medidas adequadas de prevenção e controle para redução do risco de transmissão para a população humana. As espécies encontradas na população estudada foram a *B. henselae*, *B. clarridgeiae* e *B. koehlerae*. A detecção de DNA do agente nas unhas dos gatos positivos destaca o potencial de transmissão para os humanos, por meio da inoculação da bactéria em feridas feitas por arranhaduras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, A. S., MILHANO, N., SANTOS-SILVA, M., SANTOS, A. S., VILHENA, M., SOUSA, R. Evidence of *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in domestic, shelter and stray cat blood and fleas, Portugal. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 1-3, 2009

ANDERSSON, S.G.E.; KEMPF, V.A.J. Host cell modulation by human, animal and plant pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 293, p. 463 – 470, 2004.

ANDRÉ, M. R., DUMLER, J. S.; HERRERA, H. M.; GONÇALVES, L. R.; SOUSA, K. C. M.; SCORPIO, D. G.; SANTIS, A. C. G. A.; DOMINOS, I. H.; MACEDO, G. C.; MACHADO, R. Z. Assessment of a quantitative 5' nuclease real-time polymerase chain reaction using the nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase gamma subunit (nuoG) for *Bartonella* species in domiciled and stray cats in Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. DOI: 10.1177/1098612X15593787

AVIDOR, B.; GRAIDY, M.; EFRAT, G.; LEIBOWITZ, C.; SHAPIRA, G.; SCHATTNER, A.; ZIMHONY, O.; GILADI, M. *Bartonella koehlerae*, a new cat-associated agent of culture-negative human endocarditis. **Journal of Clinical Microbiology**. v.42, n.8, p.3462–3468. 2004.

BILLETER, S. A.; LEVY, M. G.; CHOMEL, B. B.; BREITSCHWERDT, E. B. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. **Medical and Veterinary Entomology**. v. 22, p.1-15. 2008.

BOWN, K. J.; BENNET, M.; BEGON, M.; Flea-borne *Bartonella grahamii* and *Bartonella taylorii* in bank voles. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.10, n. 4, p. 684-687, 2004.

BOUCHOUICHA, R.; DURAND, B., MONTEIL, M.; CHOMEL, B. B.; BERRICH, M.; ARVAND, M.; BIRTLES, R. J.; BREITSCHWERDT, E. B.; KOEHLER, J. E.; MAGI, R.; MARUYAMA, S.; KASTEN, R.; PETIT, E.; BOULOUIS, H. J.; HADDAD, N. Molecular epidemiology of feline and human *Bartonella henselae* isolates. **Emerging Infectious Diseases**. v.15, p.813–816. 2009.

BOULOUIS, H.J.; CHANG, C.C.; HENN, J. B.; KASTEN, R. W.; CHOMEL, B. B. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. **Vet. Res**. v. 36, p383-410. 2005.

BRAGA, M. S. C. O.; DINIZ, P. P. V. P.; ANDRÉ, M. R.; BORTOLI, C. P.; MACHADO, R. Z. Molecular characterisation of *Bartonella* species in cats from São Luís, state of Maranhão, north-eastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6. p 772-777, 2012.

BREITSCHWERDT, E. B; KORDICK, D. L. *Bartonella* Infection in animals: carrier ship, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. **Clinical Microbiology Review**, v.13, n. 3, p.428-438. 2000.

BREITSCHWERDT, E. B. Feline bartonellosis and cat scratch disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.123, n.167-171, 2008.

BREITSCHWERDT, E. B; MAGGI, R. G; CHOMEL, B. B.; LAPPIN, M. R. Bartonellosis: an emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings. **Journal of veterinary emergency and critical care**, v. 20, n. 1, p 8-30, 2010.

BRENNER, D. J.; O'CONNOR, S. P.; WINKLER, H. H.; STEIGERWALT, A. G.; Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb.nov., *Bartonella vinsonii* comb.nov., *Bartonella henselae* comb.nov., and *Bartonella elizabethae* comb.nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from the order *Rickettsiales*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.43, n.4, p.777-786, 1993.

BRUNT, J.; GUPTILL, L.; KORDICK, D.L.; KUDRAK, S.; LAPPIN, M.R. American Association of Feline Practitioners 2006: Panel report on diagnosis, treatment, and prevention of *Bartonella* spp. infections. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.8, p. 213-226, 2006.

BUFFET, J-P.; KOSOY, Y. M.; VAYSSIER-TAUSSAT, M. Natural history of *Bartonella*-infecting rodents in light of new knowledge on genomics, diversity and evolution. Review. **Future Microbiology**, Londres, v. 8, n. 9, p. 1117-1128, 2013.

CHOMEL, B.B.; BOULOUIS, H.J.; MARUYAMA, S.; BREITSHWERDT, E.B. *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. **Emerging Infectious Diseases**. v. 12, n.3, p. 389-394, 2006

CHOMEL, B.B.; BOULOUIS, H.J.; BREITSHWERDT, E.B.; KASTEN, R. W.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; BIRTLES, R. J.; KOEHLER, J. E.; DEHIO, C. Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. **Veterinary Research**, v. 40, n2, p29, 2009.

CHOMEL, B. B.; KASTEN, R. W. Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p.743-750. 2010.

CLARRIDGE, J. E. 3rd, RAICH, T. J.; PIRWANI, D.; SIMON, B.; TSAI, L.; RODRIGUEZ-BARRADAS, M. C.; REGNERY, R.; ZOLLO, A.; JONES, D. C.; RAMBO, C. Strategy to detect and identify *Bartonella* species in routine clinical laboratory yields *Bartonella henselae* from human immunodeficiency virus-positive patient and unique *Bartonella* strain from his cat. **Journal of Clinical Microbiology**. v.33, n.8,p.2107–2113. 1995.

COTTÉ, V.; BONNET, S.; Le RHUN, D.; Le NAOUR, E.; CHAUVIN, A., BOULOUIS, H. J.; LECUELLE, B.; LILIN, T.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.

Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. **Emerging Infectious Diseases**. v.14, n. 7, p.1074-1080. 2008.

CRISSIUMA, A. L.; FAVACHO, A.; GERSHONY, L.; ALMEIDA, F. M.; GOMES, R.; MARES-GUIA, A.; ROZENTA, T.; BARREIRA, J.; LEMOS, E.; LABARTHE, N. Prevalence of *Bartonella* species DNA and antibodies in cats (*Felis catus*) submitted to a spay/neuter program in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.13, n.2, p:149-151, 2011.

DEHIO, C. Recent progress in understanding *Bartonella*-induced vascular proliferation. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 61–65, 2003.

DROZ, S.; CHI, B.; HORN, E.; STEIGERWALT, A. G.; WHITNEY, A. N.; BRENNER, D. J. *Bartonella koehlerae* sp. nov., Isolated from Cats. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 4, v. 37, p. 1117-1122, 1999.

DRUMMOND, Marina Ravoni. *Detecção Microbiológica e Molecular da Bacteremia por Bartonella spp. em gatos*. 2012. 80f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) -Faculdade de Ciências Médicas. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

DUNCAN, A. W.; MAGGI, R. G.; BREITSCHWERDT, E. B. A combined approach for the enhanced detection and isolation of *Bartonella* species in dog blood samples: pre-enrichment liquid culture followed by PCR and subculture onto agar plates. **Journal of Microbiological Methods**, v.69, p.273–281. 2007.

EDOUCARD, S.; RAOULT, D. *Bartonella henselae*, un agent d'infection subiquitaires. **Médecineet maladies infectieuses**, v. 40, p. 319-330, 2010

FLORIN, T. A.; ZAOUTIS, T. E.; ZAOUTIS, L. Beyond Cat-Scratch Disease: widening spectrum of *B. henselae* infection. **Pediatrics**. v. 121, p.1413-1425, 2008.

GUPTILL, L.; SLATER, L.; WU, C. C.; LIN, T. L.; GLICKMAN, L. T.; WELCH, D. F.; HOGENESCH, H. Experimental infection of young specific pathogen-free cats with *Bartonella henselae*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n.1, p. 206 – 216, 1997.

GUPTILL, L. Bartonellosis. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v.33, p. 809-825,2003.

GUPTILL, L.; YORRAN, L. Feline Bartonellosis. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**, 3 ed, p. 511-518, 2006.

GUPTILL, L. Bartonellosis. **Veterinary Microbiology**, v 140, p.347-359, 2010.

GUTIÉRREZ, R; MORICK, D; GROSS, I; WINKLER, R; ABDEEN, Z; HARRUS, H. *Bartonellae* in Domestic and Stray Cats from Israel: Comparison of Bacterial Cultures and High-Resolution Melt Real-Time PCR As Diagnostic Methods. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. V13, n12, 857-864. 2013.

HACKETT, T.B.; JENSEN, W.A.; LEHMAN, T.L.; HOHENHAUS, A.E.; CRAWFORD, P.C.; GIGER, U.; LAPPIN, M.R. Prevalence of DNA of *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', *Anaplasma phagocytophilum*, and species of *Bartonella*, *Neorickettsia* and *Ehrlichia* in cats used as blood donors in the United States. **Journal of the American Medical Association**, v. 229, n. 5, p. 700-705, 2006.

HARMS, A.; DEHIO, C. Intruders below the radar: molecular pathogenesis of *Bartonella* spp. **Clinical Microbiology**, v25, n. 1, p.42-78, 2012.

JACOMO, V.; KELLY, P. J.; RAOULT, D. Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's Postulate). **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 9, p.8-18. 2002.

KABEYA, H.; SASE, M.; YAMASHITA, M.; MARUYAMA, S. Predominant T helper 2 immune responses against *Bartonella henselae* in naturally infected cats. **Microbiology and Immunology**, v.50, n.3, p. 171-178, 2006.

KAISER, P.O.; RIESS, T.; O'ROURKE, F.; LINKE, D.; KEMPF, V A. *Bartonella* spp.: throwing light on uncommon human infections. **International Journal of Medical Microbiology : IJMM**, v. 301, n.1, p.7-15, 2011.

KORDICK, D.L.; BROWN, T.T.; SHIN, K.; BREITSCHWERDT, E. B. Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1536-1547, 1999.

KOSOY, M. Y.; REGNERY, R. L.; KOSAYA, O. I.; JONES, D. C.; MARSTON, E. L.; CHILDS, J. E. Isolation of *Bartonella* spp. from embryos and neonates of naturally infected rodents. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 34, n. 2, p. 305-309, 1998

LAMPS, L. W.; SCOTT, M. A. Cat Scratch Disease: historic, clinical and pathologic perspectives. **American Journal of Clinical Pathology**, p.71-80, 2004.

LAPPIN, M. R.; GRIFFIN, B.; BRUNT, J.; RILEY, A.; BURNEY, D.; HAWLEY, J.; BREWER, M. M.; JENSEN, W. A. Prevalence of *Bartonella* species, *Ehrlichia* species, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Neorickettsia risticii* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.8, p.85-90, 2006.

LOUREIRO, V. S, HAGIWARA, M. Levantamento de anticorpos anti-Bartonella henselae em felinos domiciliados na cidade de São Paulo, Estado de São Paulo e sua importância em saúde pública. *Revista Brasileira de Ciência Veterenária*. v.14, n.1, p39-42. 2007.

MEHOCK, J. R.; GREENE, C. E.; GHERARDINI, F. C.; HAHN, T.W.; KRAUSE, D. C. *Bartonella henselae* invasion of feline erythrocytes in vitro. **Infection and Immunity**,v. 66, p. 3462-3466,1998.

MOGOLLON-PASAPERA, E.; OTVOS L, JR.; GIORDANO, A.; CASSONE, M. Bartonella: emerging pathogen or emerging awareness? **International Society for Infectious Diseases**,v.13, n.1, p.3-8, 2009.

OSKOUIZADEH, K; ZAHRAEI-SALEHEI, T.; ALEDAVOOD, S. J. Detection of *Bartonella henselae* in domestic cats' saliva. **Iranian Journal of Microbiology**. n.2, v.2, p.80–84. 2010.

RELMAN, D. A.; LOUTIT, J. S.; SCHMIDT, T. M.; FALKOW, S.; TOMPKINS, L. S. The agent of bacillary angiomatosis.An approach to the identification of uncultured pathogens. **The New England Journal of Medicine**, v.323, p.1573-1580, 1990.

RESTO-RUIZ, S.; BURGESS, A.; ANDERSON, B.E. The role of host immune response in pathogenesis of *Bartonella henselae*. **DNA Cell Biology**, v. 22, p. 431-440, 2003.

SOUZA, A. M. A. D.; GUTERRES, A.; GOMES, R.; FAVACHO, A. R. M.; MOREIRA, N. S.; MAIA, L. M. P.; ROZENTAL, T.; FILHO, R. A. T.; CERQUEIRA, A. M. F.; LEMOS, E. R. S.; ALMOSNY, N. R. P. Bartonellosis: molecular and serological analysis in cats from Rio de Janeiro – Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Science**,v.17, p.7-11, 2010.

STAGGEMEIER, R.; VENKER, C. A.; KLEIN, D. H.; PETRY, M.; SPILKI, F. R.; CANTARELLI, V. V. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats in the south of Brazil: a molecular study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.105, n.7, p. 873-878. 2010.

STAGGEMEIER, R; PILGER, D. A.; SPILKI, F. R.; CANTARELLI, V. V. MULTIPLEX SYBR® GREEN-REAL TIME PCR (qPCR) ASSAY FOR THE DETECTION AND DIFFERENTIATION OF *Bartonella henselae* AND *Bartonella clarridgeiae* IN CATS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. n. 56, v. 2, p. 93:95, 2014.

STILES, J. Bartonellosis in cats: a role in uveitis? **Veterinary Ophthalmology**. v. 14, p. 9-14, 2011.

THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica Veterinária**, 1 ed., Roca, São Paulo, 582 p., 2007.

TSAI, Y. L.; CHANG, C. C.; CHUANG, S. T.; CHOMEL, B. B. *Bartonella* species and their ectoparasites: selective host adaptation or strain selection between the vector and the mammalian host? **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, p.299-314 2011.

ANEXO 1

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

FICHA DE ATENDIMENTO CLÍNICO

DATA: ____/____/____

REGISTRO DO PACIENTE: _____

RESENHA DO PACIENTE

NOME: ESPÉCIE: FELINO RAÇA:

PELAGEM: IDADE:..... SEXO: CASTRADO:

.....

DADOS DO PROPRIETÁRIO

NOME:.....

ENDEREÇO:.....

... CEP:TELEFONE:

.....

HISTÓRICO E ANAMNESE

HISTORICO DE BRIGAS COM OUTROS GATOS

.....

H/A

CONTACTANTES: ACESSO À RUA:

PRESENÇA DE PULGAS

MÉDICO VETERINÁRIO

ANEXO 2.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA BACTEREMIA EM GATOS NATURALMENTE INFECTADOS POR *Bartonella* sp. E DO POTENCIAL DE INFECÇÃO DE SERES HUMANOS

Nome do (a) Pesquisador (a) Responsável: Thais Nascimento de Andrade Oliveira.

Nome dos demais participantes: Prof. Dra. Fabiana Lessa Silva e Prof. Dra. Renata Santiago Albuquerque.

O Sr. (sra.) está sendo convidada (o) a autorizar a participação de seu(s) animal(is) nesta pesquisa que tem como finalidade detectar a presença da bactéria *Bartonella henselae*. Ao participar deste estudo o Sr. (Sra.) permitirá que o (a) pesquisador (a) realize uma avaliação clínica de seu animal, bem como a coleta de material hematológico e das unhas dos mesmos. O Sr. (Sra.) tem liberdade de se recusar a participar.

A participação nesta pesquisa não traz complicações legais. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Princípios Éticos na Experimentação Animal segundo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Lei Federal 11794, de 08 de outubro de 2008. Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente os pesquisadores terão conhecimento dos dados.

O Sr. (Sra.) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem:

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa.

Eu, _____,
portador de RG/CPF nº _____, telefone: _____, residente
à _____,
proprietário/responsável _____,
_____, espécie FELINA, raça _____, sexo _____,
autorizo a utilizar o animal como sujeito de pesquisa para fins didáticos e científicos.

Assinatura do Proprietário

Data: ____/____/____.

ANEXO 3.

Ficha Hematológica

Animal: _____

Data: ____/____/____

Proprietário: _____

Número da ficha: _____

Eritograma	Valor	Leucograma	Valor	
Hematimetria x 1000/ μ L		Leucometria Global		
Hematócrito %		Leucometria Específica	Relativo	Absoluto
Hemoglobina g/dL		Mielócitos		
VGM		Metamelócitos		
CHGM		Bastões		
PPTs g/dL		Segmentados		
Plaquetas/ μ m ³		Linfócitos		
Fibrinogênio mg/dL		Monócitos		
Reticulócitos-relativo		Eosinófilos		
Reticulócitos-absoluto		Basófilos		

Observações:

EXAMES BIOQUIMICOS

<input type="radio"/> Exames	Resultados	<input type="radio"/> Exames	Resultados
<input type="radio"/> Uréia Sérica (mg/dL)		<input type="radio"/> Bilirrubina Direta (mg/dL)	
<input type="radio"/> Creatinina Sérica (mg/dL)		<input type="radio"/> Bilirrubina Indireta (mg/dL)	
<input type="radio"/> ALT/TGP (U/mL)		Coagulograma:	
<input type="radio"/> AST/TGO (U/mL)		<input type="radio"/> Tempo de Protrombina (s)	
<input type="radio"/> Fosfatase Alcalina (U/L)		<input type="radio"/> Tempo de Tromboplastina P. Ativa (s)	
<input type="radio"/> Gama GT (U/L)		<input type="radio"/> Glicose	
<input type="radio"/> Proteína Total (g/dL)		<input type="radio"/> Potássio (K+)	
<input type="radio"/> Albumina (g/dL)		Outros:	
<input type="radio"/> Lipase (U/L)		<input type="radio"/>	
<input type="radio"/> Amilase (U/L)		<input type="radio"/>	
<input type="radio"/> Cálcio (mg/dL)		<input type="radio"/>	
<input type="radio"/> Fósforo (mg/dL)		<input type="radio"/>	
<input type="radio"/> Magnésio (mg/dL)		<input type="radio"/>	
<input type="radio"/> Bilirrubina Total (mg/dL)		<input type="radio"/>	

ANEXO 4

Protocolo de extração de DNA PROMEGA

- 1) Descongelar completamente as amostras e homogeneizar por 10 minutos
- 2) Adicionar 20 μL de proteinase K a tubos eppendorfs de 1,5 ml
- 3) Adicionar 200 μL de sangue nos tubos com proteinase e homogeneizar brevemente
- 4) Adicionar 200 μL de Cells Lysis Buffer (CLB) e misturar no vórtex por 10 segundos
- 5) Encubar a 56°C por 10 minutos
- 6) Separa e identificar Collections Tubs e colocar os tubos com filtro dentro
- 7) Da amostra com sangue, adicionar 250 μL de Binding Buffer (BBA) e vórtex por 10 segundos, ou até a mistura ficar verde escura
- 8) Transferir a mistura para tubos com filtro
- 9) Centrifugar a velocidade máxima por 1 minuto
- 10) Transferir os tubos com filtro para novos collections tubos (descartar os tubos com filtrado)
- 11) Adicionar aos tubos com filtro 500 μL de Collum Wash Solution (CWD)
- 12) Centrifugar a velocidade máxima por 3 minutos
- 13) Descartar o filtrado e repetir as etapas 11 e 12
- 14) Transferir os tubos com filtro pra novos tubos de 1,5 ml
- 15) adicionar 50 a 200 μL de Nuclease Free Water e centrifugar por 1 minuto
- 16) Descartar o tubo com filtro e armazenar o filtrado.

ANEXO 5

Protocolo de qPCR dirigido ao gene *nuoG*

A amplificação foi realizada utilizando uma reação com volume final de 10µL, contendo 1µL do DNA-amostra, 0,6µM de cada oligonucleotídeo iniciador e sonda de hidrólise, 5µL de tampão da PCR (Go Taq Probe qPCR Master Mix, Promega) e água ultra-pura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) suficiente para completar o volume final de 10µL. As condições de amplificação foram de 95°C por 3 minutos, seguidos por 40 ciclos a 95°C por 10 segundos e 52,8°C por 30 segundos (ANDRÉ et al., 2016). As reações de qPCR foram realizadas utilizando o termociclador C1000 - CFX96 (Bio Rad®).

ANEXO 6

Protocolo de extração de DNA com Fenol Clorofórmio

- 1) Aquecer tampão de lise em banho-maria a 65°C por 10 minutos
- 2) Em um micro tubo de 2 ml adicionar:
 - 1,6 µL de 2-mercapto
 - 800 µL de tampão de lise
 - 250 µL de amostra de sangue
- 3) Levar ao vórtex por 15 segundos
- 4) Colocar no banho seco 65°C por 40 minutos e agitar no vórtex a cada 15 minutos
- 5) Adicionar 300 µL de acetato de potássio 5 mol. e homogeneizar suavemente por 3 minutos
- 6) Colocar as amostras no gelo por 30 minutos
- 7) Centrifugar por 10 minutos a 10°C a 12.000G
- 8) Identificar novos tubos de 2ml
- 9) Coletar o sobrenadante com ponteira de 1000 µL
- 10) Adicionar 600 µL de clorofórmio álcool isoamílico
- 11) Vórtex por 15 segundos e mais uma vez por 2 segundos
- 12) Centrifugar por 10 minutos a 10°C a 12.000G
- 13) Identificar novo micro tubo de 2 ml
- 14) Colher o sobrenadante 900 µL (sem romper a membrana)
- 15) Adicionar 1 ml de álcool absoluto
- 16) Armazenar overnight a -20°C
- 17) Homogeneizar por inversão duas vezes
- 18) Centrifugar por 20 minutos a 10°C a 12.000G
- 19) Descartar sobrenadante e deixar escorrer com o tubo invertido
- 20) Adicionar 800 µL de álcool 70%
- 21) Centrifugar por 20 minutos a 10°C a 12.000G
- 22) Descartar sobrenadante e deixar escorrer com o tubo invertido
- 23) Adicionar 60 µL de tampão TE e colocar na geladeira por 30 minutos
- 24) Armazenar no freezer.