

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós - Graduação em Ciências Fisiológicas

Tese de Doutorado

DETECÇÃO POR PCR DA PRESENÇA DA
BACTÉRIA *BARTONELLA* EM HUMANOS COM
CARDIOPATIAS

FABRÍCIO GONÇALVES CORRÊA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Fisiológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas, Área de concentração: Fisiologia.

São Carlos

2008

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

C823dp

Corrêa, Fabrício Gonçalves.

Detecção por PCR da presença da bactéria *bartonella* em humanos com cardiopatias / Fabrício Gonçalves Corrêa. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

121 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Bactéria anaeróbica. 2. Cardiopatia congênita. 3. Reação em cadeia de polimerase. 4. Bartonella. 5. Zoonoses. I. Título.

CDD: 612.17 (20ª)

Universidade Federal de São Carlos
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Defesa de Tese de Fabrício Gonçalves Corrêa

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo..... *Heloisa Selistre*

Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva..... *Flávio Henrique da Silva*

Prof. Dr. José Carlos Pachón Mateos..... *José Carlos Pachón Mateos*

Profa. Dra. Audrey Borghi e Silva..... *Audrey Borghi e Silva*

Profa. Dra. Maria Célia Bertolini..... *Maria Célia Bertolini*

ORIENTADORA

Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo

CO-ORIENTADOR

Prof. Dr. Roberto Mário Machado Verzola

Dedico este trabalho:

À memória dos meus ávos, Nair, Hélio e Osvaldo.

À minha avó Isaura.

Aos meus pais, Adilson e Lisete.

À meu irmão, Rogério.

À minha amada esposa Graciele.

E a todas as pessoas que acreditaram em mim.

“Carpe Diem”

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, agradeço em especial pela orientação, apoio e incentivo durante o trabalho. Também pela sinceridade e a amizade que construímos durante a pesquisa. Jamais conseguirei encontrar palavras para demonstrar o meu agradecimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, agradeço pelo apoio e paciência.

A minha amada esposa Graciele, agradeço pela sua compreensão, companheirismo, paciência, apoio, carinho e amor incondicional.

A meus pais Adilson e Lisete, agradeço pelos anos dedicados a minha formação, pelo meu caráter, pelos conselhos indispensáveis nos momentos certos e por todo apoio, carinho e amor. Serei eternamente grato!

A meu querido irmão Rogério, agradeço pelo companheirismo nos momentos decisivos de minha vida, pelo incentivo, confiança, amizade e principalmente pelo carinho fraterno.

A queridos tios Arlene e Gilberto, agradeço pela amizade, pelas palavras de incentivo, pela presença significativa em momentos importantes e decisivos da minha vida e pela indispensável contribuição neste trabalho.

Ao meu sogro Prof. Dr. Clóvis I. Biscegli, a minha sogra Leila e meus cunhados Neto e Lucélia, agradeço por fazer parte dessa família, pelos conselhos que foram de fundamental importância, pelo incentivo e apoio emocional e técnico.

Agradeço ao amigo Prof. Gualberto Ruas, por mostrar que a simplicidade e bom humor são boas formas de se viver. Também pela companhia em momentos difíceis ou de alegria.

Aos amigos de laboratório com os quais foram compartilhados conhecimentos e experiências: Cristina, Marcelo, Mônica, Caroline, Raquel, Ademar, Juliana e Carmen agradeço pelo apoio, auxílio técnico, discussões, companheirismo e por todos os momentos alegres que passamos juntos.

A minha querida amiga Rita de Cássia, agradeço por toda a sua paciência, dedicação, sinceridade, confiança e por todo apoio dado neste trabalho.

Aos amigos e colaboradores da Universidade de Federal de São Carlos-UFSCar: Prof. Dr. Clóvis Wesley O. de Souza, Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva, agradeço por toda ajuda e incentivos que foram fundamentais e imprescindíveis para realização deste trabalho.

A Dra. Auristela Ramos e ao Dr. Ricardo Manrique médicos cardiologistas do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, agradeço pela colaboração e a seleção dos pacientes cardiopatas desta pesquisa.

Aos meus amigos da pós-graduação, agradeço os momentos maravilhosos de convivência e pela amizade que construímos nesses anos.

À especialmente a Fapesp (*Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo*) e ao CNPq que pelo auxílio financeiro.

Agradeço também a todos os demais que contribuíram direta ou indiretamente para o bom andamento deste trabalho e que certamente foram indispensáveis.

RESUMO

Estudos comprovam a existência de casos de arritmia cardíaca, miocardite e endocardite infecciosa causados por infecção pela bactéria *Bartonella vinsonni* subespécie *berkhoffii* em humanos. Há uma grande evidência que a espécie da *Bartonella vinsonni* é um patógeno cardíaco importante em humanos e cães. A *Bartonella sp* está associada a uma variedade de doenças humanas, sendo considerado uma zoonose. O objetivo deste trabalho foi identificar e correlacionar a bactéria *Bartonella vinsonni* subespécie *berkhoffii* com a patologia cardíaca utilizando oligonucleotídeos específicos Bh16SF e Bh16SR, que amplificam um segmento de 185 pb para o gene 16SrRNA e averiguar, por PCR, a presença de bactérias em leucócitos humanos. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1,5% para confirmação da amplificação do fragmento de DNA de 185 pb que indica a presença da bactéria. Trinta e oito (39%) dos 96 humanos cardiopatas e dezesseis (15%) dos 104 humanos do grupo controle apresentaram amplificação positiva por PCR para a bactéria *Bartonella vinsonni* subespécie *berkhoffii*, sugerindo uma correlação entre a bactéria e a cardiopatia. Análise por sequenciamento do material amplificado confirmou a presença da *Bartonella vinsonni* subespécie *berkhoffii*.

Estes achados confirmam a existência de uma correlação entre a presença da bactéria *Bartonella vinsonni* subespécie *berkhoffii* e problemas cardíacos em humanos.

ABSTRACT

Many studies have demonstrated that infection by *Bartonella vinsonni* subspecies *berkhoffii* may cause cardiac arrhythmia, myocarditis and infectious endocarditis in humans. There is strong evidence that *Bartonella vinsonni* is an important cardiac pathogen in both humans and dogs. The *Bartonella sp* has been associated with several human diseases, being responsible for a number of zoonoses. The aim of this work was to identify and correlate the *Bartonella vinsonni* subsp. *berkhoffii* with the cardiac disease by using specific oligonucleotides as Bh16SF and Bh16SR, which amplify a 185-bp fragment of 16S rRNA. The PCR technique was used for detection of this bacterium in human leukocytes. The amplification products were analyzed in 1.5% agarose gel in order to confirm the 185-bp fragment, which in turn indicates the presence of the bacterium. Thirty eight (39%) out of the 96 humans with cardiopathies as well as 16 (15%) out of the 104 humans from the control group showed positive PCR amplification for *Bartonella vinsonni* subsp. *berkhoffii*, thus suggesting a positive correlation of this subspecies with the cardiopathies. Sequencing of the amplified product confirmed the presence of *Bartonella vinsonni* subspecies *berkhoffii*.

ABREVIATURAS

AB: Angiomatose bacilar

ADP: adenosina difosfato

Å: Angstrom, unidade de medida que corresponde a 10⁻¹⁰ metros.

B: Bartonella

Bac: bacteremia

BLAST: programa computacional para busca de homologias locais entre DNAs ou proteínas (*Basic Local Alignment Search Tool*).

°C: graus Celcius

CO₂: Dióxido de Carbono

DAG: Doença da Arranhadura do Gato

DC: Doença de Carrión

DNA: ácido desoxirribonucléico (*Deoxiribonucleic acid*)

dNTP: desoxinucleotídeos trifosfatados

dTTP: deoxitimidina trifosfato (nucleotídeo pirimidínico)

ECG: eletrocardiograma

EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético

End: endocardite

FT: Febre das Trincheiras

GC: Grupo Controle

GCard: Grupo Cardiopata

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

IgG: Imunoglobulina tipo G

Kb: Marcador ladder

KCl: Cloreto de potássio

LC: Linfadenopatia Crônica

M: molar

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

mM: milimolar

ml: mililitro

μl: microlitro

MULTALIN: Multiple sequence alignment with hierarchical clustering

NaCl: Cloreto de Sódio

Ng: nanograma

NCBI: Centro de Informações Biotecnológicas dos Estados Unidos da América
(*National Center for Biotechnology Information*)

pb: pares de bases

PCR: reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

pH: potencial hidrogeniônico

rpm: rotações por minuto

Sep: septicemia

Spp: espécie

Subsp.: subespécie

SDS: duodecil sulfato de sódio ou lauril sulfato de sódio (*Sodium Duodecyl Sulfate*)

TBS: solução tamponada com NaCl e Tris (*Tris Buffered Saline*)

TRITON X-100

TRIS: tris(hidroximetil)aminometano

Tri – Hcl

u.s.p.: unidades suficiente para

V₀: volume inicial

%: Porcentagem

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação entre espécies de <i>Bartonella</i> , ano de descrição, reservatórios e principais doenças humanas.....	5
Tabela 2: Patologias causadas pelas espécies da <i>Bartonella</i> em pessoas.....	31
Tabela 3: Representação de todas as espécies da bactéria <i>Bartonella</i> , os hospedeiros que servem como fonte de transmissão e infecção da doença....	32
Tabela 4: Esquema antibiótico proposto para as doenças causadas pelas espécies de <i>Bartonella</i>	35
Tabela 5: Como o qui-quadrado calculado é maior que o tabelado, rejeito H_0 ao nível de 5% de significância, isto é, existe associação entre a bactéria e a cardiopatia, ou os dados evidenciam dependência entre os fatores bactéria e cardiopatia.....	66
Tabela 6: Distribuição da presença da bactéria com PCR positivo por Grupos e sexo.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Antiga classificação das bactérias dos gêneros <i>Bartonella</i> , <i>Rochalimae</i> e <i>Grahamella</i>	1
Figura 2: Classificação atual da família <i>Bartonellaceae</i>	4
Figura 3: História natural da infecção pela <i>B. bacilliformis</i>	10
Figura 4: História natural da infecção pela <i>B. quintana</i>	12
Figura 5: História natural da infecção pela <i>B. henselae</i>	15
Figura 6: Árvore parcimônica para <i>Bartonella sp</i> , apresenta 98% de homologia nas sequências dos genes 16SrRNA.....	34
Figura 7: Representação esquemática do Cluster 16S – 23S de <i>E. Coli</i>	41
Figura 8: Representação esquemática do 16SrRNA de bactéria. A região do 16S amplificada neste trabalho está em destaque.....	42
Figura 9: Programa utilizado nas reações de PCR. Visando a amplificação do fragmento da <i>Bartonella vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	47
Figura 10: Análise dos produtos obtidos por amplificação de PCR de segmento do gene 16SrRNA da bactéria <i>Bartonella vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i> a partir do DNA extraído das colônias bacterianas total de 5 animais. Linha 1, Marcador Ladder 1 Kb (GIBCO); linha 2, 3, 4, 5, 6 amostras das colônias bacterianas, observando a presença das bandas esperadas. As setas indicam as bandas referentes ao 16SrRNA.....	53
Figura 11: Análise dos produtos obtidos por amplificação de PCR de segmento do gene 16SrRNA da bactéria <i>Bartonella vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i> a partir do DNA extraído de 5 ectoparasitas. Linha 1, Marcador Ladder 1 kb (GIBCO); linhas I, II, III, IV, V, amostras dos ectoparasitas, observando a presença das bandas esperadas. As setas indicam as bandas referentes ao 16SrRNA.....	54

Figura 12: Análise dos produtos obtidos por amplificação de PCR de segmento do gene 16SrRNA da bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* a partir do DNA extraído de sangue total de humanos do grupo controle. Linha 1, Marcador Ladder 1 Kb (GIBCO); linha 2, 3, 4, 5, 6 amostras de humanos do grupo controle. Apenas na linha 3 observa-se a presença do fragmento de 185 pb. A seta indica as bandas referentes ao 16SrRNA.....57

Figura 13: Análise dos produtos obtidos por amplificação de PCR de segmento do gene 16SrRNA da bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* a partir do DNA extraído de sangue total de humanos do grupo controle. Linha 1, Marcador Ladder 1 Kb (GIBCO); linha 2, 3, 4, 5, 6 amostras de humanos do grupo controle. Apenas na linha 2 observa-se a presença do fragmento de 185 pb. A seta indica as bandas referentes ao 16SrRNA.....58

Figura 14: Análise dos produtos obtidos por amplificação de PCR de segmento do gene 16SrRNA da bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* a partir do DNA extraído de sangue total de humanos cardiopatas. Linha 1, Marcador Ladder 1 Kb (GIBCO); linha 2, 3, 4, 5, 6 amostras de humanos cardiopatas (endocardite), observando o fragmento de 185 pb, confirmando a presença da banda esperada. A seta indica as bandas referentes ao 16SrRNA.....59

Figura 15: Análise dos produtos obtidos por amplificação de PCR de segmento do gene 16SrRNA da bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* a partir do DNA extraído de sangue total de humanos cardiopatas. Linha 1, Marcador Ladder 1 Kb (GIBCO); linha 2, 3, 4, 5, 6 e 7 amostras de humanos cardiopatas (endocardite), observando o fragmento de 185 pb nas linhas 2, 4, 5, 6 confirmando a presença da banda esperada. A seta indica as bandas referentes ao 16SrRNA.....61

Figura 16: Análise dos produtos obtidos por amplificação de PCR de segmento do gene 16SrRNA da bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* a partir do DNA extraído de sangue total de humanos cardiopatas. Linha 1, Marcador Ladder 1 Kb (GIBCO); linha 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 amostras de humanos cardiopatas (arritmia cardíaca), observando o fragmento de 185 pb nas linhas 2, 5, 6, 7 confirmando a presença da banda esperada. A seta indica as bandas referentes ao 16SrRNA.....62

Figura 17: Análise dos produtos obtidos por amplificação de PCR de segmento do gene 16SrRNA da bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* a partir do DNA extraído de sangue total de humanos cardiopatas. Linha 1, Marcador Ladder 1 Kb (GIBCO); linha 2, 3, 4, 5 e 6 amostras de humanos cardiopatas (Doença de Chagas), observando o fragmento de 185 pb, confirmando a presença da banda esperada. A seta indica as bandas referentes ao 16SrRNA.....63

Figura 18: Análise dos produtos obtidos por amplificação de PCR de segmento do gene 16SrRNA da bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* a partir do DNA extraído de sangue total de humanos cardiopatas. Linha 1, Marcador Ladder 1 Kb (GIBCO); linha 2, 3, 4, 5 e 6 amostras de humanos cardiopatas (Doença de Chagas), observando o fragmento de 185 pb nas linhas 2, 3 e 4 confirmando a presença da banda esperada. A seta indica as bandas referentes ao 16SrRNA.....64

Figura 19: Representação do resultado do sequenciamento dos produtos de PCR de 8 amostras de humanos cardiopatas com endocardite. Linhas 1 a 5, linhas 6 a 8, amostras de sequencias de humanos com arritmia, linhas 9 a 10, amostras de seqüências de humanos do grupo controle (não cardiopata),

demonstrando a confirmação da seqüência da bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*, Linha 11, demonstrando a região consensu do sequenciamento.....67

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de abreviaturas.....	iii
Lista de tabelas.....	vi
Lista de figuras.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Bacterologia.....	1
1.2. História Natural.....	6
1.2.1. <i>Bartonella baciliformis</i>.....	9
1.2.2. <i>Bartonella quintana</i>.....	11
1.2.3. <i>Bartonella henselae</i>.....	13
1.3. Espécies da <i>Bartonella</i> em animais.....	16
1.3.1. Roedores.....	16
1.3.2. Felinos.....	17
1.3.3. Caninos.....	18
1.4. <i>Bartonellas</i> nos humanos.....	21
2. Objetivos.....	37
3. Fluxograma.....	38
4. Materiais e Métodos.....	39
4.1. População de Estudo.....	39
4.1.1. Indivíduos doadores de sangue.....	39
4.1.2. Isolamento.....	40
4.2. Cluster 16S-23S.....	41
4.2.1. Estrutura do 16S.....	42

4.3. Coletas das amostras de sangue de humanos.....	43
4.3.1. Extração de DNA genômico dos animais domésticos e dos ectoparasitas.....	43
4.3.2. Protocolo para Extração de DNA a partir do sangue Veterinary Genetics Laboratory - University of Califórnia Davis, CA 95616.....	44
4.4. Amplificação das amostras de DNA.....	46
4.5. Purificação.....	48
4.5.1. Protocolo utilizado para a purificação de DNA a partir de gel de agarose (Kit Perfectprep Gel Cleanup – Eppendorf).....	48
4.6. Seqüenciamento do DNA.....	49
4.7. Análise em bancos de dados.....	49
4.8. Análise Estatística.....	50
4.8.1. Teste Qui-Quadrado.....	50
5. Resultados.....	52
5.1. Isolamento bacteriano.....	52
5.2. Amplificação das amostras de DNA extraídos de ectoparasitas	54
5.3. Amplificação das amostras de DNA extraídos de humanos.....	55
5.3.1. Grupo controle(GC).....	55
5.3.2. Grupo Cardiopata (GCard)	55
5.3.2.1 Grupo Cardiopata: Endocardite e Arritmia Cardíaca.....	60
5.3.2.2. Grupo Cardiopata: Doença de Chagas.....	63
5.4. Análise Estatística.....	65
5.5. Seqüenciamento do DNA.....	67

6. Discussão.....	68
7. Conclusão.....	82
8. Referências Bibliográficas.....	84
ANEXO I: Ficha de Anamnese.....	110
ANEXO II: Submissão do Artigo.....	112
ANEXO III: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	114
ANEXO IV: Métodos Difundidos.....	119

1. INTRODUÇÃO

1.1. Bacteriologia

Membros do gênero *Bartonella* são organismos (bacilos ou cocobacilos) gram-negativos, fastidiosos e anaeróbios e estão classificados dentro do segundo subgrupo da classe *Alpha-Proteobactéria*. São bactérias que apresentam similaridade, homologia e evolução com os membros do gênero *Brucella*, *Agrobacterium* e *Rhizobium*. A espécie da *Bartonella* cresce em meio axênico a 37°C com 5% de gás carbônico, em ágar enriquecido com sangue (5%-10%), mas também pode crescer em meio de solução de soro fetal bovino e em cultura de tecido (LA SCOLA *et al.*, 1999). A *Bartonella* faz parte da família *Bartonellaceae* e mantém relação filogenética com os membros da ordem *Rickettsiales* conforme figura 1 (SLHESSARENKO, 1998).

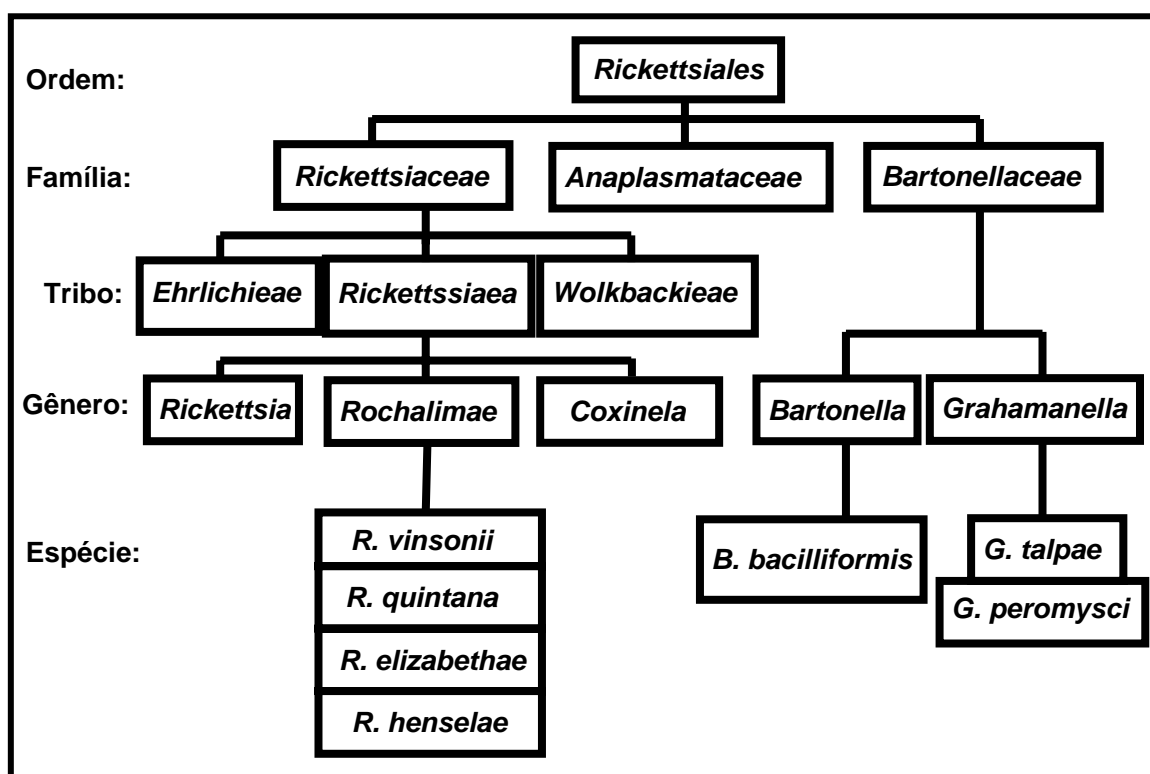


Figura 1: Antiga classificação das bactérias dos gêneros *Bartonella*, *Rochalimae* e *Grahamella*.

As *Bartonella* spp. são maiores que as *Brucella* spp. que também são gram-negativas e cocobacilares (GUCCION *et al.*, 1996).

Algumas características das bactérias deste gênero são variáveis, como a temperatura ótima para o crescimento. A *B. bacilliformis* cresce melhor sem saturação de gás carbônico e entre 25°C a 30°C, enquanto as demais preferem temperatura entre 35°C a 37°C.

O isolamento de diferentes espécies de *Bartonella* geralmente requer um tempo prolongado de cultivo usando meios enriquecidos e de preparo recente (WELCH *et al.*, 1992; ANDERSON & NEUMAN, 1997).

DOUGHERTY *et al.*, (1996) estudaram o isolamento de microorganismos de crescimento lento de pacientes com Aids, observaram que a rotina de culturas sangüíneas de laboratórios de microbiologia clínica não são suficientes para permitir o crescimento de espécies da *Bartonella*. Dessa forma, sugerem que, enquanto não forem determinadas as condições de crescimento e o meio ideal para tal isolamento, placas de ágar sejam incubadas por dois meses, já que houve crescimento visível de colônia de *B. henselae* depois de seis semanas de cultivo.

Em 1997 BRENNER *et al.*, compararam a coleta do sangue de felinos infectados por *B. henselae* em tubos de lise e tubos com EDTA com anticoagulante. Fizeram plaqueamento direto das amostras, plaqueamento após 24 horas a 25°C e plaqueamento após congelação a - 65°C por 26 dias. Realizaram a contagem das colônias após 14 e 35 dias de crescimento e concluíram que a lise dos eritrócitos aumentou o número de unidades formadoras de colônias/ml, utilizando o tubo apropriado ou o congelamento por 26 dias ou mesmo por apenas 24 horas.

Para as culturas de tecidos, os fragmentos coletados assepticamente foram triturados e homogeneizados. Meios ágar-sangue de coelhos, carneiros ou humano, receberam este material, sendo incubados por período de seis semanas ou mais.

BERGMANS *et al.*, (1997) e ZANUTTO (2000) demonstraram que a hemocultura é mais sensível para o diagnóstico que a detecção gênica por PCR.

O gênero *Bartonella* contém 13 espécies e a maioria foi reclassificada e descrita como sendo do gênero *Rochalimeae* (*B. quintana*, *B. henselae*, *B. Elizabethae* e *B. vinsonii*) e do gênero *Grahamella* (*B. talpae*, *B. peromysci*, *B. grahamii*, *B. taylorii* e *B. doshiae*) (BRENNER *et al.*, 1993, BIRTLES *et al.*, 1995).

O gênero *Bartonella* possui três espécies que foram isoladas em humanos (*B. bacilliformis*, *B. elizabethae* e *B. quintana*), duas espécies que foram isoladas de gatos e cães (*B. koehlerae* e a *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*) e duas espécies que podem infectar humanos e gatos (*B. clarridgeiae* e a *B. henselae*). O restante das espécies de *Bartonella* (*B. doshiae*, *B. grahamii*, *B. peromysci*, *B. talpae*, *B. taylorii*, e *B. vinsonii*) foi isolado do sangue de roedores (JENSEN *et al.*, 2000).

Foram relatadas cinco espécies da bactéria *Bartonella* causadoras de infecção em humanos, que são responsáveis por uma variedade grande de doenças. Quatro espécies da bactéria *Bartonella* foram relatadas por causar infecção em gatos e cães e duas destas espécies de *Bartonella* são consideradas espécies patogênicas e de zoonose (JENSEN *et al.*, 2000). O gênero *Bartonella* (Figura 2) representa um fascinante grupo e estas espécies

são consideradas zoonoses bacterianas emergentes (WALKER *et al.*, 1996; SPACH & KOEHLER (1998).

Família	<i>Bartonellaceae</i>	
Gênero	<i>Bartonella</i>	
Espécies	<i>B. bacilliformis</i> <i>B. quintana</i> <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>vinsonii</i> <i>B. henselae</i> <i>B. elizabethae</i>	Anteriormente <i>Rochalimeae</i>
	<i>B. talpae</i> <i>B. peromysci</i>	
	<i>B. grahamii</i> <i>B. taylorii</i> <i>B. doshiae</i> <i>B. clarridgeiae</i> <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffi</i> <i>B. tribocorum</i> <i>B. alsatica</i> <i>B. koehlerae</i> <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i> <i>B. birtlesii</i> <i>B. weissii</i>	

Figura 2: Classificação atual da família *Bartonellaceae*.

MAURIN & RAOULT (1996), relataram que o espectro clínico das manifestações induzidas pela infecção por *Bartonella* é surpreendente. Dessa forma, as doenças causadas por *Bartonellas* incluem a febre das trincheiras (FT), a doença da arranhadura do gato (DAG), a angiomatose bacilar (AB), quadros de bacteremia febril, septicemia e endocardite (ANDERSON &

NEUMAN, 1997; BASS, VINCENT, PERSON, 1997a; BASS, VINCENT, PERSON, 1997b; RAOULT, 1999).

Várias espécies demonstram características comuns como à habilidade de causar infecção crônica em seus hospedeiros naturais (bacteremia), e íntima associação com as células dos hospedeiros (eritrócitos) (BROUQUI *et al.*, 1999).

Novos genótipos da *Bartonella* foram isolados de roedores do gênero *Rattus*, porém ainda estão sem uma classificação específica (ELLIS *et al.*, 1999).

<i>Bartonella sp</i>	Descrição	Reservatórios	Principais Doenças Humanas
<i>B. bacilliformis</i>	1907	Homem	DC
<i>B. talpae</i>	1911	<i>Scalopus sp.</i>	
<i>B. quintana</i>	1917	Homem	FT, DAG, AB, LC, bac, end, sep
<i>B. peromysci</i>	1942	Veado, camund	
<i>B. vinsonii subsp. vinsonii</i>	1946	<i>Scalopus sp.</i>	
<i>B. henselae</i>	1992	Gato	DAG, AB, LC, bact, end, sep
<i>B. elizabethae</i>	1993	Rato	end, neurorretinite
<i>B. grahamii</i>	1995	Camund, <i>Microna sp.</i>	Neurorretinite
<i>B. taylorii</i>	1995	Camund, <i>Microna sp.</i>	
<i>B. doshiae</i>	1995	<i>Microna sp.</i>	
<i>B. vinsonii subsp. berkhoffi</i>	1996	Cão	end
<i>B. clarridgeiae</i>	1996	Gato	DAG
<i>B. tribocorum</i>	1998	Rato	
<i>B. alsatica</i>	1999	Coelho	
<i>B. koehlerae</i>	1999	Gato	
<i>B. vinsonii subsp. arupensis</i>	1999	Camundongo	bac
<i>B. birtlesii</i>	2000	<i>Apodemus sp.</i>	
<i>B. weissii</i>	2001	Boi	

Tabela 1: Relação entre espécies de *Bartonella*, ano de descrição, reservatórios e principais doenças humanas. (DC, doença de Carrión; FT, febre das trincheiras; DAG, doença da arranhadura do gato; AB, angiomatose bacilar; LC, linfadenopatia crônica; bac, bacteremia; end, endocardite; sep, septicemia)

1.2. História natural de infecções pela *Bartonella*

A espécie da *Bartonella* apresenta um ciclo natural como muitos agentes de doenças e vetores. O ciclo apresenta um anfitrião reservatório da espécie da *Bartonella* que causa uma bacteremia intraeritrocitária crônica e os vetores que transmitem as bactérias do reservatório para anfitriões novos e suscetíveis.

O anfitrião, então, poderia contaminar os vetores hematófagos: carrapatos, pulgas (KOEHLER *et al.*, 1994), areia transportada pelo vento e o piolho. Estes poderiam infectar subsequentemente um novo anfitrião (BROUQUI *et al.*, 1999, RAOULT *et al.*, 1999).

A transmissão pode ocorrer entre anfitriões naturais. Evidências apresentam que a espécie da *Bartonella* pode ser inoculada por vetores de artrópodes através das mordidas, arranhões, anfitriões de reservatório, e talvez, por agulhas e seringas de dependentes e usuários viciados de drogas (COMER *et al.*, 1996).

Vetores de artrópodes foram amplamente estudados e foi demonstrado que as pulgas podem infectar mamíferos e humanos com a *B. henselae*, os piolhos do corpo podem infectar com a *B. quintana* e os carrapatos podem infectar com *B. henselae*, *B. quintana*, *B. washoensis*, e a *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* (LUCEY *et al.*, 1992; KOEHLER *et al.*, 1994; BROUQUI *et al.*, 1999; CHANG *et al.*, 2001).

Os artrópodes foram considerados os vetores para quase todas as espécies de *Bartonella*. Os carrapatos, pulgas e piolhos transmitem a bactéria para as pessoas através de arranhões e mordidas dos anfitriões de reservatório, em particular pelos gatos.

Anfitriões infectados acidentalmente pela *Bartonella* apresentam sinais sistêmicos como: bacteremia e cardiopatias. A bacteremia pode causar anormalidades nas válvulas do coração podendo resultar em endocardite (BROUQUI *et al.*, 2001).

A endocardite foi encontrada em pacientes que apresentavam lesões valvulares devido a infecção pela *B. henselae*, *B. elizabethae*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* e *B. vinsonii* subsp. *arupensis* (DALY *et al.*, 1993; RAOULT *et al.*, 1996; ROUX, *et al.*, 1999; WELCH, *et al.*, 1999).

Nos Estados Unidos, os carrapatos são considerados vetores de zoonose e causadores de muitas doenças. Desta forma, é importante determinar se algumas espécies de *Bartonella* que estão emergindo como patógenos podem ser transmitidas por carrapatos. O carrapato adulto (*Ixodes pacificus*) foi coletado e avaliado por PCR e por sequenciamento parcial do gene (273 bp) para a identificação da *Bartonella*. De 151 carrapatos individualmente testados, vinte e nove (19.2%) apresentaram PCR positivo para *Bartonella*. Os carrapatos infectados e a análise molecular mostraram uma variedade de espécies de *Bartonella*, conhecidas como patógenos humanos e animais. As espécies e subespécies de *Bartonella* são: *Bartonella henselae*, *B. quintana*, *B. Washoensis* e *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*. Estes achados indicam que os carrapatos (*Ixodes pacificus*) podem representar um papel importante para a transmissão de *Bartonella* entre animais e humanos (CHANG *et al.*, 2001).

A rickettsiose aguda (*Rickettsia monacensis*) foi identificada em 2 humanos e uma das causas foi a picada do carrapato. O seu papel patogênico foi avaliado por cultura e descoberta do organismo nas amostras de sangue

dos pacientes. Este achado aumenta o número de patógenos de rickettsia em humanos e amplia a distribuição geográfica de casos de febre nos mediterrâneos (JADO *et al.*, 2007).

1.2.1. *Bartonella bacilliformis*

É o agente causador da doença de Carrión (DC), que ocorre principalmente nas montanhas dos Andes e é transmitida por moscas de areia (Battistini *et al.*, 1931). A infecção por *B. bacilliformis* é caracterizada por uma infecção de forma aguda, febre de Oroya (cl clinicamente apresenta um quadro febril e imunossupressão), que causa uma anemia hemolítica severa e a pessoa corre risco de vida, e na forma crônica, a verruga peruana, que resulta em lesões vasculares e proliferativas da pele (GARCIA *et al.*, 1990; GARCIA-CACERES & GARCIA, 1991; CACERES-RIOS *et al.*, 1995).

Em 1885, Daniel Alcidés Carrión, um estudante de medicina peruano, tentou demonstrar que duas enfermidades endêmicas em seu país, a febre de Oroya e a verruga peruana, apresentavam fases de uma mesma infecção. Inoculou-se com o material extraído de um paciente com manifestação clínica da verruga peruana, vindo a falecer durante quadro febril, sendo assim, denominada como a febre de Oroya. Em torno de 1870, aconteceram duas grandes epidemias de um quadro febril e hemolítico, mais de 8 mil trabalhadores, procedentes do Chile e de outras regiões do Peru, faleceram nesses episódios, e a doença ficou conhecida como febre de Oroya (GARCIA-CACERES & GARCIA, 1991; BASS, VINCENT, PERSON, 1997a).

Nas áreas endêmicas, 60% da população é soropositiva para a bactéria e 10% a 15%, portador assintomático. Os portadores assintomáticos são os maiores reservatórios da doença (GARCIA-CACERES & GARCIA, 1991; BASS, VINCENT, PERSON, 1997a).

MATTEELLI *et al.*, 1994, relataram casos de verruga peruana fora da área endêmica, que ocorreram entre pessoas que viajaram para estas regiões.

A patogênese e a resposta imune das *Bartonellas* (Figura 3) são pouco conhecidas e a inexistência de um modelo de animal apropriado limita seu estudo (DEHIO & SANDER, 1999).

O desenvolvimento da infecção está associado e relacionado a muitas variáveis como: o estado imunológico do hospedeiro, a virulência da bactéria, a participação de vetores e a via de administração.

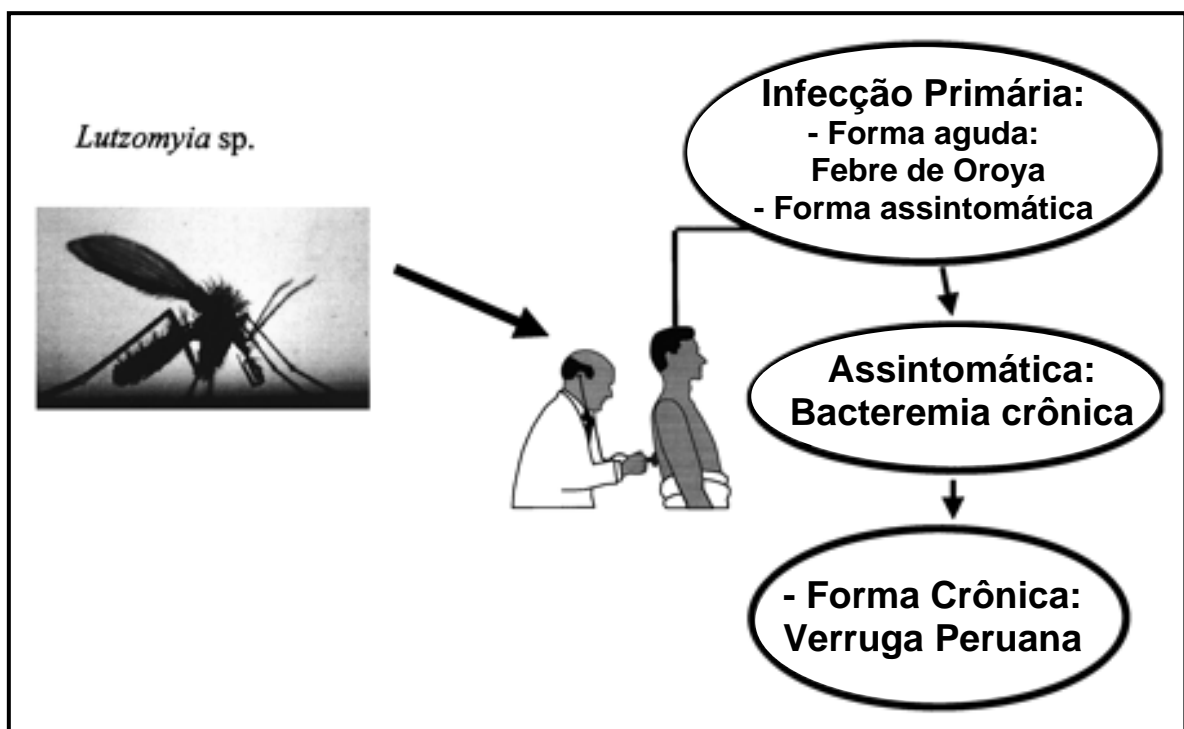


Figura 3. História natural da infecção pela *B. bacilliformis*.

1.2.2. *Bartonella Quintana*

É o agente causador da febre de trincheira (FT), é transmitido pelo pioelho para os humanos durante a Primeira Guerra Mundial em 1915, sendo considerada uma epidemia (MAURIN *et al.*, 1996). A *B. quintana* também foi identificada como um dos dois agentes que causam angiomatose bacilar (AB) (RELMAN *et al.*, 1990). Foi estimado que na primeira epidemia mais de 1 milhão de pessoas tenham sido afetadas pela *B. quintana*, principalmente os militares.

Adquirida, provavelmente, por soldados alemães da população russa, onde a infecção era endêmica, esta disseminou-se por toda a Europa. Com o final da guerra, houve declínio acentuado da epidemia e conseqüentemente o seu interesse médico. Com a Segunda Guerra Mundial, a infecção tornou-se reemergente (BASS, VINCENT, PERSON, 1997a).

AZEVEDO *et al.*, (2000) descreveram um caso brasileiro da doença causada pela bactéria *B. quintana*.

Em centros urbanos foram observados casos de infecção em pessoas sem residência e que abusam de álcool (Figura 4).

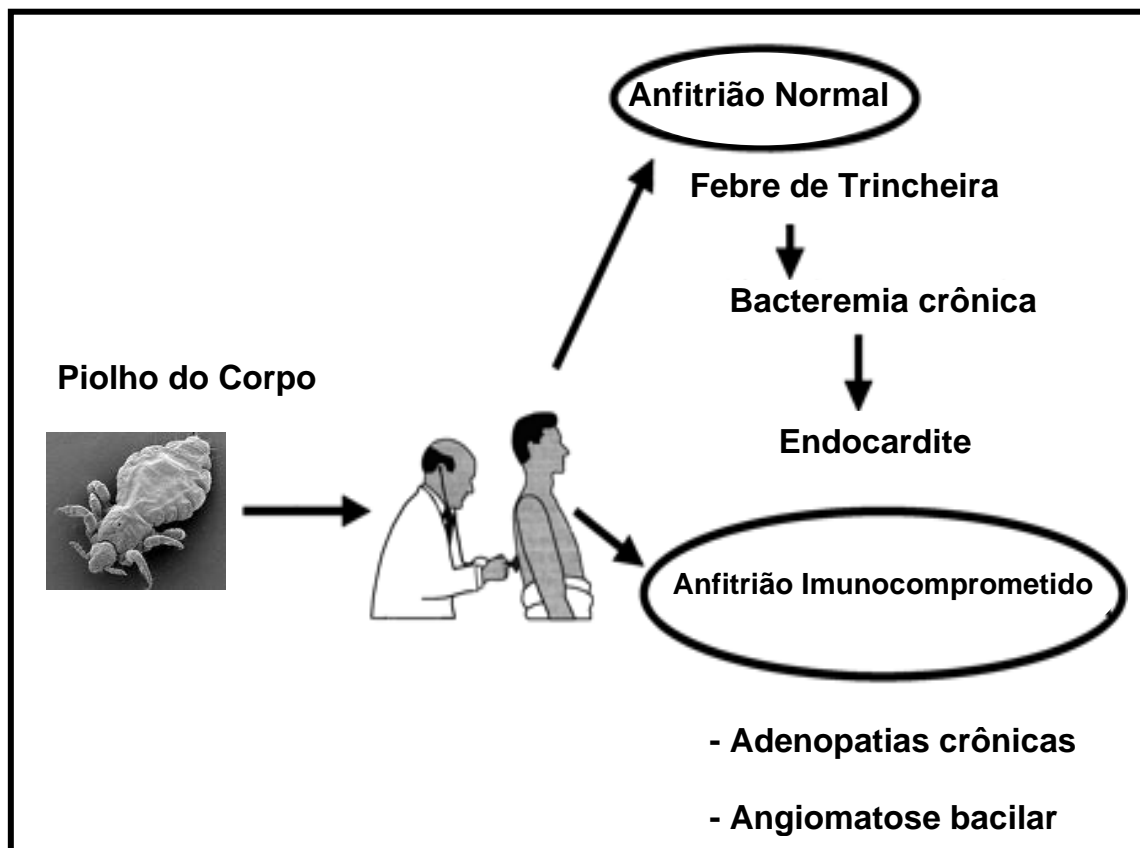


Figura 4. História natural da infecção pela *B. quintana*.

1.2.3. *Bartonella Henselae*

É o agente causador da doença do arranhão do gato (DAG). Esta é considerada uma zoonose em virtude dos gatos serem os principais reservatórios da bactéria (KOEHLER *et al.*, 1994; CHOMEL *et al.*, 1996) e o ectoparasita (*felis Ctenocephalides*), a pulga do gato é considerada o vetor (KAREM *et al.*, 2000). Embora DAG seja normalmente considerada uma doença limitada em pacientes imunossuprimidos, formas atípicas desta infecção podem ocorrer, como a síndrome de Parinaud (glandular ocular), encefalopatia, osteomielites e endocardites (ANDERSON & NEUMAN *et al.*, 1997; BREITSCHWERDT *et al.*, 1999).

Em pacientes imunossuprimidos, a *B. henselae* é o outro agente causador de angiomatose bacilar (RELMAN *et al.*, 1990; KOEHLER *et al.*, 1992).

LOUTIT (1997) descreve as colônias de isolamento desta bactéria que apresenta uma morfologia esbranquiçada, seca, auto-aderente, delicada, com aspecto de couve-flor e incrustada no ágar. Após múltiplas passagens, as colônias se tornam menos aderentes, menos secas, maiores e mucóides. As *B. henselae* são mais heterogêneas que as demais espécies, predominando as colônias mais irregulares.

REGNERY *et al.*, (1992) descreveram uma ocorrência natural da infecção de gatos pela *B. henselae* pelo isolamento do agente de um gato com anticorpos específicos contra *Rochalimeae sp.* Mais recentemente, vários estudos foram realizados para avaliar a incidência desta infecção em gatos.

MEHOCK *et al.*, (1998) verificaram que a *B. henselae* fixa-se aos eritrócitos de felinos e os invade lentamente, característica relacionada à sua

capacidade de adesão. A *B. bacilliformis* e a *B. clarridgeiae* são multiflageladas unipolares (DALY *et al.*, 1993; BIRTLES *et al.*, 1995; ANDERSON & NEUMAN, 1997; BASS, VINCENT, PERSON, 1997a; KORDICK *et al.*, 1997; SLHESSARENKO, 1998; RAOULT, 1999).

CHILDS *et al.*, em 1994, demonstraram soropositividade a antígenos de *B. henselae* em 44% dos gatos de Baltimore. No mesmo ano, KOEHLER *et al.*, (1994) cultivaram sangue de 61 gatos da região da Baía de São Francisco sendo isolada a *B. henselae* de 41% deles. De 48 gatos de pacientes com DAG, 81% eram soropositivos para a mesma *Bartonella*, conforme comunicação pessoal publicada por HIGGINS *et al.*, (1996).

A *Bartonella quintana* e a *Bartonella henselae* são bactérias gram-negativas, organismos fastidiosos, responsáveis por angiomatose bacilar (AB), febre de trincheira (FT), doença do arranhão de gato (DAG) e endocardite (E).

Durante um período de 5 anos, 2.043 amostras de cultura da espécie de *Bartonella* foram analisadas (LA SCOLA *et al.*, 1999). A espécie de *Bartonella* foi considerada o agente etiológico em 38 casos de endocardites em humanos, 78 casos da doença de arranhão de gato, 16 casos de bacteremia em pessoas sem residência e 7 casos de angiomatose bacilar. Novas técnicas de biologia molecular, principalmente baseada na análise e amplificação do gene 16SrRNA, permitiram identificar o importante papel da *Bartonella*, com relação ao número crescente das doenças, conforme figura 5 (LA SCOLA *et al.*, 1999).

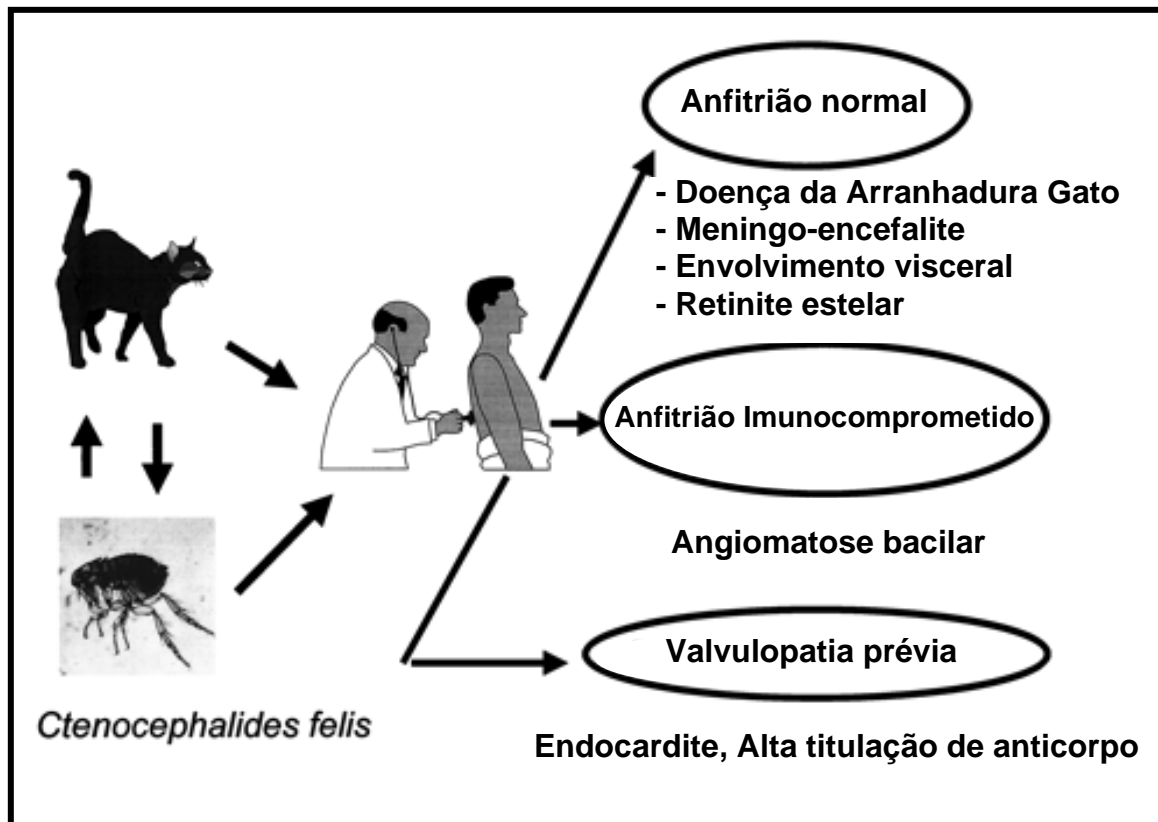


Figura 5. História natural da infecção pela *B. henselae*.

1.3. Espécies da *Bartonella* em animais

1.3.1. Roedores

São considerados vetores e transmissores de diversas doenças. Em 1905 foi relatado o primeiro caso de *Bartonella* (*B. talpae*) em ratos por estarem apresentando bacteremia intraeritrocitária e em 1995, três novas espécies de *Bartonella* estavam sendo isoladas do sangue de mamíferos do pequeno bosque no Reino Unido (BREITSCHWERDT *et al.*, 2000).

Foi realizado um experimento com camundongos isogênicos imunocompetentes e outros, de mesma linhagem, com a imunidade celular comprometida geneticamente, foram inoculados com a mesma bactéria e apenas os imunodeficientes mostraram alteração clínica após quatro dias. (VELHO *et al.*, 1998).

Em uma pesquisa a espécie da *Bartonella*, foi achada no sangue de animais intradomiciliares e também nos ratos de Phyllotis no Vale de Huayllacallàn no Peru (BIRTLES *et al.*, 1999).

Não é conhecido como a espécie da *Bartonella* pode ser transmitida pelos roedores para os humanos (BREITSCHWERDT *et al.*, 1995). Também, a patogenicidade da maioria das espécies da *Bartonella* roedora não é conhecida, embora foi descrito que um paciente apresentou infecção por *B. elizabethae* e outro paciente por *B. grahamii* (KERKHOFF *et al.*, 1999).

Além disso, no Município de Washoe County, um caso humano de miocardite foi relacionado a uma nova espécie de *Bartonella* (*B. Washoensis*).

Foram determinados os roedores como sendo os prováveis reservatórios da espécie *Bartonella* (CHANG *et al.*, 2001).

1.3.2. Felinos

Os felinos domésticos são comumente infectados com *B. henselae*, embora eles também possam ser infectados com *B. clarridgeiae*, *B. koehlerae* e a *B. weissii* (BREITSCHWERDT *et al.*, 1995).

A prevalência da cultura-positiva no sangue dos gatos é considerada alta mundialmente, chegando na Califórnia a uma porcentagem de até 41% (KOEHLER *et al.*, 1994).

CHOMEL *et al.*, (1995), realizaram um estudo na Califórnia, foram isoladas cepas de *B. henselae* de 39,5% dos 205 gatos avaliados. Destes, 81% eram soropositivos para o mesmo agente.

NG & YATES (1997) isolaram a *B. henselae* de 13,2% dos 342 gatos de Melbourne (Austrália), dos quais armazenaram o sangue por uma semana, cultivando-os depois. Os autores concordam que os dados subestimem a realidade da infecção entre os gatos daquela cidade, pelas condições técnicas do isolamento.

UENO *et al.*, (1995) não encontraram diferenças significantes na soroprevalência entre gatos velhos e jovens ou entre machos e fêmeas. CHOMEL *et al.*, (1995), ao contrário encontraram que gatos com menos de 1 ano têm 1,64% mais bacteremia que gatos mais velhos.

HIGGINS *et al.*, (1996) demonstraram que *B. henselae* replica e persiste na pulga. LUCEY *et al.*, (1992) associaram-na com carrapatos.

Achados sugerem que cachorros domésticos, como os gatos, também possam servir como reservatório para a *B. henselae* (MARGILETH, 1993; TSUKAHARA *et al.*, 1998).

1.3.3. Caninos

Há uma grande evidência que a espécie da *Bartonella* e outros membros da subdivisão de Alfa - *Proteobactérias* são patógenos cardíacos importantes em cães e humanos.

Em 1993, foi isolado de um cão com endocardite uma nova subespécie de *Bartonella* que foi designada *Bartonella vinsonii* subespécie *berkhoffii*. Evidências indicam que a *B. vinsonii* é um importante patógeno canino e foi implicado como uma causa de endocardite, linfadenite granulomatosa e rinites granulomatosa (BREITSCHWERDT *et al.*, 1999).

A espécie da *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* foi isolada de um cão doméstico apresentando endocardite (CHANG *et al.*, 2001). Subsequentemente, o organismo foi achado em outro cão com endocardite (KORDICK *et al.*, 1996).

Espécies de *Bartonella* estão emergindo como patógenos e nos últimos anos uma nova espécie de *Bartonella* foi identificada nos mamíferos sendo considerada uma zoonose e um vetor de transmissão para os humanos (BIRTLES *et al.*, 1994; KORDICK *et al.*, 1996; KOSOY *et al.*, 1997; HELLER *et al.*, 1998; KELLY *et al.*, 1998; ELLIS *et al.*, 1999; HELLER *et al.*, 1999; FICHET-CALVET *et al.*, 2000; KAREM *et al.*, 2000).

A infecção pela *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* foi informada em vários casos de endocardite canina e recentemente ocorreu um caso de endocardite humana (BREITSCHWERDT *et al.*, 1999; ROUX *et al.*, 1999). Baseado em um estudo epidemiológico, a infecção pela *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* pode também ocorrer através da transmissão do carrapato (PAPPALARDO *et al.*, 1997).

Um novo agente foi isolado de um cachorro com endocardite, apenas quando utilizou-se a técnica de lise e centrifugação. Tratava-se de uma bactéria gram-negativa fenotipicamente semelhante à *Bartonella* sp. Da válvula cardíaca congelada foi amplificado o DNA e a bactéria daí também isolada foi caracterizada fenotípica, genotipicamente e através do seqüenciamento da subunidade 16SrRNA que mostraram tratar-se de uma nova subespécie de *Bartonella*, sendo proposto o nome de *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* (BREITSCHWERDT *et al.*, 1995).

Recente estudo da Universidade da Califórnia relata que a *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* isolada de cães portadores de endocardite infecciosa foi identificada como sendo um agente de zoonose que causa endocardite em humanos (CHANG *et al.*, 2001).

Segundo CORRÊA (2002), estudos recentes na Universidade Federal de São Carlos comprovam a existência de casos de cardiopatias em cães causados por infecção pela *Bartonella vinsonii* subespécie *berkhoffii* e membros relacionados da subdivisão *Alpha-Proteobactérias*, sendo considerada uma zoonose. Neste trabalho, foram utilizados oligonucleotídeos específicos para o gene 16SrRNA para averiguar, por PCR, a presença de bactérias em leucócitos de 60 cães. De 35 cães cardiopatas individualmente testados, vinte e oito (80%) apresentaram PCR positivo para *Bartonella* e 25 cães normais individualmente testados, onze (44%) apresentaram PCR positivo para *Bartonella* e todos os animais tiveram contato com ectoparasitas (carrapatos). Os carrapatos infectados e a análise molecular mostraram uma variedade de espécies de *Bartonella*, conhecidas como patógenos humanos e animais. As espécies e subespécies de *Bartonella* são: *Bartonella henselae*, *B.*

quintana, *B. Washoensis* e *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*. Foram detectadas bactérias em ectoparasitas, indicando que estes podem ser considerados vetores dos microorganismos. Além disso, as bactérias encontradas foram caracterizadas através do sequenciamento do material amplificado. Finalmente, alguns animais com problemas cardíacos e possuidores da bactéria na corrente sanguínea, foram submetidos a tratamento com antibióticos e monitorados clinicamente.

1.4. *Bartonelloses* nos humanos

Os humanos são considerados anfitriões e reservatórios de *B. bacilliformis* e de *B. quintana*; outros mamíferos são considerados os reservatórios para as outras espécies de *Bartonella*. Normalmente há uma alta associação específica entre uma espécie de *Bartonella* e a espécie de mamífero que é o seu reservatório. Porém, às vezes os microorganismos de animais podem incidentalmente infectar os humanos e causar doenças sistêmicas que podem ser imunocompetentes ou preexistirem em anormalidades das válvulas do coração. Em pessoas imunocompetentes, normalmente a espécie da *Bartonella* já se localizou e causou uma doença.

A doença de Carrión (DC) é causada pela *B. bacilliformis*. O ciclo epidemiológico da doença de Carrión começa quando a areia infectada levada pelo vento que transmite a *B. bacilliformis* para as pessoas suscetíveis durante a alimentação. Os organismos da *Bartonella* localizam-se nas células capilares endoteliais e esta infecção primária na maioria dos casos é assintomática (WALKER *et al.*, 1999).

Em alguns pacientes ocorre a febre de Oroya. A bactéria entra nos eritrócitos e ocorre a hemólise devido a eritrofagocitose por histiocitose e macrofagocitose. Nesta fase aguda da infecção, a espécie da *Bartonella* pode ser observada nos eritrócitos. O nível do parasita nos eritrócitos pode alcançar 100% e pode resultar em uma anemia hemolítica severa e ocasionalmente, a morte. A morte também pode acontecer devido a infecções oportunistas (salmonelose especificamente), seguindo para uma imunossupressão e infecção induzida. A taxa da fatalidade sem tratamento pode ser de 40% (MAGUINA VARGAS *et al.*, 1998).

A *B. bacilliformis* pode ser transmitida por moscas de lixo causando normalmente uma bacteremia assintomática crônica que pode durar até 15 meses (ELLIS *et al.*, 1999).

Estudos realizados em áreas endêmicas mostraram que os humanos infectados pela *B. bacilliformis* são epidemiologicamente assintomáticos. A maioria das pessoas infectadas são crianças e adultos jovens (MAGUINA VARGAS *et al.*, 1998).

Na fase crônica da infecção, as pessoas desenvolvem erupções cutâneas (verrugas) denominadas Doença de Carrión. Estes indivíduos presumivelmente também podem servir como reservatórios para as bactérias. A doença tem uma distribuição geográfica muito limitada. Na maioria dos casos se localiza em áreas áridas de 500 a 3.000 metros, sobre o nível do mar, localizado nos Andes peruano entre o sudoeste da Colômbia até o centro do Peru. Porém, a doença também foi relatada na Bolívia, Chile, e Guatemala e nas altas elevações da Colômbia e Equador (ELLIS *et al.*, 1999).

A maioria dos casos de *Bartonellose* foi confirmada e informada em uma província litoral árida localizada no Equador (Maguina Vargas *et al.*, 1998).

A doença era desconhecida aparentemente na Colômbia até 1936 (BATTISTINI *et al.*, 1931).

Grandes epidemias de anemia febril caracterizaram a história de *Bartonellose* no Peru. Por muito tempo foi relatado que só as pessoas nascidas em áreas endêmicas desenvolveriam as verrugas peruanas e a fase crônica da doença. Os estrangeiros só desenvolveriam a forma aguda da doença (febril). Um estudo no hospital nacional Cayetano Heredia no Peru mostrou que 58.8%

dos 145 pacientes com febre de Oroya nasceram de fato em áreas endêmicas (MAGUINA VARGAS *et al.*, 1998).

Os humanos ainda são os únicos reservatórios conhecidos de *B. bacilliformis* e servem como fonte de infecção para moscas de areia que são os vetores da doença.

As infecções pela *B. quintana* ocorreram durante a Primeira Guerra Mundial nas febres de trincheiras ou febre de quintana. É uma febre recorrente causada pela *B. quintana* que é transmitida pela infestação do piolho no corpo humano (KOSTRZEWSKI *et al.*, 1949).

A contaminação ocorre pelo prurido das lesões epiteliais causadas pela picada do piolho. Posteriormente, as altas concentrações da *B. quintana* nas fezes dos piolhos infectados podem, através das lesões, entrar no corpo das pessoas, que são os únicos anfitriões para a *B. quintana* e provavelmente os reservatórios naturais do organismo. Embora *B. quintana* esteja normalmente presente no sangue de pacientes durante as fases febris da febre das trincheiras, as infecções podem persistir durante muito tempo depois do desaparecimento de todos os sinais clínicos; esta bacteremia persistente pode facilitar a expansão das bactérias pelos piolhos (KOSTRZEWSKI *et al.*, 1949).

A doença tem uma fase aguda com dor e enxaqueca severa. Os sinais agudos normalmente solucionam espontaneamente, mas em alguns pacientes eles podem ocorrer periodicamente e aproximadamente depois de 5 dias. Em alguns pacientes pode haver seis ou mais repetições da doença (KOSTRZEWSKI *et al.*, 1949).

Em outros pacientes depois de muitos anos podem ocorrer recaídas da enfermidade inicial ou os pacientes podem apresentar uma bacteremia assintomática (BROUQUI *et al.*, 1999).

As bacteremias prolongadas que aconteceram em pacientes com *B. quintana* podem ser associadas a infecções com o desenvolvimento de endocardites e angiomatose bacilar. A febre de Trincheira aconteceu em milhares de soldados de tropas na Primeira Guerra Mundial, mas com a introdução de controle de piolho realizado pelas forças armadas, pensaram que a doença já não era uma ameaça (MAURIN *et al.*, 1996).

Em Seattle (Washington, 1994), foi relatado um alto crescimento da bacteremia causada pela *B. quintana* (SPACH *et al.*, 1995).

Os principais fatores de risco adquiridos pela *B. quintana* incluem febre, infecções, condições precárias de pessoas e alcoolismo crônico. Estes também são os fatores de risco achados no vírus da imunodeficiência humano (HIV), onde pacientes infectados desenvolveram angiomatose bacilar (SPACH *et al.*, 1995) e endocardite (RAOULT *et al.*, 1996).

CLARRIDGE *et al.*, (1995) encontraram que 1% das culturas sangüíneas de pacientes soropositivos para o HIV é positiva para *Bartonella* sp.

TAPPERO *et al.*, (1993) realizaram um trabalho sobre a epidemiologia da angiomatose bacilar. Dos 48 pacientes com este diagnóstico, seis eram soronegativos para o HIV; cinco, imunocompetentes, e um, imunodeficiente. Os outros 42 eram pacientes com Aids. Destes, 45% já tinham este diagnóstico antes da instalação da angiomatose bacilar, 21% deles fizeram o diagnóstico das duas doenças concomitantemente no último mês e 34% tiveram o diagnóstico da Aids após o diagnóstico de angiomatose bacilar. Das diversas

análises realizadas, apenas a exposição a gatos foi um fator com envolvimento estatisticamente significativo, sobretudo após arranhadura ou mordedura destes animais.

Estudos subseqüentes mostraram que a soro prevalência de anticorpos contra a *B. quintana* é alta em pessoas sem residência nos Estados Unidos e Europa. Em 1997, um estudo realizado nos departamentos de emergência dos hospitais universitários de Marseille, na França (BROUQUI *et al.*, 1996), analisou o sangue de 14% das pessoas sem residência e comprovou positividade. Metade destas pessoas apresentaram bacteremia crônica sem febre (BROUQUI *et al.*, 1999).

A doença do arranhão do gato (DAG) é causada pela *B. henselae* que é considerada uma zoonose e normalmente apresenta uma linfadenite regional limitada. No local da inoculação há normalmente um pápula eritematosa, e depois, o líquido linfático escoia devido o local dos nódulos estarem edemaciados e aumentados. Eles normalmente regressam ao tamanho normal, num período de semanas ou meses, mas a linfadenite pode se tornar supurativa em 10% de pacientes.

Complicações como erupção cutânea, hepato e esplenomegalia, lesões e linfadenite podem ocorrer com 5% dos pacientes, e freqüentemente em crianças. Em anfitriões imunocompetentes, normalmente não há bacteremia (CARITHERS, 1985, ZANGWILI *et al.*, 1993).

KORDICK *et al.*, (1997) relatam que a soroatividade contra a *B. quintana* tem sido observada em vários pacientes com DAG, embora a mesma não tivesse sido observada em nenhum paciente com esta doença ou de seus

gatos, até a descrição de um caso brasileiro de DAG causado por esta bactéria (AZEVEDO *et al.*, 2000).

Estudos sorológicos mostraram que a maioria dos casos de DAG está relacionado com a *B. henselae*, mas a *B. clarridgeiae* também pode causar alguns casos de DAG (REGNERY *et al.*, 1992; KORDICK *et al.*, 1997).

Em 1993, Dolan *et al.*, fizeram o primeiro isolamento da *B. henselae* de um paciente com DAG apresentando linfadenite (DOLAN *et al.*, 1993).

O organismo também estava isolado do sangue de um gato assintomático indicando que os gatos domésticos são reservatórios da *B. henselae*. Atualmente, a DAG foi mundialmente comprovada como sendo a infecção de *Bartonella* mais comum em pessoas (RELMAN *et al.*, 1990).

Embora a DAG possa acontecer em pessoas de qualquer idade, a maioria dos pacientes menores de 18 anos de idade apresenta uma maior prevalência de infecção, talvez porque as crianças tenham mais contato com os gatos (HOFMEISTER *et al.*, 1998).

Em 1996, LAWSON & COLLINS descrevem uma nova espécie de *Bartonella*, chamada de *B. clarridgeiae*. Ela foi isolada de um gato, cujo dono apresentava septicemia por *B. henselae*. KORDICK *et al.*, (1997), isolaram este patógeno de um médico veterinário com quadro de DAG.

Nos Estados Unidos da América e em todas as suas regiões, são aproximadamente 24 mil casos ao ano com mais de 2 mil internações anuais (BASS, VINCENT, PERSON, 1997b; LOUTIT, 1997).

A incidência de DAG na Holanda é de 2 mil casos por ano e a prevalência de gatos com bacteremia é estimada em 400 mil (BERGMANS *et al.*, 1997).

Desde então a primeira infecção de *Bartonella* associada com endocardite em 1993, foi conhecida como uma causa importante de endocardite de cultura-negativa em humanos. A importância clínica e microbiológica da *B. quintana* ou *B. henselae* foi identificada em última instância previamente como a causa de endocardite em nove pacientes humanos diagnosticados com endocardite de Clamídia através de soropositividade de antígenos de *Chlamydia*. É conhecido agora que infecção de *Bartonella* induz anticorpos que reagem com antígenos de *Chlamydia*. Embora *Bartonella quintana*, que é transmitido pelo piolho humano tenha causado epidemias de febre de trincheira durante a Primeira Guerra Mundial, a associação clínica deste organismo fastidioso com endocardite não foi informada por quase um século. Mais recentemente, foi determinado que a endocardite proveniente da *Bartonella quintana* pode estar associada com alcoolismo, pobreza e presumivelmente infestações de piolho no corpo. A endocardite relacionada a *B. henselae* pode estar associada com contato direto com gatos, desde que os gatos ao longo dos tempos sempre foram reservatórios principais para *B. henselae* e *B. clarridgeiae*. Embora um patógeno humano, *B. clarridgeiae* não tem contudo sido associado com endocardite (BREITSCHWERDT *et al.*, 1999).

A endocardite infecciosa (EI) é a infecção microbiana do revestimento endotelial e valvular do coração. Pode ser causada por uma variedade grande de microorganismos, incluindo diversas espécies da *B. quintana*, *B. henselae*, *B. elizabethae*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *B. vinsonii* subsp. *aurpensis*, *B. kohlerae* e *B. alsatica*. Estes agentes de zoonose acometem cerca de 1 a 15% dos pacientes e, devido à natureza fastidiosa das bactérias, não pode ser

descoberto utilizando técnicas simples de cultivo de sangue. O método amplamente utilizado para o diagnóstico laboratorial da infecção pela espécie da *Bartonella* é a sorologia (DALY *et al.*, 1993; DRANCOURT *et al.*, 1995; RAOULT *et al.*, 1996; ROUX *et al.*, 2000; ZEAITER *et al.*, 2003; AVIDOR *et al.*, 2004; SHAPIRA *et al.*, 2004; FENOLLAR *et al.*, 2005; RAOULT *et al.*, 2006).

Em 1993, *B. quintana*, *B. henselae* e *B. elizabethae* foram identificadas pela primeira vez como agentes causadores de endocardites em pacientes humanos e duas novas subespécies da *B. vinsonii*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* e *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, estão associadas com endocardite em pacientes com valvulopatias existente (BREITSCHWERDT *et al.*, 1999, FOURNIER *et al.*, 2001).

SPACH *et al.*, (1993) descreveram pela primeira vez um caso de endocardite causado por *B. quintana*, ampliando assim o espectro da infecção por *Bartonella* sp. Há várias descrições de endocardite causadas pela *B. henselae* e também pela *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* (SPACH, 1998; ROUX *et al.*, 2000).

Na maioria dos casos de endocardite causados pela *Bartonella*, tiveram 13 de 22 pacientes previamente diagnosticados com valvulopatia (MAURIN *et al.*, 1997).

Um paciente masculino jovem apresentava endocardite de cultura-negativa e sofreu substituição de válvula aórtica. O diagnóstico informou a associação da infecção com a *Bartonella quintana* (FENOLLAR *et al.*, 2001; CHRISTIANSEN *et al.*, 2005).

Há descrições de endocardite causadas pela *B. henselae* e também pela *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* (SPACH, 1998; ROUX *et al.*, 2000).

A maioria dos casos ocorreram com pacientes masculinos, imunocompetentes, com febre e mal-estar e foram submetidos a tratamento por um período de seis a nove meses com antibióticos (eritromicina e azitromicina) (LOUTIT, 1997).

Endocardites induzidas por *Bartonella* sp. freqüentemente resultaram em dano valvar extenso, exigindo remoção cirúrgica (MAURIN & RAOULT, 1996). Estes mesmos autores sugerem que a sorologia para *B. quintana*, objeto de sua revisão, seja incluída na investigação de pacientes com endocardites.

Casos de endocardite causadas pela *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* (ROUX *et al.*, 1999) e *B. vinsonii* subsp. *arupensis* (WELCH, *et al.*, 1999) também foram descritos e no estudo posterior o organismo estava isolado do sangue de um rancheiro com doença de válvula cardíaca.

Em 1997, uma nova Alfa-2 *Proteobactéria* provisoriamente designada bactéria de Rasbo, foi isolada de um paciente humano apresentando febre crônica com efusão pericardial e evidência clínica de doença miocárdial (BREITSCHWERDT *et al.*, 1999).

Conforme tabela 2, por serem estes organismos altamente fastidiosos, o diagnóstico molecular por amplificação através da técnica de PCR e sequência direta, como informou em recentes estudos de endocardites em humanos, pode ser necessário para se confirmar infecção por *Bartonellas* (BREITSCHWERDT *et al.*, 1999).

Baseado nestas observações, pesquisas deveriam ser dirigidas para esclarecer o papel das *Bartonellas* em doenças cardiovasculares em humanos, cães e potencialmente em outras espécies animais (BREITSCHWERDT *et al.*, 1999).

ROUX *et al.*, (2000) mencionaram que a espécie da bactéria *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* é patogênica ao homem, relatando o caso de um paciente com endocardite.

Através de comparações notáveis na epidemiologia, história natural, patologia e interação de hospedeiro-micróbio, observa-se a importância médica desse gênero de organismos como patógenos humanos (KAREM *et al.*, 2000).

Várias espécies e subespécies de *Bartonella* são patógenos humanos importantes que causam uma variedade de síndromes clínicas, a maioria dos artrópodes são considerados transmissores da *Bartonella* (BREITSCHWERDT *et al.*, 1998).

Foram verificados casos de infecção em crianças e adolescentes através da *Bartonella henselae* após sofrerem arranhões de cães e gatos. A única alteração clínica apresentada foi linfadenopatia regional. Porém, encefalite e a síndrome de Parinaud (síndrome da glândula ocular e conjuntivite unilateral com linfonodomegalia regional, pode ser a manifestação da DAG) foram também relatadas como uma enfermidade sistêmica (GERBER *et al.*, 2002).

Foram identificados dois pacientes infectados por *Bartonella henselae* que também tiveram contato com cães. Ambos possuíam um cão, mas não tiveram nenhum contato com gatos. Apresentavam linfadenopatia cervical e febre. Foi através da amplificação por PCR e *swab* oral com cotonetes da gengiva e mucosa bucal do cão que identificaram a bactéria. Desta forma, deve ser realizada uma cuidadosa avaliação da história das vítimas com suspeitas de terem tido contato com animais e deve ser realizado um importante diagnóstico para a infecção por *B. henselae* (MURANO *et al.*, 2001).

Uma nova espécie de *Bartonella* foi identificada como um novo patógeno humano, mas os vetores são desconhecidos. A *B. grahamii* foi associada a um caso humano de neuroretinites, mas o modo de transmissão não foi identificado (MAURIN *et al.*, 1996).

Um paciente humano com febre e sinais neurológicos foi infectado por uma espécie moderna da *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, sendo que a infecção possivelmente ocorreu de uma fonte roedora (WELCH, *et al.*, 1999).

Tabela 2: Doenças causadas pelas espécies da *Bartonella* em humanos.

BARTONELLA SP.	DOENÇAS
<i>B. grahamii</i>	Uveíte
<i>B. elizabethae</i>	Endocardite
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	Endocardite
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i>	Febre em pacientes com valvulopatias
<i>B. henselae</i>	DAG, AB, hepatite, endocardite, bacteremia, neuroretinites
<i>B. clarridgeiae</i>	DAG (sorologia)
<i>B. bacilliformis</i>	Doença de Carrion (forma aguda “Febre de Oroya”, forma crônica “Febre e verruga peruana”)
<i>B. quintana</i>	AB, endocardite, febre de trincheira, bacteremia crônica

A tabela 3 representa todas as espécies da bactéria *Bartonella* e os hospedeiros que servem como fonte de transmissão e infecção da doença.

Tabela 3: Representação de todas as espécies da bactéria *Bartonella* e os hospedeiros que servem como fonte de transmissão e infecção da doença.

Espécies	Humanos	Caninos	Felinos	Roedores	Vetores
<i>B. bacilliformis</i>	X				X
<i>B. elizabethae</i>	X				
<i>B. quintana</i>	X				X
<i>B. koehlerae</i>		X	X		
<i>B. vinsonii s. berkhoffii</i>	X	X	X		X
<i>B. clarridgeiae</i>	X		X		
<i>B. henselae</i>	X		X		X
<i>B. doshiae</i>				X	
<i>B. grahamii</i>	X			X	
<i>B. peromysci</i>				X	
<i>B. talpae</i>				X	
<i>B. taylorii</i>				X	
<i>B. vinsonii s. arupensis</i>	X	X		X	
<i>B. washoensis</i>	X				X
<i>B. weissii</i>			X		

A identificação baseia-se na caracterização molecular do isolado ou de material suspeito de infecção. Estes materiais podem ser coletados por biópsia ou aspirados de linfonodos de pacientes com suspeita de DAG, bactérias que crescem de hemoculturas de pacientes com endocardite ou febre recorrente, amostras de tecidos como linfonodo, fígado, baço, cérebro, pulmão, coração, rim e pele de humanos, felinos ou outros animais, ou cultura de bactérias armazenadas em laboratório.

O DNA a ser avaliado pode ser extraído de fragmentos fixados em formol, embebidos em parafina ou de biópsias congeladas.

Estes estudos podem utilizar técnicas de PCR e os produtos da PCR também podem ser seqüenciados para confirmar que o fragmento amplificado é o esperado, atestando assim a especificidade do mesmo.

Alguns genes das bactérias deste gênero foram clonados e seqüenciados para servir de base no delineamento de *primers* gênero - e espécie - específicos para a identificação das bactérias (ZANUTTO, 2000).

A região intergênica 16S-23S rRNA (Figura 6), por sua maior extensão no gênero *Bartonella*, quando comparado a outros gêneros, foi utilizada por JENSEN *et al.*, (2000) para a amplificação de espécies de relevância médica. Esta região mostrou-se um alvo apropriado porque contém regiões com seqüências divergentes o suficiente para a diferenciação das espécies e das regiões com homologia que permite o uso de apenas um par de *primers*.

Após a amplificação, cada espécie pode ser identificada pela diferença do peso molecular dos fragmentos obtidos.

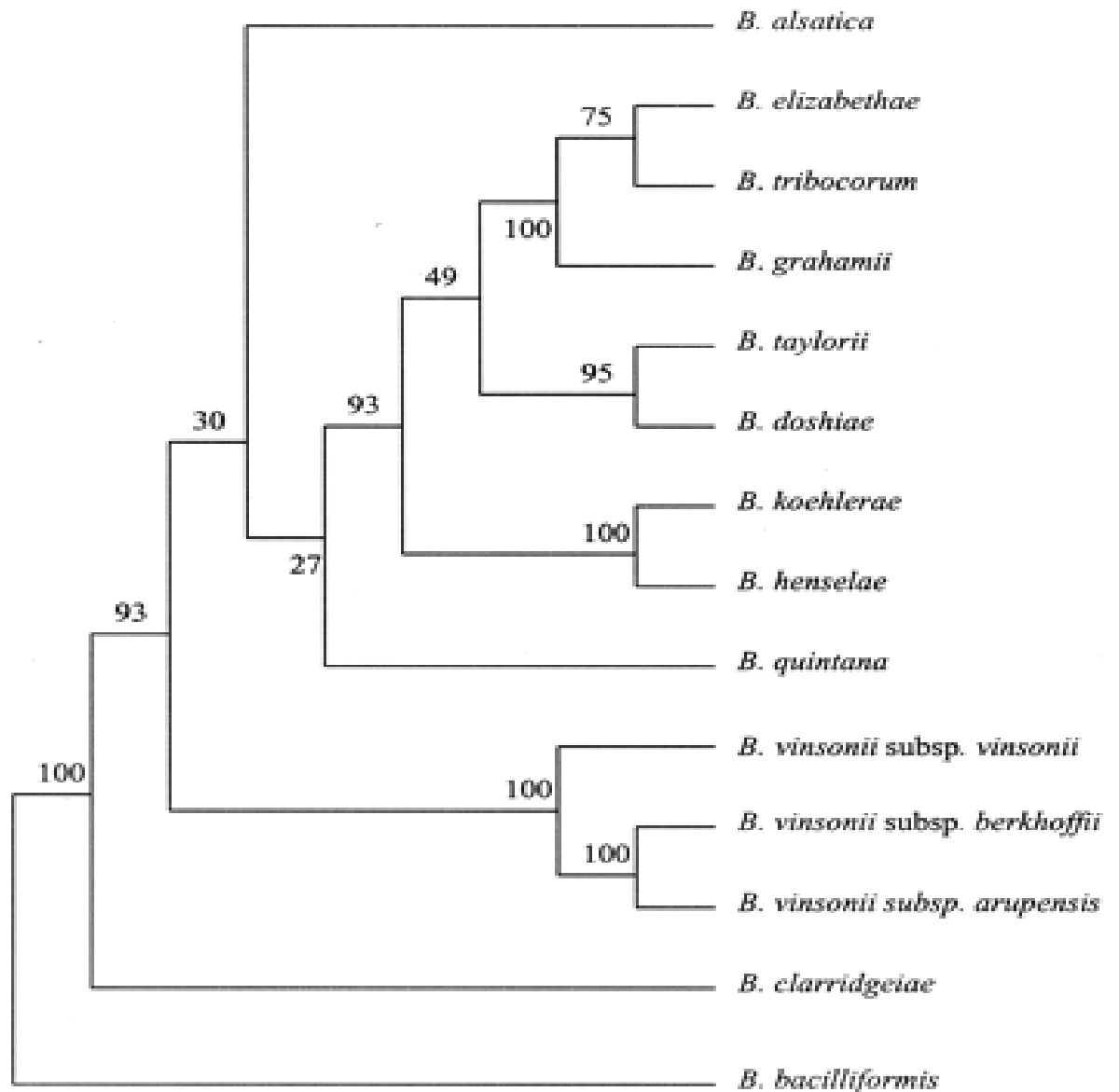


Figura 6: Árvore parcimônica para *Bartonella* sp, apresenta homologia nas seqüências dos genes 16SrRNA.

MAURIN & RAOULT (1996) propuseram um esquema de antibiótico para as infecções por *Bartonella* spp., conforme apresentado na tabela 4.

Tabela 4: Esquema antibiótico proposto para as doenças causadas pelas espécies de *Bartonella*.

Doença	Duração		
	Adultos	Crianças	
FT	gentamicina 2 mg/kg bid i.m.,	gentamicina, 2 mg/kg bid i.m.	2
ou	doxiciclina, 200 mg od p.o.,	eritromicina, 25 mg/kg tid p.o.	4
AB, LC	gentamicina, 2 mg/kg bid i.m.,	gentamicin, 2 mg/kg bid i.m.	2
e	eritromicina, 500 mg qid p.o.,	eritromicina, 25 mg/kg tid p.o.	4 ^c
ou	doxiciclina, 200 mg od p.o.		
BAC, END			
	gentamicin, 2mg/kg bid	gentamicina, 2 mg/kg bid	2
e	ceftriaxona, 2 g od i.v.	ceftriaxona, 200 mg/kg od i.v.	4
ou	doxiciclina, 200 mg od p.o.		4 ^c

FT, febre das trincheiras; AB, angiomatose bacilar sem bacteremia; LC, linfadenopatia crônica ; BAC, bacteremia; END, endocardite.

od, uma vez/dia; bid, duas vezes/dia; tid, três vezes/dia; qid, quatro vezes/dia; p.o., per os; i.v., intravenoso; i.m., intramuscular.

^c8 semanas nos pacientes soropositivos para o HIV.

Novos fatores de risco para a endocardite emergiram, como abuso de droga intravenosa, difusão de procedimentos de cirurgia de coração e implantação de válvula protética e arterioesclerose em pacientes anciãos. Microorganismos recentemente identificados, às vezes são a causa de endocardite de cultura-negativa, emergindo como bactérias resistentes e dessa forma, se tornando um novo desafio para a terapia antibiótica convencional.

Esta revisão deveria ajudar e redefinir a melhor estratégia terapêutica e preventiva contra endocardite infecciosa (CALZA *et al.*, 2004).

SCHALLER *et al.*, (2007) observaram que o número de espécies de *Bartonella* que infectam os humanos atualmente ultrapassa o número de espécies de *Bartonella* que podem ser testadas pelos laboratórios nacionais. Alguns antibióticos parecem ter efeito, mas a dosagem e a duração não são estabelecidos claramente.

Baseando-se nestas observações, pesquisas deveriam ser dirigidas para esclarecer o papel das *Bartonellas* em doenças cardiovasculares em humanos, cães e potencialmente em outras espécies animais (BREITSCHWERDT *et al.*, 1999). ROUX *et al.*, (2000) mencionaram que a espécie da bactéria *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* é patogênica ao homem, relatando o caso de um paciente com endocardite.

Estudos adicionais são necessários para elucidar o modo de transmissão da *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*, especialmente, para identificar vetores potenciais e determinar como são infectados os humanos.

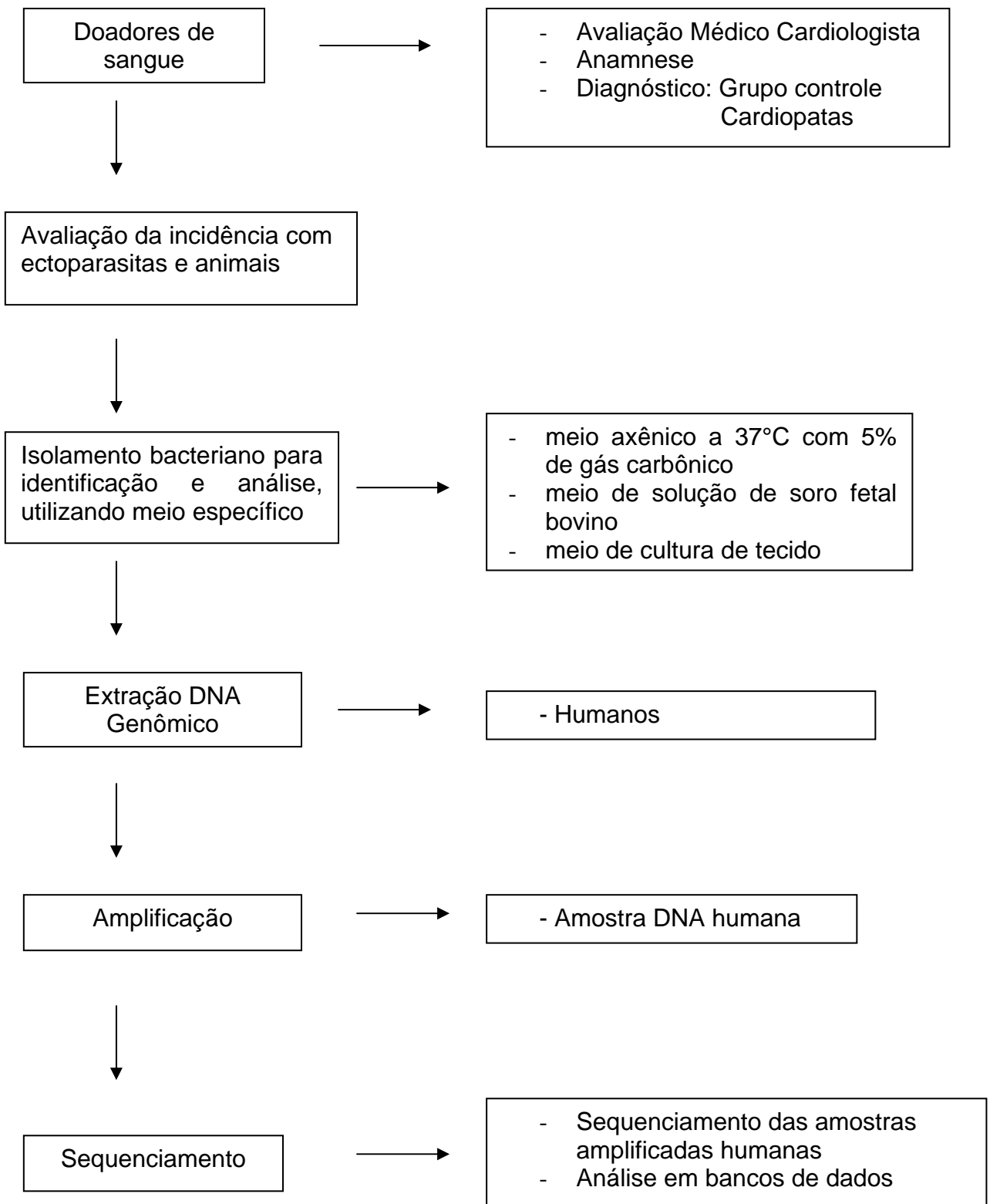
É difícil estabelecer o diagnóstico das infecções por *Bartonella* devido à característica de crescimento lento e por serem considerados organismos fastidiosos. A amplificação por PCR da região intergênica do gene 16SrRNA pode ser relevante para identificar cada espécie de *Bartonella*.

Os métodos de detecção e avaliação gênica por biologia molecular têm a finalidade não só de auxiliar no diagnóstico diferencial do espectro das doenças relacionadas às bactérias pertencentes ao gênero *Bartonella*, mas também de auxiliar nos estudos epidemiológicos das espécies e das cepas deste gênero.

2. OBJETIVOS

1. Identificar a bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene 16SrRNA e averiguar, por PCR, a presença de bactérias em sangue humanos.
2. Analisar um grupo controle que teve contato com animais e ectoparasitas e vários grupos de cardiopatas (endocardite infecciosa, arritmia cardíaca e Doença de Chagas) para verificarmos uma possível correlação entre a incidência da cardiopatia e a presença da bactéria.

3. FLUXOGRAMA DO TRABALHO



4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. População de estudo

Aspectos éticos: Os aspectos éticos referentes à experimentação com seres humanos foram aprovados pela Comissão de Ética da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar (CAAE 0024.1.135.000-06).

4.1.1.1. Indivíduos doadores de sangue

Foram estudados 104 indivíduos voluntários normais (grupo controle) sem apresentarem patologia cardíaca, mas que tiveram contato com animais e ectoparasitas (carrapatos) e 96 indivíduos voluntários cardiopatas, que apresentaram cardiopatias (arritmia cardíaca, endocardite) e que tiveram contato com animais e ectoparasitas. Estes indivíduos foram diagnosticados, avaliados e selecionados por um médico cardiologista e por médicos do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (ANEXO 1). Todos os indivíduos do grupo endocardite apresentavam cultura negativa e não estavam em tratamento com antibiótico.

Também foram estudados 69 indivíduos da Argentina (Buenos Aires e províncias), os indivíduos voluntários divididos em grupo controle (48) e grupo cardiopatas e alguns cardiopatas associados a Doença de Chagas (21). As coletas de sangue dos indivíduos selecionados foram realizadas na Universidad de Buenos Aires - UBA - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales /INGEBI – Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular.

4.1.1.2. Isolamento bacteriano

O isolamento da bactéria *Bartonella* foi realizado a partir de 15 amostras de sangue de animais domésticos (cães e gatos), para identificação morfológica da bactéria, utilizando meio específico. A espécie da *Bartonella* cresce em meio axênico a 37°C com 5% de gás carbônico, mas também pode crescer em meio de solução de soro fetal bovino e em cultura de tecido.

Foi utilizado o meio específico ágar base sangue columbia (CM 331-Oxoid), com sangue de coelho (5%) - (ágar chocolate). As placas de pétri foram colocadas na jarra de anaerobiose à uma atmosfera rica de gás carbônico (CAPNEIBAC é um gerador de dióxido de carbono CO₂ (5 a 10%) a uma temperatura de 37°C) (WINN *et al.*, 1997).

O período de incubação e crescimento bacteriano em meio específico foi de 28 dias. Todo o protocolo de preparo do meio e o isolamento bacteriano foi realizado no Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar, orientado pelo Prof. Dr. Clóvis Wesley O. de Souza.

4.2. METODOLOGIA

A identificação das bactérias foi feita por amplificação do fragmento do gene 16SrRNA como descrito por Breitschwerdt *et al.*, (1999). A figura 7 demonstra a região do Cluster 16S-23S e a figura 8 é visualizado com mais detalhes a região amplificada do 16S.

Para a amplificação foram utilizados os primers:

- **Bh16SF** (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3')
- **Bh16SR** (5'CCGATAAATCTTTCTCCCTAA 3').

4.2.1. CLUSTER 16S-23S RNA

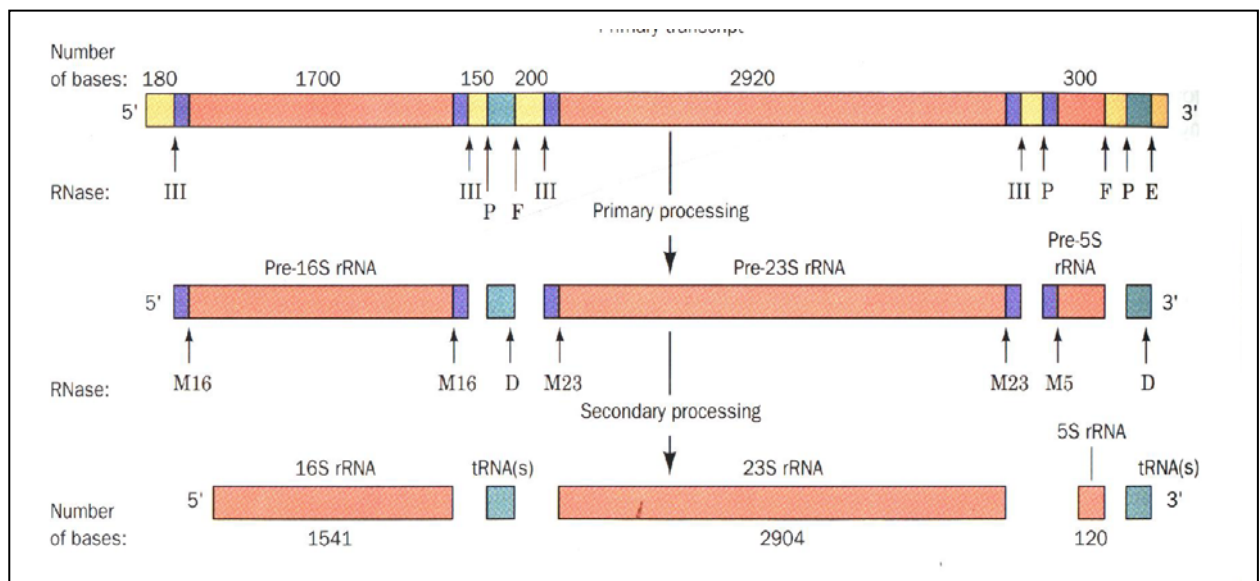


Figura 7: Representação esquemática do Cluster 16S - 23S de *E. coli*

A seguir é mostrada com mais detalhes a região amplificada.

4.2.2. ESTRUTURA DO 16S RNA

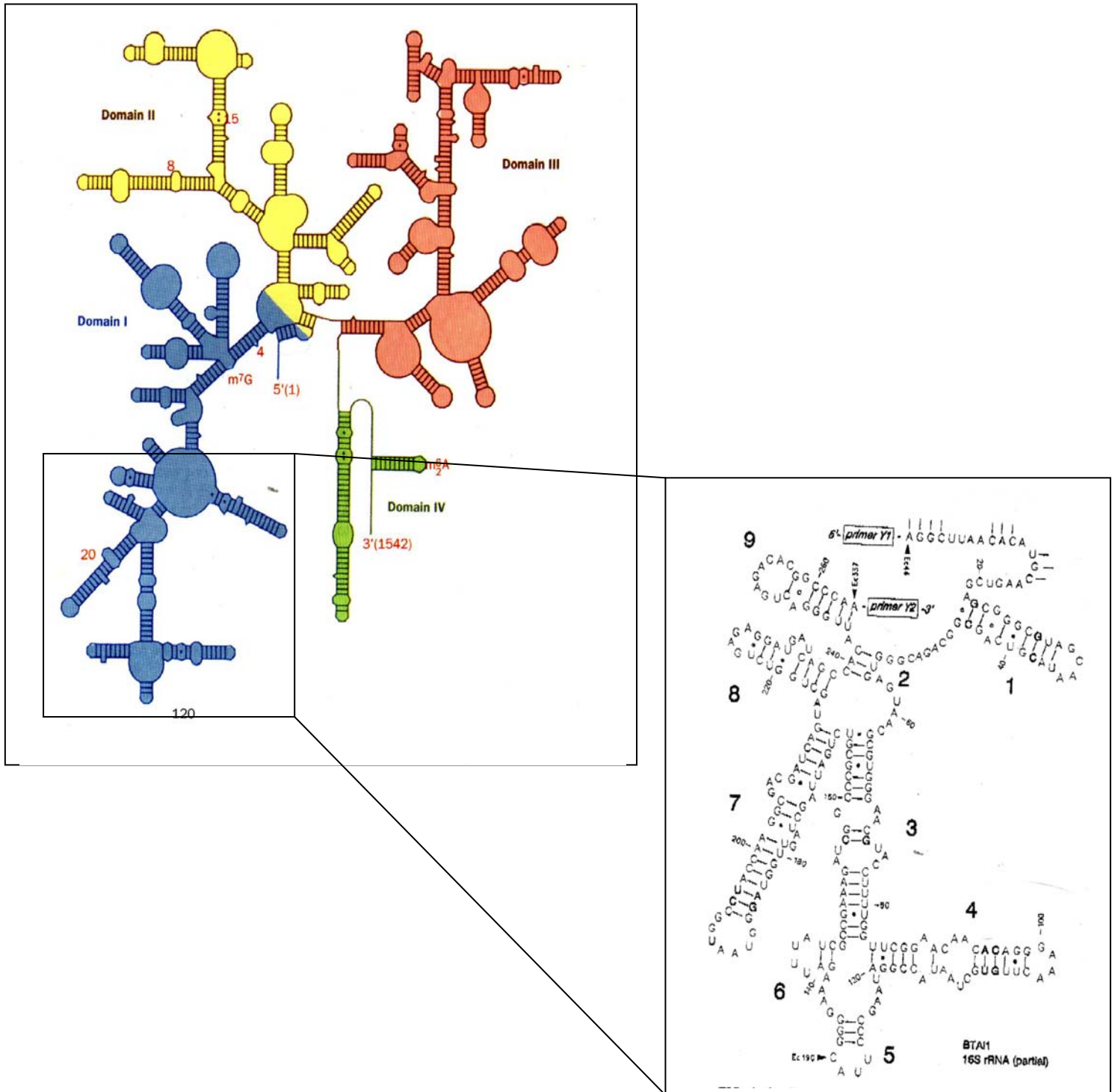


Figura 8: Representação esquemática do 16SrRNA de bactéria.

A região do 16S amplificada está em destaque.

4.3. Coleta das amostras de sangue dos humanos

Um ml de sangue venoso foi colhido em tubo Vacutainer, contendo 72 unidades U.S.P. de EDTA/ tubo, que foi utilizado para a extração de DNA genômico.

O DNA foi extraído a partir de 500 µl de sangue total, segundo modificação da metodologia descrita por DEBOMOY *et al.*, 1991.

Foi também utilizado outro protocolo de extração de DNA, segundo modificação da metodologia descrita por Cecilia Penedo (University of California - Davis - USA) (dados não publicados).

4.3.1. Extração de DNA genômico dos humanos, animais domésticos e dos ectoparasitas (DEBOMOY *et al.*, 1991)

Para a extração de DNA genômico foram utilizadas amostras sanguíneas de cães e gatos visando identificar e diagnosticar a incidência da bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* nestes organismos. Foram também realizadas extrações de DNA genômico de amostras de 21 ectoparasitas. Estes foram colocados em um tubo de 1,5 ml contendo 0,5 ml de sangue total, 1,0 ml de TTKM (10mM Tri- Hcl, pH=7,6; 10 mM KCl; 10mM MgCl₂; 2mM EDTA; 0,27% de Triton X-100) e homogeneizados até a lise das hemácias.

Após a centrifugação do material durante 5 minutos a 5.000 g, o sobrenadante foi descartado e o processo repetido mais uma vez. O precipitado nuclear foi lavado duas vezes com TKM 1 (10mM Tri- Hcl, pH=7,6; 10 mM KCl; 10mM MgCl₂; 2mM de EDTA) nas mesmas condições anteriores até que estivesse livre de hemoglobina. O precipitado nuclear foi então ressuspendido em 200 µl de TKM2 (10mM Tri- Hcl, pH=7,6; 10 mM KCl; 10mM MgCl₂; 2mM de

EDTA; 400mM de NaCl) juntamente com 20µl de SDS 10% (10g de Lauril Sulfato de Sódio em 100mL de água Milli-Q) e incubado a 55-60°C durante 15 minutos para promover a lise dos leucócitos. Ao final deste tempo, foram adicionados 50µl de NaCl 5M para precipitação das proteínas após centrifugação durante 10 minutos a 12.000 g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a ele adicionados dois volumes de etanol absoluto. O DNA foi então precipitado por centrifugação e lavado com etanol 70%. Depois de seco, o DNA foi ressuspendido em 30µl de água Milli-Q e armazenado a - 20°C.

A análise quantitativa das amostras de DNA extraído foi realizada em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo para através da comparação da intensidade da fluorescência com os padrões e com a concentração conhecida (High MASS DNA LADDER-INVITROGEN) obter um rendimento médio de aproximadamente 250 ng/µl.

4.3.2. Protocolo para Extração de DNA a partir do sangue - Veterinary Genetics Laboratory - University of Califórnia Davis, CA 95616

Foram utilizados 100 µl de sangue total para a extração de DNA genômico dos animais domésticos e ectoparasitas. Estes foram colocados em um tubo de Eppendorf de 1,5 ml contendo 100 µl de sangue, 3 volumes de solução NE 10 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 7 (0.29g NaCl, 1.86g EDTA, 500mL de água Milli-Q, pH 7.0) e Citrato de Sódio: 0.11M, pH 5.5) e lavados por 3 vezes.

Após a primeira lavagem o material foi centrifugado por 10 segundos a 14.000 g, descartado o sobrenadante e foi novamente adicionado 3 volumes de solução NE e o pellet ressuspendido. Este procedimento foi repetido mais uma vez e após a última lavagem o NE foi todo removido.

No tubo de Eppendorf foi visualizado um precipitado branco e adicionado 100 μ l da solução A (200 mM NaOH) ressuspendido e incubado (thermocycler) durante 15 minutos a 97°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 100 μ l da solução B (200 mM HCl + 100 mM Tris-HCl, pH 8.5).

Para a reação de PCR de 15-25 μ l é utilizado 1 μ l da solução de DNA.

4.4. Amplificação das amostras de DNA extraídas

Foram realizadas análises para identificar e diagnosticar se os indivíduos em experimento se encontravam infectados com a bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*. Foram realizadas amplificações por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) de amostras de DNA extraídas de sangue total dos indivíduos.

Também foi realizada a extração de DNA das amostras de sangue dos animais (cães e gatos) e ectoparasitas (*Rhipicephalus sanguineus*).

Os oligonucleotídeos utilizados foram solicitados em nosso laboratório a partir da sequência publicada anteriormente por Breitschwerdt *et al.*, 1999.

Estes oligonucleotídeos são Bh16SF (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') e Bh16SR (5'CCGATAAATCTTTCTCCCTAA 3') que amplificam um segmento de 185 pb do gene 16SrRNA.

Como controle da reação de amplificação, usamos os oligonucleotídeos P1-5EZ (5'ATAATCACATGGAGAGCCACAAGCT3') e P2-3EZ (5'GCACTTCTTTGGTATCTGAGAAAGT3') que amplificam um segmento de aproximadamente 400 pb dos genes ZFY e ZFX (Aasen *et al.*, 1990).

Para cada reação de PCR, foram utilizados 1µg de cada DNA em conjunto com 0,2 µg de cada primer, 250 µM de cada dNTP; Tampão (Tris-HCL 10 mM Tris-HCL pH 8,5; 25 mM KCL; 5mM (NH₄)SO₄; 2mM MgCl₂); 1,5U de Taq DNA Polimerase e H₂O q.s.p.100 µl.

Todas as reações de amplificação foram realizadas em termociclador "GENE AMP PCR System 2400" (Perkin Elmer), segundo o programa: 95°C por 30 segundos, 54°C por 1 minuto e extensão da cadeia a 72°C por 45 segundos. Este procedimento foi repetido durante 35 ciclos e foi seguido por uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

O termociclador foi configurado para o seguinte programa (Figura 9):

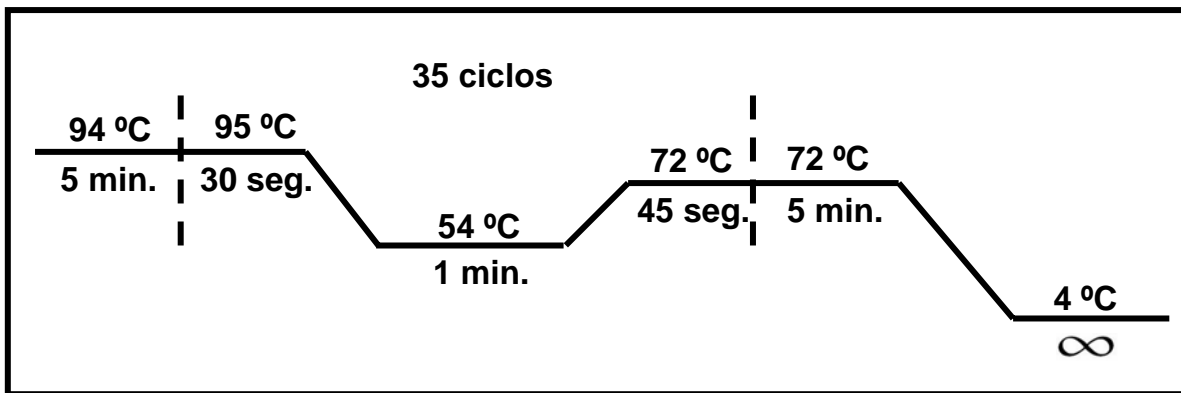


Figura 9: Programa utilizado nas reações de PCR visando a amplificação do fragmento da *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*.

Os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose 1,5% corado com Brometo de Etídeo para a confirmação do fragmento de 185 pares. O gel foi digitalmente fotografado utilizando câmara “Kodak Digital Science” e o software “Kodak Digital Science 1D”.

4.5. Purificação do DNA

Os produtos de amplificação dos indivíduos foram purificados em Perfectprep Gel Cleanup - Eppendorf e submetidos ao sequenciamento direto utilizando os primers Bh16SF e Bh16SR utilizados na amplificação.

4.5.1. Protocolo utilizado para a purificação de DNA a partir de gel de agarose (Kit Perfectprep Gel Cleanup – Eppendorf)

As amostras do produto amplificado foram aplicadas em gel de agarose 3%. Após isso, foi retirado o menor fragmento possível de gel contendo a banda a ser purificada. O fragmento foi pesado para a estimativa do volume em $1\text{mg} = 1\text{ul}$.

Após o gel ser pesado foi adicionado 3 volumes da solução “Binding Buffer”, incubado por 5 a 10 min a 50°C para que o gel seja dissolvido, mexendo pelo menos 2 a 3 vezes. Depois de completamente dissolvido foi adicionado 1 volume de isopropanol e mexido com auxílio de uma pipeta ou por inversão.

A amostra foi transportada para a coluna e colocada dentro de um tubo coletor e centrifugado por 1 min a 10.000 g. O precipitado foi descartado e centrifugado novamente, retirando todo o líquido. Foi adicionado 750 μl do “Wash Buffer” diluído na coluna, centrifugado por 1min 10.000 g e descartado o filtrado. Novamente foi centrifugado para retirar o que restou do wash buffer.

A coluna foi colocada em um novo tubo (limpo) e adicionado 30 ul de “elution buffer” ao centro da coluna e centrifugado por 1min de 6.000 a 10.000 g. A coluna foi descartada e armazenado o material filtrado (que representa o DNA purificado).

4.6. Sequenciamento do DNA

Para o sequenciamento foi utilizado o “DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit” (Amersham Pharmacia Biotech) e o sequenciador automático ABI Prism 377-DNA Sequencer (Perkin Elmer), seguindo o método dideoxi; descrito por SANGER *et al*, (1977).

A análise do seqüenciamento do DNA foi gentilmente realizada pelo Laboratório de Biologia Molecular (Universidade Federal de São Carlos UFSCar – São Carlos) sob a supervisão do Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva.

Para o sequenciamento dos produtos de PCR foram utilizados os mesmos primers utilizados na amplificação.

4.7. Análise em banco de dados

As seqüências obtidas foram submetidas ao Programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; ALTSCHUL *et al.*, 1990).

O alinhamento das seqüências foram comparadas entre si no programa MULTALIN (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>; CORPET, F. 1988).

4.8. Análise dos dados estatísticos

Os resultados foram analisados quanto às suas significâncias utilizando-se o teste de comparação: Teste estatístico Qui-quadrado.

4.8.1. Teste Qui-Quadrado

A definição teórica deste teste é mostrada a seguir:

Seja ε um experimento aleatório.

Sejam E_1, E_2, \dots, E_k , "K" eventos associados a ε .

Admita que o experimento seja realizado "n" vezes.

Sejam: Fo_1, Fo_2, \dots, Fo_k as freqüências observadas dos "K" eventos.

Sejam: Fe_1, Fe_2, \dots, Fe_k as freqüências esperadas, ou as freqüências teóricas, dos "K" eventos.

Para testar o grau de associação existente entre as variáveis, deve-se realizar um teste estatístico para verificar se há adequação de ajustamento entre as freqüências observadas e as freqüências esperadas, isto é se as discrepâncias $(Fo_i - Fe_i)$, $i = 1, 2, \dots, K$ são devidas ao acaso, ou se de fato existe diferença significativa entre as freqüências.

Procedimento para o teste Qui-Quadrado:

A) Enunciar as hipóteses, como segue:

H_0 : independência entre as variáveis

H_1 : dependência entre as variáveis.

B) Estabelecer o nível de significância α .

C) Calcular o valor de qui-quadrado, dado pela formula:

$$X^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(Fo_i - Fe_i)^2}{Fe_i}$$

D) Comparar o valor calculado de X^2 com o valor da tabela, ao nível de significância estabelecido e com $(K-1)$ graus de liberdade.

Toda vez que o valor calculado de X^2 for igual ou maior do que o valor da tabela rejeita-se a hipótese H_0 , de que a distribuição das frequências observadas esta de acordo com a esperada (independência entre as variáveis). Ou seja, não há adequação do ajustamento ao nível de significância estabelecido.

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento Bacteriano

No Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar foi realizado o isolamento bacteriano de 15 amostras de sangue de animais domésticos (cães e gatos) previamente selecionados. O período de incubação e crescimento bacteriano em meio específico foi de 28 dias (LA SCOLA *et al.*, 1999).

Após isso, foi realizada a colheita das colônias bacterianas que foram submetidas a análise por amplificação do DNA através de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para identificar se os animais em experimento se encontravam infectados com a bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* (figura 10).

Foi realizado o sequenciamento dos produtos de PCR da banda correspondente de 185 pb e a análise das seqüências obtidas confirmaram a presença da espécie da *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* em todos os animais.

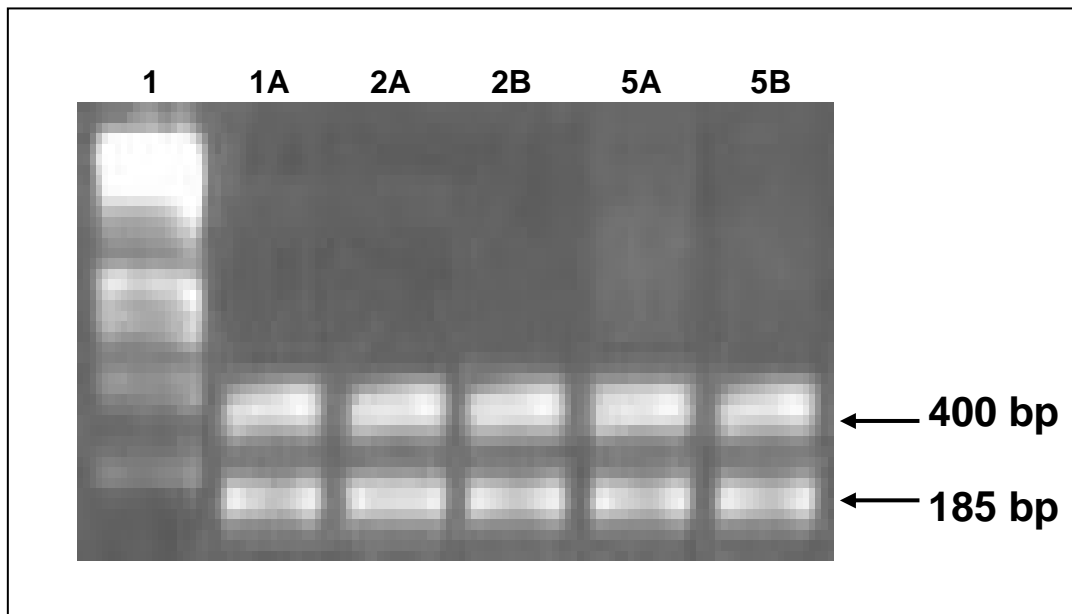


Figura 10. Análise dos produtos obtidos por amplificação de PCR de segmento do gene 16SrRNA da bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* a partir do DNA extraído das colônias bacterianas de 5 animais. Linha 1, Marcador Ladder 1 kb (GIBCO); linha 1A, 2A, 2B, 5A, 5B amostras das colônias bacterianas, observando a presença das bandas esperadas. As setas indicam as bandas referentes ao 16SrRNA (banda de 185bp). A presença da banda de 400bp provavelmente é devida ao sangue presente no meio de cultura.

5.2. Amplificação das amostras de DNA extraídos de ectoparasitas

Foram extraídos o DNA de 21 ectoparasitas (*Rhipicephalus sanguineus*). Após isso, foi realizada a análise por amplificação do DNA através de PCR para identificar se os ectoparasitas em experimento se encontravam infectados com a bactéria *Bartonella vinsonii* (figura 11).

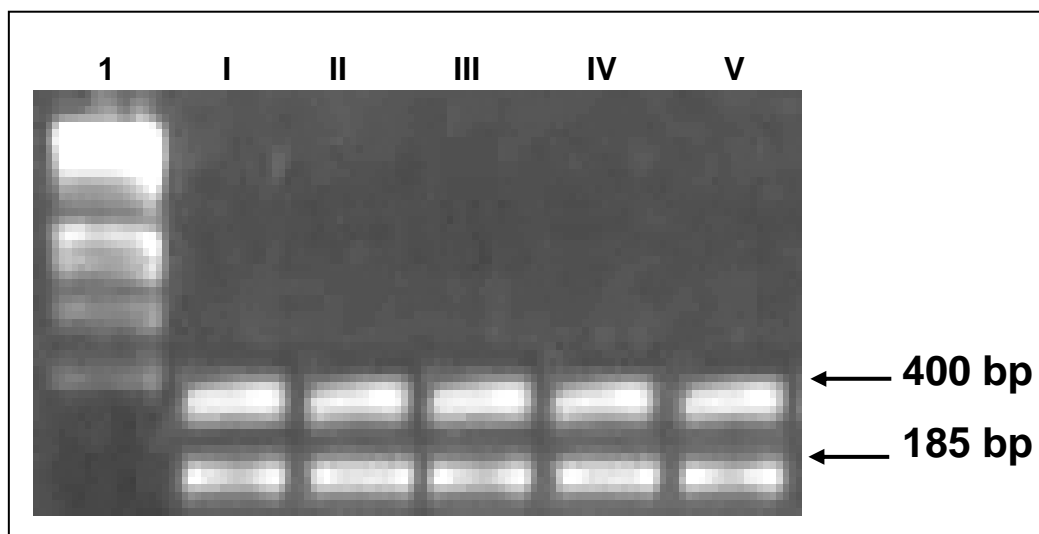


Figura 11. Análise dos produtos obtidos por amplificação de PCR de segmento do gene 16SrRNA da bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* a partir do DNA extraído de 5 ectoparasitas. Linha 1, Marcador Ladder 1 kb (GIBCO); linhas I, II, III, IV, V, amostras dos ectoparasitas, observando a presença das bandas esperadas. As setas indicam as bandas referentes ao 16SrRNA. (banda de 185bp). A presença da banda de 400bp provavelmente é devida ao sangue presente no trato digestivo dos animais.

5.3. Amplificação das amostras de DNA extraídos de humanos

Foram avaliadas amostras de DNA de 200 voluntários, sendo 96 homens e 104 mulheres, com faixa etária de 17 aos 97 anos de idade, selecionados clinicamente (tabela 5).

5.3.1. Grupo Controle (GC)

Para compor o grupo controle, a amostra foi estratificada. Foram selecionados 104 indivíduos voluntários normais sem apresentarem doença cardíaca diagnosticada, sendo 42 homens e 62 mulheres, mas que relataram contato com animais e ectoparasitas (carrapatos).

5.3.2. Grupo Cardiopatas (GCard)

Foram estudados 96 indivíduos voluntários, sendo 50 homens e 46 mulheres, apresentando cardiopatias diagnosticadas (arritmia cardíaca, endocardite e Doença de Chagas) com relato de terem contato com animais e ectoparasitas. Estes indivíduos voluntários foram diagnosticados, avaliados e selecionados por médicos cardiologistas do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia e da Universidad de Buenos Aires - UBA - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales /INGEBI – Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, em colaboração com o Prof. Dr. Alejandro G. Schijman.

O DNA extraído do sangue dos pacientes foi submetido a amplificação e os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1.5% para a detecção dos fragmentos de 185 pb e 400 pb.

Todas as amplificações revelaram o fragmento controle para 400 pb, que através de amostras de DNA amplifica os genes ZFY e ZFX para identificar os cromossomos sexuais em mamíferos. O fragmento de 185 pb corresponde ao gene 16SrRNA da espécie da *Bartonella vinsonii* subespécie *berkhoffii* estava presente em 16 voluntários do grupo controle, sendo 6 homens e 10 mulheres e 38 voluntários do grupo cardiopata (endocardite, arritmia e Doença de Chagas), sendo 20 homens e 18 mulheres, i.e., correspondendo a 15% e 39% respectivamente (figura 12, 13 e 14).

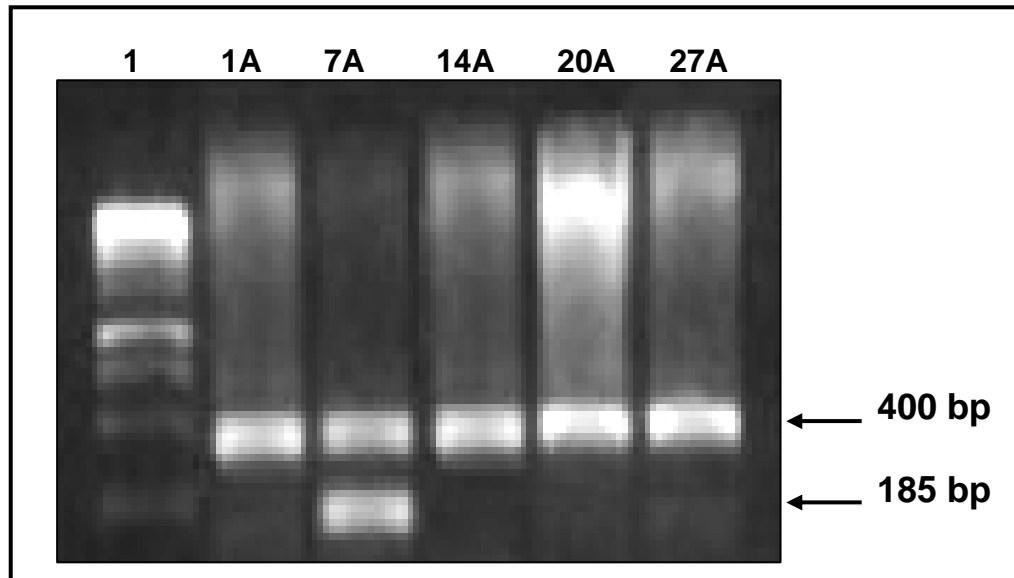


Figura 12. Análise dos produtos obtidos por amplificação de PCR de segmento do gene 16SrRNA da bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* a partir do DNA extraído de sangue total de humanos do grupo controle. Linha 1, Marcador Ladder 1 Kb (GIBCO); linhas 1A, 7A, 14A, 20A, 27A, amostras de humanos do grupo controle. Apenas na linha 3 observa-se a presença do fragmento de 185 pb. A seta indica as bandas referentes ao 16SrRNA.

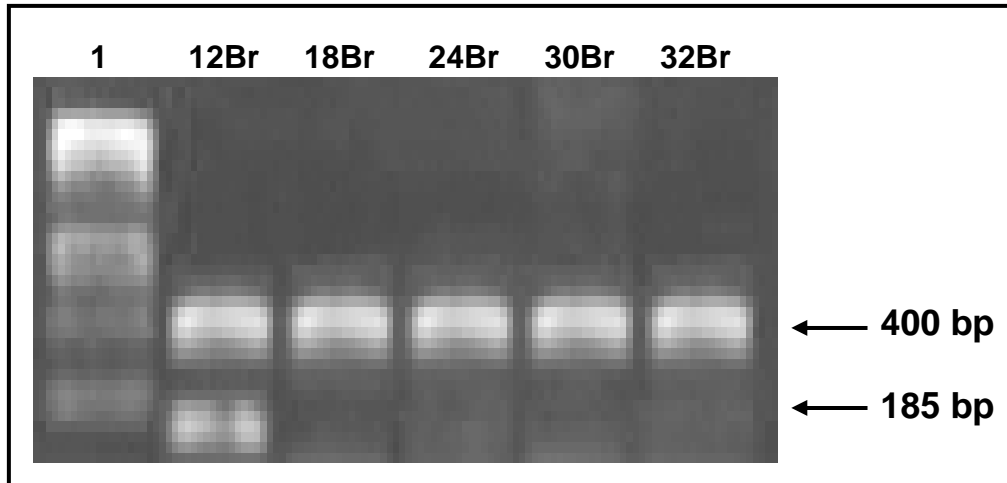


Figura 13. Análise dos produtos obtidos por amplificação de PCR de segmento do gene 16SrRNA da bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* a partir do DNA extraído de sangue total de humanos do grupo controle. Linha 1, Marcador Ladder 1 Kb (GIBCO); linhas 12Br, 18Br, 24Br, 30Br, 32Br, amostras de humanos do grupo controle. Apenas na linha 2 observa-se a presença do fragmento de 185 pb. A seta indica as bandas referentes ao 16SrRNA.

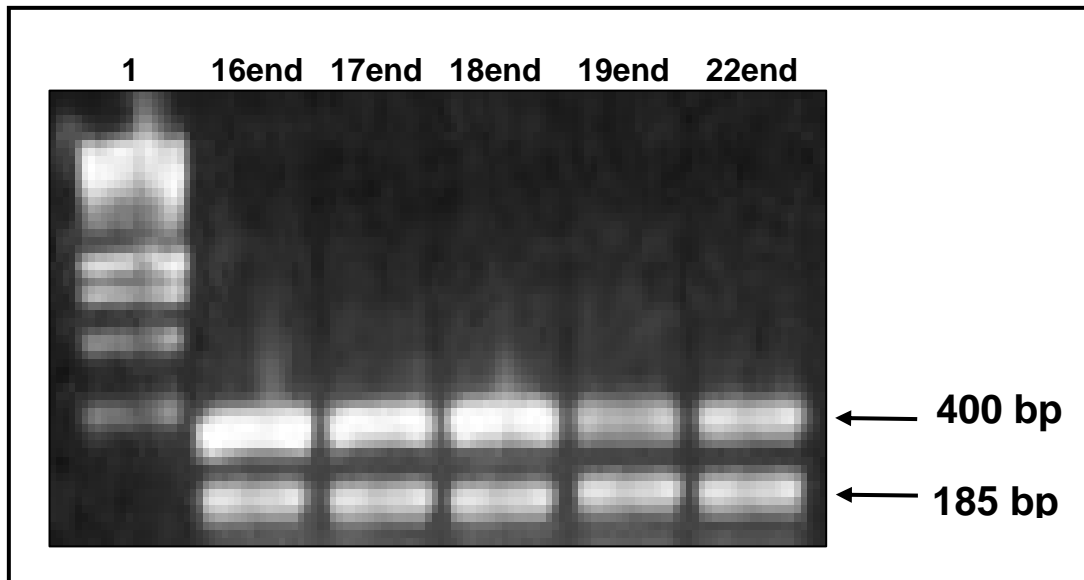


Figura 14. Análise dos produtos obtidos por amplificação de PCR de segmento do gene 16SrRNA da bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* a partir do DNA extraído de sangue total de humanos cardiopatas com endocardite. Linha 1, Marcador Ladder 1 Kb (GIBCO); linhas 16end, 17end, 18end, 19end, 22end, amostra de humanos com endocardite, observando o fragmento de 185 pb, confirmando a presença da banda esperada. A seta indica as bandas referentes ao 16SrRNA.

5.3.2.1. Grupo Cardiopatas - Endocardite e Arritmia Cardíaca

O grupo cardiopatas foi subdividido em doenças específicas, sendo possível observar que 47 voluntários, sendo 26 homens e 11 mulheres foram diagnosticados como portadores de endocardite infecciosa com cultura negativa e 26 voluntários com arritmia cardíaca (fibrilação atrial), sendo 15 homens e 11 mulheres.

Todos os indivíduos voluntários foram selecionados, avaliados e diagnosticados por médicos cardiologistas do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, relatando que tiveram contato com animais e ectoparasitas.

Após a extração do DNA sanguíneo dos 47 pacientes do grupo da endocardite e 26 pacientes do grupo da arritmia cardíaca, foi realizada a amplificação dos produtos e analisados em gel de agarose 1.5% para a detecção dos fragmentos de 185 pb e 400 pb.

O fragmento de 185 pb corresponde ao gene 16SrRNA da espécie da *Bartonella vinsonii* subespécie *berkhoffii* estava presente em 13 (28%) dos voluntários do grupo da endocardite (7 homens e 6 mulheres), (figura 15) e 12 (63%) do grupo da arritmia cardíaca (8 homens e 4 mulheres) (figura 16).

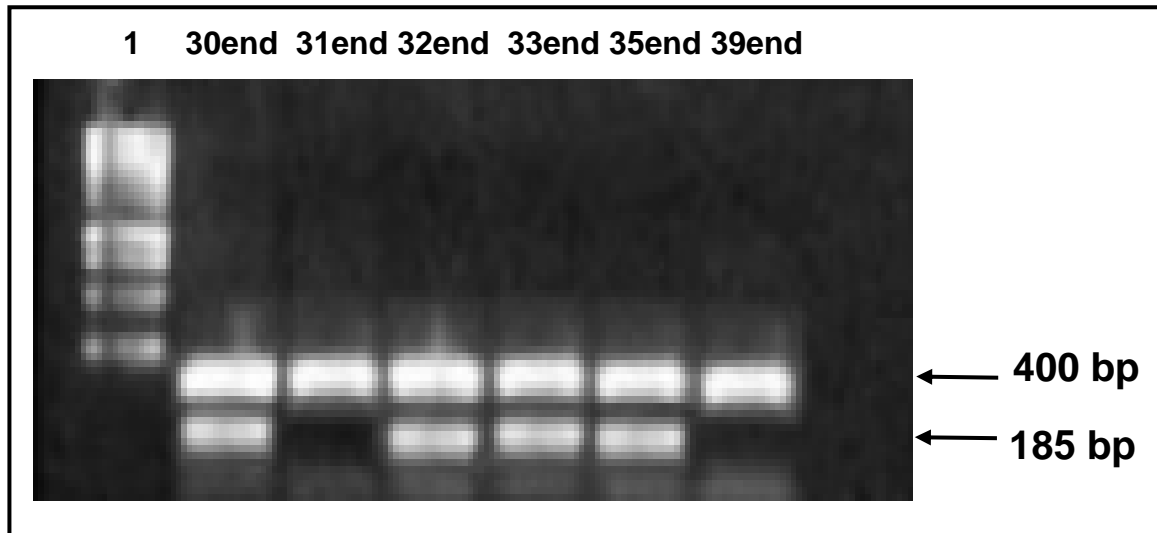


Figura 15. Análise dos produtos obtidos por amplificação de PCR de segmento do gene 16SrRNA da bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* a partir do DNA extraído de sangue total de humanos cardiopatas com endocardite. Linha 1, Marcador Ladder 1 Kb (GIBCO); linhas 30end, 31end, 32end, 33end, 35end, 39end, amostras de humanos cardiopatas (endocardite com cultura negativa), observando o fragmento de 185 pb nas linhas 30end, 32end, 33end, 35end confirmando a presença da banda esperada. A seta indica as bandas referentes ao 16SrRNA.

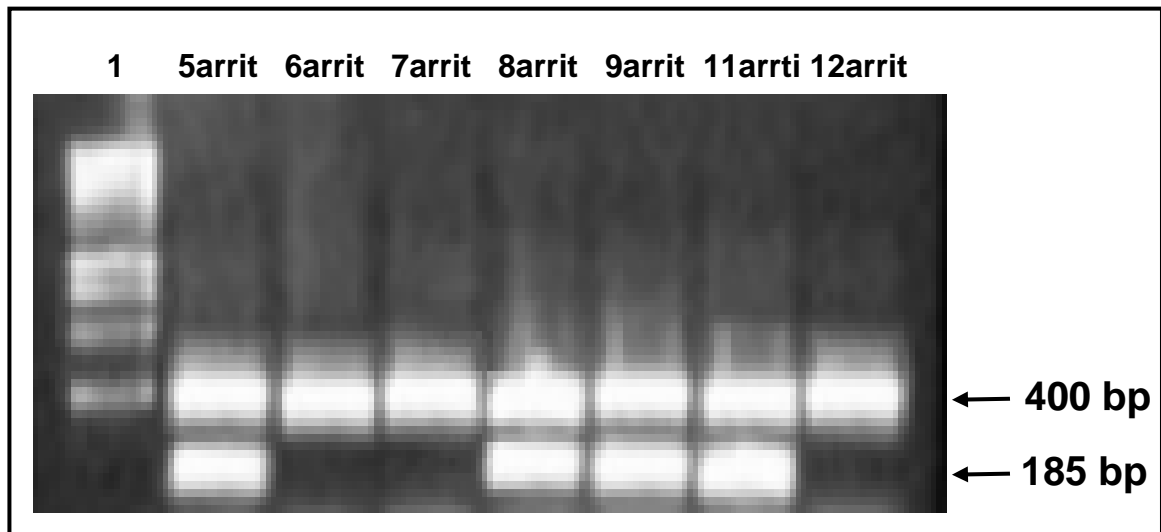


Figura 16. Análise dos produtos obtidos por amplificação de PCR de segmento do gene 16SrRNA da bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* a partir do DNA extraído de sangue total de humanos cardiopatas com arritmia. Linha 1, Marcador Ladder 1 Kb (GIBCO); linhas 5arrit, 6arrit, 7arrit, 8arrit, 9arrit, 11arriti, 12arrit, amostras de humanos cardiopatas (arritmia cardíaca – fibrilação atrial), observando o fragmento de 185 pb nas linhas 5arrit, 8arrit, 9arrit, 11arriti confirmando a presença da banda esperada. A seta indica as bandas referentes ao 16SrRNA.

5.3.2.2. Grupo Cardiopata – Doença de Chagas

Foram estudados 23 indivíduos voluntários que foram diagnosticados com Doença de Chagas. As amostras de DNA destes indivíduos foram selecionados pelo Prof. Dr. Alejandro G. Schijman da Universidad de Buenos Aires - UBA - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales /INGEBI - Instituto de Investigaciones en Ingenieria Genética y Biología Molecular.

O fragmento de 185 pb estava presente em 13 (62%) voluntários, sendo 5 homens e 8 mulheres que apresentavam Doença de Chagas (figuras 17 e 18).

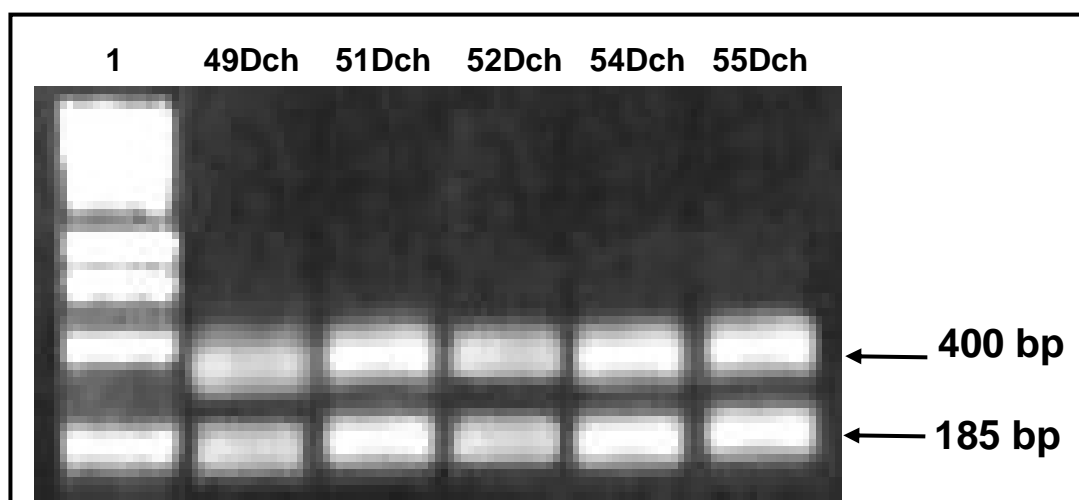


Figura 17. Análise dos produtos obtidos por amplificação de PCR de segmento do gene 16SrRNA da bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* a partir do DNA extraído de sangue total de humanos cardiopatas. Linha 1, Marcador Ladder 1 Kb (GIBCO); linha 49Dch, 51Dch, 52Dch, 54Dch, 55Dch, amostras de humanos cardiopatas (Doença de Chagas), observando o fragmento de 185 pb, confirmando a presença da banda esperada. A seta indica as bandas referentes ao 16SrRNA.

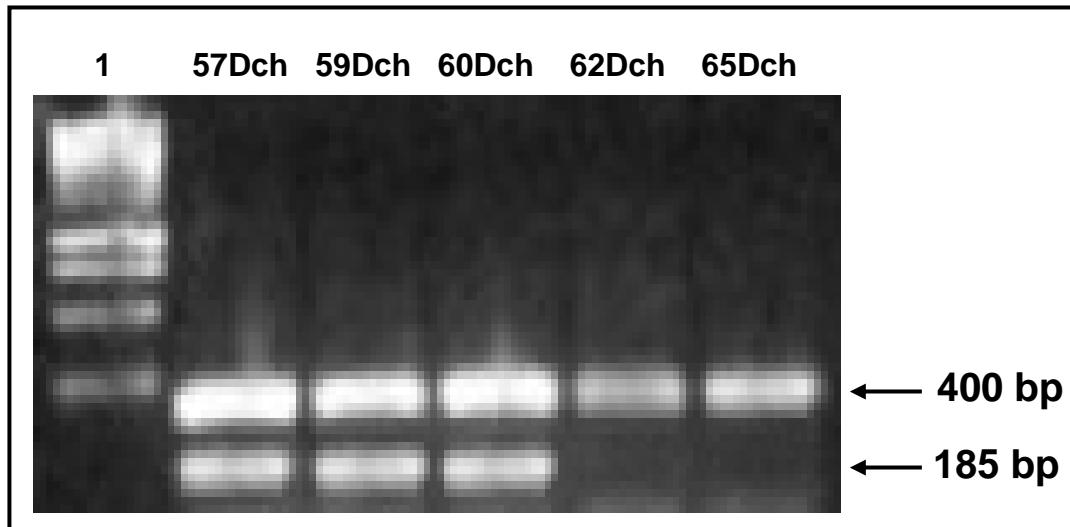


Figura 18. Análise dos produtos obtidos por amplificação de PCR de segmento do gene 16SrRNA da bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* a partir do DNA extraído de sangue total de humanos cardiopatas. Linha 1, Marcador Ladder 1 Kb (GIBCO); linha 57Dch, 59Dch, 60Dch, 62Dch, 65Dch, amostras de humanos cardiopatas (Doença de Chagas), observando o fragmento de 185 pb nas linhas 57Dch, 59Dch, 60Dch confirmando a presença da banda esperada. A seta indica as bandas referentes ao 16SrRNA.

5.4. Análise Estatística

Os resultados foram submetidos ao teste estatístico Qui-quadrado, para a associação entre a presença da bactéria e a cardiopatia e foram utilizadas as seguintes hipóteses:

H_0 : independência entre as variáveis

H_1 : dependência entre as variáveis

O resultado obtido foi: Cálculo Qui-quadrado = 14,83 e tabela Qui-quadrado = 5% e, com 1 gl = 3,84 (Tabela 5). Os resultados indicam uma associação entre a presença da bactéria e a cardiopatia, considerando-se todos os grupos de doença conjuntamente.

Como o qui-quadrado calculado é maior que o tabelado, rejeito H_0 ao nível de 5% de significância, isto é, existe associação entre a bactéria e a cardiopatia, ou os dados evidenciam dependência entre os fatores bactéria e cardiopatia (Tabela 6).

Tabela 5: Número de voluntários distribuídos por grupos e resultados da análise do PCR.

Grupos	PCR		Total
	positivo	negativo	
G. Controle	16 (15%)	88 (85%)	104 (100%)
G. Card	38 (39%)	58 (61%)	96 (100%)
Total	54 (27%)	146 (73%)	200 (100%)

G. Controle: grupo controle; G. Card: grupo cardiopata; PCR: reação da cadeia da polimerase; %: porcentagem

Tabela 6: Distribuição da presença da bactéria com PCR positivo por Grupos e sexo.

Grupos	PCR positivo		Total
	Homens	Mulheres	
G. Controle	6	10	16
G.Card. Endocardite	7	6	13
G.Card. Arritmia	8	4	12
G.Card. D de Chagas	5	8	13
Total	26	28	54

PCR: reação da cadeia da polimerase; G. Controle: grupo controle; G. Card: grupo cardiopata.

5.5. Sequenciamento do DNA

O sequenciamento realizado dos produtos de PCR e a análise das seqüências obtidas confirmaram a presença da espécie da *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* nos humanos (Figura 19, Genbank accession number: [U26258.1](#)), assim como o multialinhamento com a seqüência já descrita na literatura.

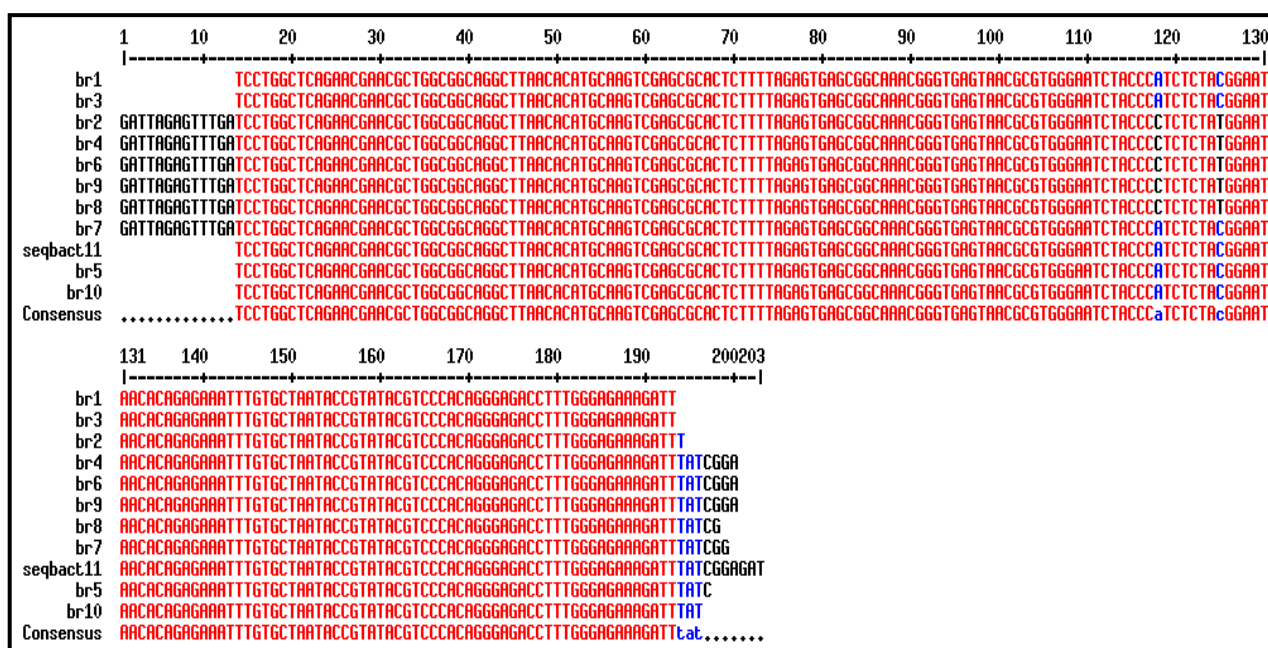


Figura 19. Representação do resultado do sequenciamento dos produtos de PCR de 10 amostras de humanos cardiopatas (arritmia cardíaca, endocardite e Doença de Chagas). Linhas 1 a 4, amostras de seqüências de humanos com endocardite (cultura negativa); linhas 5 e 6, amostras de seqüências de humanos com arritmia (fibrilação atrial); linhas 7 e 8, amostras de seqüências de humanos com Doença de Chagas; linhas 9 e 10, amostras de seqüências de humanos do grupo controle (não cardiopata), linha 11, parte da seqüência da bactéria *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* descrita na literatura, demonstrando a região consensu do sequenciamento.

6. DISCUSSÃO

As *Bartonellas* são consideradas agentes infecciosos emergentes (GARCIA-CACERES *et al.*, 1991; BREITSCHWERDT *et al.*, 1998) e recentemente, a espécie da *Bartonella* tem se expandido, pois este grupo é responsável por um grande espectro de doenças. Estudos da história natural da espécie *Bartonella* sugerem que estas bactérias se adaptaram aos anfitriões de reservatórios de mamíferos, causando infecções intraeritrocitárias crônicas, desencadeando uma bacteremia em até 50% da população dos anfitriões de reservatórios. Esta bacteremia é a fonte de infecção do vetor. (BASS *et al.*, 1997; BROUQUI *et al.*, 1999).

Os vetores e reservatórios de patógenos são difundidos no ambiente e o modo de vida das pessoas favorece contato direto com eles (AZEVEDO *et al.*, 2000).

Os mamíferos são infectados pelas espécies da *Bartonella* representando um grande reservatório para infecção humana porque a maioria das espécies da *Bartonella* são consideradas zoonoses. Gatos são os reservatórios principais para a *Bartonella henselae*, *B. clarridgeiae* e *B. koehlerae*. Os cães podem ser infectados pelas *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. washoensis*, *B. elizabethae* e *B. quintana*. O papel dos cães como reservatório da espécie da *Bartonella* é importante, mas é menos evidente do que o dos gatos porque cães domésticos são considerados anfitriões acidentais. Estes novos vetores potenciais (carrapatos e picadas de moscas) foram identificados como zoonoses emergentes (BREITSCHWERDT *et al.*, 2001; CHOMEL *et al.*, 2006).

LEMOS *et al.*, (1996) relataram que o papel do vetor na infecção pelas *bartonellas* precisa ser melhor estudado. Na febre maculosa brasileira a ativação do agente ocorre no vetor e a infecção não acontece sem este processo.

JUST *et al.*, (2008) coletaram 952 pulgas de 148 gatos e 133 cachorros de 18 localizações geográficas amplamente distribuídas na Alemanha e França. Através de exame de PCR observaram a presença de 6 espécies de *Bartonella* diferentes nestes ectoparasitas (*Bartonella bacilliformis*, *Bartonella clarridgeiae*, *Bartonella elizabethae*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana* e *Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii*). A evidência molecular de infecções por *Bartonella* revela que esses agentes de zoonose são potencialmente encontrados em populações de pulgas na Alemanha e na França. O espectro das espécies de *Bartonella* pode variar significativamente de país a país.

Os carrapatos são tanto reservatórios como vetores da *Rickettsia rickettsii* e apenas algumas espécies de pequenos mamíferos desenvolvem a patologia durante a infecção aguda. Mamíferos maiores, como cães e homens, desenvolvem doença clínica, porém, a baixa quantidade do agente no sangue destes inviabiliza a transmissão a novos carrapatos, impossibilitando-os de se tornarem reservatórios. Os carrapatos não infectam um novo hospedeiro até que tenham sugado o primeiro por pelo menos cinco a 20 horas. Assim, a doença humana é adquirida após contato prolongado com os carrapatos, a menos que estes tenham estado sugando um outro hospedeiro, estando aptos a induzir a infecção. O certo é que os carrapatos são fundamentais para a transmissão da doença em condições naturais. A relação dos cães com a infecção humana parece residir na exposição comum dos animais e seus

proprietários ao carrapato infectante. Os cães servem como organismos sentinelas para a infecção humana (GREENE, 1987).

Com relação ao vetor que transmite a *Bartonella vinsonii* subespécie *berkhoffii*, foram detectadas bactérias em ectoparasitas, indicando que estes podem ser considerados vetores dos microorganismos (BREITSCHWERDT *et al.*, 1999).

Estudos prévios implicaram que os carrapatos são vetores potenciais de *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* (DOLAN *et al.*, 1993; BIRTLES *et al.*, 1995; PAPPALARDO *et al.*, 1997; BREITSCHWERDT *et al.*, 1998; CHANG *et al.*, 2001).

Neste estudo foi possível analisar o DNA extraído de 21 ectoparasitas (*Rhipicephalus sanguineus*) e surpreendentemente foi observado que 13 (61,90%) apresentavam amplificação positiva para *Bartonella* nestes parasitas. Estes resultados estão de acordo com os estudos de BASS *et al.*, (1997) que consideraram que o ectoparasita é um fator de risco para a infecção por *B. vinsonii*, *E. canis* e *Babesia canis*. Além disso, a presença da bactéria *Bartonella vinsonii* subespécie *berkhoffii* no sangue de cães pode estar associado com o desenvolvimento de problemas cardíacos nestes animais

BREITSCHWERDT *et al.*, (1999) observaram a existência de casos de cardiopatias em cães causadas por infecção pela *Bartonella vinsonii* subespécie *berkhoffii* e membros relacionados da subdivisão *Alpha-Proteobactérias*, sendo considerados uma zoonose.

LOULY *et al.*, (2006) avaliaram a presença de carrapatos em 46 trabalhadores de ambos os sexos (21 homens e 25 mulheres) de oito clínicas veterinárias e três canis, por meio de questionário e da identificação dos

carrapatos encontrados. Neste estudo, 68% das mulheres e 71% dos homens relataram já ter encontrado carrapatos andando ou fixados no corpo, após contato com cães. Desta forma, eles concluíram que o contato com o carrapato do cão *Rhipicephalus sanguineus* pode parasitar pessoas que trabalham diretamente com cães em clínicas e canis.

DEHIO & SANDER, (1999) concluíram que a *Bartonella* tem sido considerada um “patógeno emergente” e relevante. Desde então, têm observado um aumento no número de espécies de *Bartonellas* identificadas e o espectro clínico associado à infecção por espécies deste gênero.

São reconhecidas 18 espécies de *Bartonellas* sendo oito delas consideradas patogênicas ao homem (ELLIS *et al.*, 1999).

Outras espécies dessas bactérias vêm sendo descritas por KOSOY *et al.*, 1999, devido ao encontro de cepas ainda não-identificadas entre ratos.

Os quadros clínicos mais característicos da infecção por espécies deste gênero são: Doença de Carrión (DC), Febre das Trincheiras (FT), Doença da Arranhadura do Gato (DAG) e a Angiomatose Bacilar (AB) (VELHO, 2001).

Dessa forma, a infecção por essas bactérias vem ampliando rapidamente e tornando-se mal definida. Porém, a falta de padronização dessas técnicas e a inexistência de uma com sensibilidade e especificidade adequada tem gerado inconstância nos resultados dos diagnósticos. Soma-se a isto o desconhecimento sobre a patogênese da infecção por esses microorganismos (VELHO, 2001).

A infecção assintomática por *Bartonellas* é bastante freqüente. Estatisticamente, 60% dos habitantes da região endêmica da DC eram soropositivos para *B. bacilliformis*. Em circunstâncias epidêmicas, 40% das

peças aparentemente saudáveis tinham piolhos infectados com a *B. quintana*. Além disso, a soropositividade à *B. henselae* na população normal da Suíça chegou a 48% e 19% na Alemanha. Dois a seis por cento da população norte-americana apresentaram positividade de anticorpos anti-*B. henselae*. Dentre os usuários de drogas de Baltimore, 33% apresentaram-se soro reagentes para a *B. elizabethae* (GARCIA-CACERES & GARCIA, 1991; COMER *et al.*, 1996; BASS, VINCENT, PERSON, 1997a; RATH, *et al.*, 1997, BERGMANS *et al.*, 1997).

A infecção pela *B. quintana* em humanos pode ser crônica como a infecção pela *B. henselae* em gatos. Isto pode ser documentado por bacteremia assintomática por 15 meses após a febre de Oroya e o isolamento de *B. quintana* de hemocultura de paciente com história de infecção acidental pela bactéria há oito anos (BROUQUI *et al.*, 1999).

As *Bartonellas* mantêm relações filogenéticas com as riquetsias. Os microorganismos dos dois gêneros têm tropismo por células endoteliais e podem ser veiculadas por carrapatos, pulgas, mosquitos e piolhos (VELHO 2001).

PIÉMONT & HELLER (1999) mencionaram que a *B. quintana* é responsável pela febre das trincheiras em pacientes imunocompetentes e a *B. henselae* por uma resposta granulomatosa e supurativa que se resolve espontaneamente nesses pacientes. Em imunodeficientes, a resposta a ambas pode ser vaso-proliferativa, com as bactérias sendo encontradas tanto extra como intracelularmente. A infecção pode ser progressiva e letal na ausência de antibióticos. No soro positivo (HIV) a infecção pela *B. henselae* é de

desenvolvimento insidioso e sintomático (mal-estar, fadiga, perda de peso e febre recorrente).

Recentes estudos realizados com a *Bartonella*, relataram que a bactéria *Bartonella* é uma das causas mais importantes de doenças envolvendo pacientes com endocardite e cultura-negativa no sangue. A soroprevalência estudada nos Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro mostraram a presença de anticorpos positivos para *Bartonella* em adultos saudáveis (IgG 14%) e em pacientes adultos com HIV soropositividade de 40% (LAMAS *et al.*, 2007).

SICILIANO *et al.*, (2006) relataram nos seus estudos investigatórios realizados no Instituto do Coração (INCOR-Brasil), o envolvimento de maneira significativa da *Coxiella burnetii*, da *Bartonella henselae* e da *B. quintana*, analisaram 61 pacientes portadores de endocardite infecciosa, sendo que 17 (27%) apresentaram cultura negativa no sangue, sugerindo que a infecção pela espécie da *Bartonella* e a *C. burnetii* no Brasil devem ser investigadas e consideradas como agentes causadores de endocardite.

O diagnóstico de endocardite infecciosa foi realizado de acordo com os Critérios de Duque modificado descrito a seguir:

- Critérios maiores: isolamentos dos agentes comuns de Endocardite Infecciosa em duas hemoculturas distintas, sem foco primário; microorganismos compatíveis com endocardite infecciosa, isolados em hemoculturas persistentemente positivas; única cultura ou sorologia positiva para *Coxiella burnetii*; aparecimento de sopro ou mudança de sopro pré-existente; ecocardiograma com evidências de endocardite.
- Critérios menores: fator predisponente para Endocardite Infecciosa; febre; fenômenos vasculares (exceto petéquias e outras hemorragias);

fenômenos imunológicos (presença de fator reumatóide, glomerulonefrite, nódulo de Osler ou manchas de Roth); hemocultura positiva.

Além disso, uma série de exames contribui para o diagnóstico tais, como: hemograma, hemocultura, VHS, proteína C reativa, ECG e ecocardiograma transtorácico. Após o isolamento do agente infeccioso, a antibioticoterapia deve ser ajustada de acordo com o resultado da cultura, antibiograma e PCR (MYLONAKIS *et al.*, 2001; MILAZZO *et al.*, 2001; EYKYN *et al.*, 2001; PIPER *et al.*, 2001; GRAHAM *et al.*, 2002).

VIKRAM *et al.*, (2007) relataram um caso de endocardite por *Bartonella henselae* envolvendo lesão das válvulas protéticas mitral e aórtica.

A maioria dos pacientes com endocardite infecciosa devido a *Bartonella henselae*, apresentam um histórico de exposição e contato direto com gatos. As lesões da válvula do coração são pré-existentes. Um paciente foi diagnosticado com a DAG e aproximadamente seis meses após, começou a desenvolver endocardite infecciosa da válvula mitral causada pela *B. henselae* (GOURIET *et al.*, 2007).

Em Nashville (USA) foi estudado um caso de uma criança de 14 anos com história médica de válvula aórtica bicúspide congênita, apresentando endocardite com cultura-negativa. Estudos moleculares identificaram que a *Bartonella henselae* foi o organismo causador da patologia e estudos sorológicos confirmaram o diagnóstico. Estudos moleculares através da técnica de PCR, deveriam ser habitualmente utilizados na avaliação de todos os casos de endocardite com cultura-negativa, para ser rapidamente diagnosticado e realizado o tratamento adequado. A endocardite pela *Bartonella henselae* deve

ser considerada em todas as crianças com endocardite com cultura-negativa (PITCHFORD *et al.*, 2006).

Na Espanha em 2007 foram relatados 3 casos de endocardite devido a espécie da *Bartonella henselae*. A idade mediana dos pacientes era 51,6 anos e 83,3% eram homens. Havia história de contato com gatos em 66,7%, e 50% eram alcoólicos. Este patógeno deve ser investigado em pacientes com culturas negativas no sangue, história de alcoolismo crônico, pacientes sem residência, pacientes que tiveram contato com gatos ou que foram mordidos por pulgas ou piolhos, como também os pacientes com endocardite e sorologia positiva para a espécie de *Chlamydia* (OTEO *et al.*, 2007).

BOULOUIS *et al.*, (2005) relataram casos de endocardite em humanos envolvendo a espécie da *Bartonella* que apresentam lesões vegetativas e a localização é preferencialmente na válvula aórtica. A maioria dos casos de endocardite pela *B. henselae* apresenta resultado negativo em cultura, mas por amplificação de DNA o resultado é positivo.

Informações estas que vão ao encontro do nosso trabalho onde 13 (28%) dos 47 pacientes avaliados pertencentes ao grupo endocardite apresentaram o fragmento de 185 pb correspondente ao gene 16SrRNA da espécie da *Bartonella vinsonii* subespécie *berkhoffii*, tendo uma correlação forte com a patologia endocardite. Além disso, dos 26 voluntários avaliados como portadores de arritmia cardíaca neste estudo, 12 (44%) apresentaram ter o mesmo comportamento, ou seja, a presença da bactéria.

LANG *et al.*, (2004) relataram que a endocardite infecciosa é diagnosticada pelo critério de Duque, mas particularmente este método pode ser inconclusivo quando as culturas de sangue são negativas. Foi realizado um

estudo com 98 pacientes que sofreram cirurgia para substituição de válvula. Vinte e oito pacientes foram diagnosticados com endocardite utilizando o critério de Duque; nove foram considerados com possível suspeita para endocardite e 61 não apresentavam nenhuma infecção microbiana conhecida ou endocardite prévia. A técnica de PCR demonstrou a presença de DNA bacteriano em 14 (70%) dos 20 pacientes diagnosticados com endocardite infecciosa, dois (22%) dos 9 pacientes identificados com possível suspeita para endocardite também apresentaram PCR positivo. A aplicação da técnica de PCR para pacientes valvulares tem se expandindo e demonstra ser um auxílio no diagnóstico do critério de Duque, melhorando assim as opções terapêuticas e antimicrobianas no procedimento pós-cirúrgico.

VOLDSTEDLUND *et al.*, (2008) avaliaram 74 pacientes com suspeita de endocardite infecciosa e 16 pacientes controles. A sensibilidade da cultura valvular foi de 26% e especificidade de 62%. A sensibilidade do PCR foi 72% e a especificidade de 100%. O PCR é mais sensível e específico que a cultura valvular e é um valioso suplemento para as análises de tecido valvular.

Deve-se levar em consideração a presença de fatores de risco: usuários de drogas injetáveis, focos dentários ou portadores de próteses valvulares que apresentam anemia ou insuficiência cardíaca de etiologia não definida e procedimentos invasivos como acesso venoso profundo (TAK *et al.*, 2002; BROWN *et al.*, 2002; KARCHMER *et al.*, 2002; MOREILLON *et al.*, 2002; MOREILLON *et al.*, 2004).

ENDER *et al.*, (2001) relataram que há envolvimento das *Bartonellas* com as doenças coronarianas, já que o papel da *Chlamydia pneumoniae* como

agente envolvido neste processo é conhecido e apresenta reação sorológica cruzada com espécies da *Bartonella*.

As reações podem ser diversas segundo WESSLEN *et al.*, (2001). Em seus estudos, quatro jovens suecos apresentaram parada cardiorespiratória de forma súbita resultando em morte, tendo sido detectada a infecção pela *B. henselae* e pela *B. quintana*.

A arritmia cardíaca é uma doença que apresenta distúrbios de condução elétrica e irritabilidade miocárdica (KUMAR *et al.*, 2005). É um problema na velocidade ou ritmo do batimento cardíaco. Durante uma arritmia o coração pode bater muito rápido, muito devagar, ou com ritmo irregular. Neste estudo, foi possível observar que 12 (63%) dos pacientes portadores de arritmia cardíaca avaliados apresentaram PCR positivo para bactéria *Bartonella*. A técnica de PCR pode contribuir para um diagnóstico diferenciado associando a bactéria *Bartonella* com a doença, auxiliando para um tratamento eficaz e seguro.

Outras doenças cardíacas necessitam de mais estudos para avaliação do envolvimento da *Bartonella* como a Doença de Chagas, onde foi possível observar neste estudo que 13 (62%) dos voluntários avaliados apresentaram PCR positivo.

A doença de Chagas tem como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*. A maioria dos indivíduos infectados estão em fase crônica da doença que pode expressar-se sob forma indeterminada, cardíaca, digestiva e cárdio-digestiva (BOZELLI *et al.*, 2006). Na forma crônica indeterminada os pacientes são assintomáticos, sem alterações no eletrocardiograma e na radiografia de tórax,

sendo que 2 a 5% podem evoluir anualmente para uma das formas clínicas da doença (DIAS *et al.*, 1989).

Com aprimoramento no diagnóstico parasitológico da doença na fase crônica, a baixa sensibilidade dos exames indiretos é uma limitação para sua aplicação ao diagnóstico e controle pós-terapêutico. A reação em cadeia da polimerase (PCR) apresenta alta especificidade e aponta para sua aplicação como método confirmatório no diagnóstico de pacientes com provas sorológicas duvidosas e como método auxiliar no controle pós-terapêutico da doença crônica em comparação às técnicas sorológicas e parasitológicas (PORTELA-LINDOSO *et al.*, 2003).

Dessa forma, o PCR vem demonstrando elevada sensibilidade na detecção de DNA de *T. cruzi* em amostras de pacientes com doença de Chagas (MOSER *et al.*, 1989; STURM *et al.*, 1989; DIAZ *et al.*, 1992; BRITTO *et al.*, 1993; JONES *et al.*, 1993; GOMES *et al.*, 1998).

CACERES-RIOS *et al.*, (1995) observaram que a técnica de PCR parece ser específica para o gênero de *Bartonella* porque não amplifica o DNA de várias outras espécies bacterianas.

As iniciativas de investigações básicas e clínicas associadas as técnicas moleculares têm facilitado na detecção do DNA bacteriano em amostras de sangue e começam a revolucionar o entendimento atual e as práticas médicas relacionadas com o manejo das enfermidades infecciosas transmitidas pelos vetores. Essa revolução do diagnóstico molecular se iniciou com as investigações relacionadas com a *Barbonella sp.*

MARIN *et al.*, (2007) avaliaram 176 pacientes por PCR e sequenciamento. Observaram que trinta e cinco dos 48 pacientes com diagnóstico de endocardite infecciosa apresentaram PCR positivo. No entanto, dos 129 pacientes que não apresentaram endocardite infecciosa e possuíam cultura negativa do sangue, o PCR apresentou resultado positivo para 6 pacientes. Desta forma, o método do PCR demonstrou ser mais sensível, específico e mais rápido do que os métodos convencionais de cultura, sugerindo que este deveria ser incluído como um dos critérios de Duque para o diagnóstico da endocardite infecciosa.

Um achado interessante no presente estudo do grupo endocardite foi que, um paciente voluntário submetido a 2 coletas de sangue para amplificação do DNA por PCR num período de 44 dias, apresentou resultado positivo para a identificação da bactéria *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*.

O diagnóstico clínico do paciente na primeira coleta foi estenose aórtica e após 44 dias o diagnóstico clínico do paciente foi de insuficiência aórtica. Este dado parece sugerir uma evolução da doença. No entanto, não foi feito em número suficiente para uma análise estatística.

DREIER *et al.*, (2008) relataram os dois primeiros casos já documentados de endocardite de cultura negativa na Alemanha devido à infecção pela bactéria *Bartonella henselae* e pela *B. quintana*. A contaminação da infecção no tecido valvular do coração foi descoberta através do PCR e foi posteriormente confirmado através de exame sorológico.

Neste trabalho, foi possível confirmar estes resultados analisando um grupo de voluntários cardiopatas e um grupo controle que tiveram contato com animais e ectoparasitas e os resultados estatísticos mostram que o qui-

quadrado calculado é maior que o tabelado, conduzindo a uma rejeição de H_0 , ao nível de 5% de significância, isto é, os dados evidenciam uma correlação entre os fatores da amplificação do DNA da bactéria *Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii* e as patologias endocardite infecciosa, arritmia cardíaca e Doença de Chagas. Além disso, um achado interessante observado foi que, dos 104 voluntários do grupo controle, 16 (15%) apresentaram a bactéria, tendo uma predominância maior em mulheres (10).

A amplificação do DNA da bactéria da *Bartonella* no grupo controle pode indicar que esses voluntários no futuro poderão manifestar algum tipo de doença cardíaca.

O estudo conjunto das *Bartonelloses* permite supor que bactérias deste gênero estejam envolvidas em quadros clínicos em que não se consegue determinar a etiologia ou que sejam considerados idiopáticos.

Métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos poderão contribuir para o entendimento destes questionamentos. As técnicas de detecção gênica por PCR têm sido usadas na DAG e a sua sensibilidade é maior no material aspirado do gânglio acometido (SLHESSANRENKO, 1998).

O método de PCR é considerado rápido, de grande sensibilidade e especificidade e elimina a necessidade de realização de outros recursos diagnósticos.

De acordo com os resultados, esta técnica deveria ser usada para complementar a cultura de sangue. As culturas convencionais são freqüentemente responsáveis por resultados falso-positivos e falso-negativos, e não é sempre estabelecido o agente etiológico da endocardite infecciosa.

A sensibilidade e especificidade dos métodos moleculares melhoraram os resultados dos diagnósticos comparados com os exames microbiológicos, demonstrando a sua relevância em microorganismos fastidiosos de crescimento lento e cultura negativa (BREITKOPF *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de uma metodologia para a detecção de patógenos bacterianos é necessário para a investigação do modo de transmissão do patógeno, bem como efeitos clínicos causados pelo mesmo.

Uma das principais medidas de controle seria a prevenção de infestações de carrapatos e pulgas em animais domésticos e em ambientes domiciliares. Os cães e gatos podem ser infectados em contato direto com o ectoparasita e posteriormente, podem transmitir a espécie da bactéria *Bartonella* a novos hospedeiros, incluindo os humanos.

A utilização de repelentes a carrapatos e pulgas deveriam ser aplicados nos animais quando expostos a ambientes de alto risco não só para prevenir a infecção pela *Bartonella*, mas também outras infecções transmitidas por estes ectoparasitas.

7. CONCLUSÃO

Estes estudos indicam que a bactéria *Bartonella vinsonii subsp. Berkhoffii* está presente no nosso meio e sem dúvida é subestimada. A entidade deve ser suspeitada em pacientes com hemocultura negativa, antecedentes epidemiológicos, contato com animais domésticos e picadas de ectoparasitas.

O método de diagnóstico através do PCR é considerado um meio rápido, de grande sensibilidade e especificidade, eliminando a necessidade da realização de outros recursos de diagnósticos.

O desenvolvimento de uma metodologia para a detecção de patógenos bacterianos é necessário para a investigação do modo de transmissão do patógeno, bem como efeitos clínicos causados pelo mesmo.

Além disso, medidas de controle como prevenção de infestações de carrapatos e pulgas em animais domésticos e em ambientes domiciliares se fazem necessários.

PERSPECTIVAS

- Desenvolvimento de um Kit de diagnóstico molecular envolvendo vários oligonucleotídeos específicos para as espécies da *Bartonella* (*B. quintana*, *B. henselae*, *B. elizabethae* e *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*) tornando possível desenvolver um método padrão para ser utilizado em pacientes cardiopatas (Endocardite Infecciosa (cultura negativa), Arritmia Cardíaca e Doença de Chagas), auxiliando os médicos tanto no diagnóstico como também no acompanhamento terapêutico.
- Utilizar a técnica de PCR em Tempo Real para quantificar a bactéria *Bartonella*, permitindo que a amplificação e a detecção ocorram simultaneamente e, além disso, utilizar sondas direcionadas que tornam o ensaio altamente sensível e específico no diagnóstico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASEN, E. N.; MEDRANO, J. F. Amplification ZFI and ZFX Genes for Sex Identification in Human, Cattle, Sheep and Goats. **Biotechnology**, v. 8, p. 1279 -1281, 1990.

ANDERSON, B. E.; NEUMAN, M. A. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. **Clin. Microbiol.**, v. 10, p. 203-219, 1997.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol.**, v. 215, n. 3, p. 403-10, 1990.

AVIDOR, B.; GRAIDY, M.; EFRAT, G.; LEIBOWITZ, C.; SHAPIRA, G.; SCHATNER, A.; ZIMHONY, O.; GILADI, M. *Bartonella koehlerae*, a new cat-associated agent of culture-negative human endocarditis. **J Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 3462-3468, 2004.

AZEVEDO, Z. M.; HIGA, L. Y.; BOECHAT, M. B.; KLAPLAUCH, F. Cat–scratch disease caused by *Bartonella quintana* in an infant: an unusual presentation. **Rev. Bras. Med. Trop.**, v. 33, p. 313-17, 2000.

BASS, J. W.; VINCENT, J. M.; PERSON, D. A. The expanding spectrum of *Bartonella* infections: I. Bartonellosis and trench fever. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 16, p. 2-10, 1997.

BASS, J. W.; VINCENT, J. M.; PERSON, D. A. The expanding spectrum of Bartonella infections: II. Cat–Scratch disease. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 16, p. 163-79, 1997.

BATTISTINI, T. La verrue péruvienne (sa transmission par le phlébotome). **Sudam. Med. Chir.** v. 2, p. 719-724, 1931.

BERGMANS, A. M. C.; PEETERS, M. F.; SCHELLEKENS, J. F. P.; VOS, M. C.; SABBE, L. J. M.; OSSEWAARDE, J. M.; VERBAKEL, H.; HOOFT, H. J.; SCHOOLS, L. M. Pitfalls and fallacies of cat scratch disease serology: evaluation of Bartonella henselae based indirect fluorescence assay and enzyme - linked immunoassay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 1931-7, 1997.

BIRTLES, R. J.; HARRISON, T. G.; MOLYNEUX, D. H. *Grahamella* in small woodland mammals in the U.K.: isolation, prevalence and host specificity. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 88, p. 317-327, 1995.

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

BIRTLES, R. J.; CANALES, J.; VENTOSILLA, P.; ALVAREZ, E.; GUERRA, H.; LLANOS-CUENTA, A.; RAOULT, D.; DOSHI, N.; HARRISON, T. G. Survey of Bartonella species infecting intradomicillary animals in the Huayllacallan

Valley, Ancash, Peru, a region endemic for human bartonellosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 60, p. 799-805, 1999.

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, n. 3, p. 383-410, 2005.

BOZELLI, C. E.; ARAÚJO, S. M.; GUILHERME, A. L. F.; GOMES, M. L. Perfil clínico-epidemiológico de pacientes com doença de Chagas no Hospital Universitário de Maringá, Paraná, Brasil. **Cad. Saúde Pública.**, v. 22, n. 5, 2006.

BREITKOPF, C.; HAMMEL, D.; SCHELD, H. H.; PETERS, G.; BECKER, K. Impact of a molecular approach to improve the microbiological diagnosis of infective heart valve endocarditis. **Circulation.**, v. 22, n. 11, p. 1415-21, 2005.

BREITSCHWERDT, E. B.; SONTAKKE, S.; CANNEDY, A.; HANCOCK, S. I.; BRADLEY, J. M. Infection with *Bartonella weissii* and detection of nanobacterium antigens in a North Carolina beef hurt. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 879-82, 2001.

BREITSCHWERDT, E. B.; ATKINS, C. E.; BROWN, T. T.; KORDICK, D. L.; SNYDER, P. S. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* and related members of the alpha subdivision of the *Proteobacteria* in dogs with cardiac arrhythmias, endocarditis, or myocarditis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 3618-3626, 1999.

BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; HANCOCK, S. I. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2645-2651, 1998.

BREITSCHWERDT, E. B.; KORDICK, D. L. Bartonella infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. **Clin. Microbiol.**, v. 13, p. 428-438, 2000.

BREITSCHWERDT, E. B.; KORDICK, D. L.; MALARKEY, D. E.; KEENE, B.; HADFIELD, T. L.; WILSON, K. Endocarditis in a dog due to infection with a novel *Bartonella* subspecies. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 154-160, 1995.

BRENNER, D. J.; O'CONNOR, S. O.; 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*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 43, p. 777-786, 1993.

BRENNER, S. A.; ROONEY, J. A.; MANZEWITSCH, P.; REGNERY, R. L. Isolation of *Bartonella (Rochalimae) henselae*: effects of methods of blood collection and handling. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 544-7, 1997.

BRITTO, C.; CARDOSO, M. A.; WINCKER, P.; MOREL, C. M. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA

present in blood samples and its use in polimerase chain reaction (PCR) based diagnosis of chronic Chagas' disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 88, p. 1711-2, 1993.

BROUQUI, P.; LA SCOLA, B.; ROUX, V.; RAOULT, D. Chronic *Bartonella quintana* bacteremia in homeless patients. **N. Engl. J. Med.**, v. 340, p. 184-189, 1999.

BROUQUI, P.; RAOULT, D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. **Clin. Microbiol.**, v. 14, p. 177-207, 2001.

BROUQUI, P.; RAOUL, T. D. New insight into the diagnosis of fastidious bacterial endocarditis. **Immunol Med Microbiol.**, v. 47, n. 1, p. 1-13, 2006.

BROWN, P. D.; LEVINE, D. P. Infective endocarditis in the injection drug user **Infect Dis Clin North Am.**, v. 16, n. 3, p. 645-65, 2002.

CACERES-RIOS, H.; RODRIGUEZ-TAFUR, J.; BRAVO-PUCCIO, F.; MAGUINA-VARGAS, C.; DIAZ, C. S.; RAMOS, D. C.; PATARCA, R. Verruga peruana: an infectious endemic angiomatosis. **Crit. Rev. Oncog.**, v. 6, p. 47-56, 1995.

CALZA, L.; MANFREDI, R.; CHIODO, F. Infective endocarditis: a review of the best treatment options. **Expert Opin Pharmacother.**, v. 5, n. 9, p. 1899-916, 2004.

CARITHERS, H. A. Cat-scratch disease: an overview based on a study of 1200 patients. **Am. J. Dis. Child.**, v. 139, p. 1124-1133, 1985.

CHANG, C. C.; CHOMEL, B. B.; KASTEN, R. W.; ROMANO, V.; TIETZE, N. Molecular Evidence of *Bartonella* spp. in Questing Adult *Ixodes pacificus* Ticks in California. **J. Clinical Microbiology.**, v. 39, n. 4, p. 1221-1226, 2001.

CHILDS, J. E.; ROONEY, J. A.; COOPER, J. L.; OLSON, J. E.; REGNERY, R. L. Epidemiological observations on infection with *Rochalimae* species among cats living in Baltimore, MD. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 204, p. 1775-8, 1994.

CHOMEL, B. B.; ABBOTT, R. C.; KASTEN, R. W.; FLOYD-HAWKINS, K. A.; KASS, P. H.; GLASER, C. A.; PEDERSEN, N. C.; KOEHLER, J. E. *Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 2445-50, 1995.

CHOMEL, B. B.; KASTEN, R. W.; FLOYD-HAWKINS, K.; CHI, B., YAMAMOTO, K.; ROBERTS-WILSON, J.; GURFIELD, A. N.; ABBOTT, R. C.; COMER, J. A.; FLYNN, C.; REGNERY, R. L.; VLAHOV, D.; CHILDS, J. E. Antibodies to *Bartonella* spp. in inner-city Baltimore intravenous drug users. **Arch. Intern. Med.**, v. 156, p. 2491-2495, 1996.

CHOMEL, B. B.; BOULOUIS, H. J.; MARUYAMA, S.; BREITSCHWERDT, E. B.

Bartonella spp. in pets and effect on human health. **Emerg Infect Dis.**, v. 12, n. 3, p. 389-94, 2006.

CHRISTIANSEN, S.; FEHSKE, W.; AUTSCHBACH, R. Aortic valve endocarditis with *Bartonella quintana* - a rare entity. **Herz.**, v. 30, n. 8, p. 761-3, 2005.

CLARRIDGE, J. E.; RAICH, T. J.; PIRWANI, D.; SIMON, B.; TSAI, L.; RODRIGUEZ-BARRADAS, M. C.; REGNERY, R.; ZOLLO, A.; JONES, D. C.; RAMBO, C. Strategy to detect and identify *Bartonella species* in routine clinical laboratory yields *Bartonella henselae* from immunodeficiency virus-positive patient and unique bartonella strain from his cat. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 2107-13, 1995.

COMER, J. A.; FLYNN, C.; REGNERY, R. L.; VLAHOV, D.; CHILDS, J. E. Antibodies to Bartonella species in inner-city intravenous drug users in Baltimore, Md. **Arch Intern Med.**, v. 156, n. 21, p. 2491-5, 1996.

CORPET, F., "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering". **Nucl. Acids Res.**, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.

CORREA, F. G. Detecção por PCR da presença de *Alpha-Proteobactérias* em cães com cardiopatias. Dissertação de mestrado, UFSCar. p. 68, 2002.

DALY, J. S.; WORTHINGTON, M. G.; BRENNER, D. J.; MOSS, W. C.; HOLLIS, D. G.; WEYANT, R. S.; STEIGERWALT, A. G.; WEAVER, R. E.;

DANESHVAR, M. I.; O'CONNOR, S. P. *Rochalimaea elizabethae* sp. nov. isolated from a patient with endocarditis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 872-881, 1993.

DEBOMOY, K. L.; NURNBERGER, J. I.; A Rapid Non Enzymatic Method for Preparation of HMW DNA from blood for RFLP Studies. **Nucleic Acids Res.**, v. 19, p. 5444, 1991.

DEHIO, C.; SANDER, A. *Bartonella* as emerging pathogens. **Trends Microbiol.**, v. 7, p. 226-8, 1999.

DIAS, J. C. P. The indeterminate form of human chronic Chagas disease. A clinical epidemiological review. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 22, p. 147-56, 1989.

DIAZ, C.; NUSSENZWEIG, V.; GONZALES, A. An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 46, p. 616-23, 1992.

DOLAN, M. J.; WONG, M. T.; REGNERY, R. L.; JORGENSEN, J. H.; GARCIA, M.; PETERS, J.; DREHNER, D. Syndrome of *Rochalimaea henselae* adenitis suggesting cat scratch disease. **Ann. Intern. Med.**, v. 118, p. 331-336, 1993.

- DOUGHERTY, M. J.; SPACH, D. H.; LARSON, A. M.; HOOTON, T. M.; COYLE, M. B. Evaluation of an extended blood culture protocol to isolate fastidious organisms from patients with Aids. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 2444-7, 1996.
- DRANCOURT, M.; MAINARDI, J. L.; BROUQUI, P.; VANDENESCH, F.; CARTA, A.; LEHNERT, F.; ETIENNE, J.; GOLDSTEIN, F.; ACAR, J.; RAOULT, D. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* endocarditis in three homeless men. **N Engl J Med.**, v. 332, p. 419-423, 1995.
- DREIER, J.; VOLLMER, T.; FREYTAG, C. C.; BÄUMER, D.; KÖRFER, R.; KLEESIEK, K. Culture-negative infectious endocarditis caused by *Bartonella spp.*: 2 case reports and a review of the literature. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 61, n. 4, p. 476-83, 2008.
- ENDER, P. T.; PHARES, J.; GERSON, G.; TAYLOR, S. E.; REGNERY, R.; CHALLENGER, R. C.; DOLAN, M. J. Association of Bartonella species and Coxiella burnetii infection with coronary artery disease. **J Infect Dis.**, v. 183, n. 5, p. 831-4, 2001.
- ELLIS, B. A.; REGNERY, R. L.; BEATI, L.; BACELLAR, F.; ROOD, M.; GLASS, G. G.; MARSTON, E.; KSIAZEK, T.G.; JONES, D.; CHILDS, J. E. Rats of the genus *Rattus* are reservoir hosts for pathogenic *Bartonella*. **J. Infect. Dis.**, v. 180, p. 220-224, 1999.

ELLIS, B. A.; ROTZ, L. D.; LEAKE, J. A. D.; SAMALVIDES, F.; BERNABLE, J.; VENTURA, G.; PADILLA, C.; VILLASECA, P.; BEATI, L.; REGNERY, R.; CHILDS, J. E.; OLSON, J. G.; CARRILLO, C. P. An outbreak of acute *bartonellosis* (Oroya fever) in the Urubamba region of Peru, 1998. **Am. J. Trop. Med.**, v. 61, p. 344-349, 1999.

EYKYN, S. J. Endocarditis: Basics. **Heart.**, v. 86, n. 4, p. 476-80, 2001.

FENOLLAR, F.; SIRE, S.; RAOULT, D. *Bartonella vinsonii subsp. arupensis* as an agent of blood culture-negative endocarditis in a human. **J Clin Microbiol.**, v. 43, p. 945-947, 2005.

FENOLLAR, F.; LEPIDI, H.; RAOULT, D. Whipple's endocarditis: review of the literature and comparisons with Q fever, *Bartonella* infection, and blood culture-positive endocarditis. **Clin Infect Dis.**, v. 33, n. 8, p.1309-16, 2001.

FICHET-CALVET, E.; JOMAE, I.; BEN ISMAEL, R.; ASHFORD, R. W. Patterns of infection of haemoparasites in the fat sand rat, *Psammomys obesus*, in Tunisia, and effect on the host. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 94, p. 55-68, 2000.

FOURNIER, P. E.; LELIEVRE, H.; EYKYN, S. J.; MAINARDI, J. L.; MARRIE, T. J.; BRUNEL, F.; ROURE, C.; NASH, J.; CLAVE, D.; JAMES, E.; BENOIT-LEMERCIER, C.; DEFORGES, L.; TISSOT-DUPONT, H.; RAOULT, D. Epidemiological and clinical features of *Bartonella* endocarditis: a case control study. **Medicine.**, v. 80, p. 245-251, 2001.

GARCIA, F.U.; WOJTA, J.; BROADLEY, K. N.; DAVIDSON, J. M.; HOOVER, R. L. *Bartonella bacilliformis* stimulates endothelial cells *in vitro* and is angiogenic *in vivo*. **Am. J. Pathol.**, v. 136, p. 1125-34, 1990.

GARCIA-CACERES, U.; GARCIA, F. U. Bartonellosis: an immunodepressive disease and the life of Daniel Alcides Carrión. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 95, n. 1, p. 58-66, 1991.

GERBER, J. E.; JOHNSON, J. E.; SCOTT, M. A.; MADHUSUDHAN, K. T.; Fatal meningitis and encephalitis due to *Bartonella henselae* bacteria. **J Forensic Sci.**, v. 47, n. 3, p. 640-4, 2002.

GOMES, M. L.; MACEDO, A. M.; VAGO, A. R.; PENA, S. D.; GALVAO, L. M.; CHIARI, E. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. **Exp Parasitol.**, v. 88, p. 28-33, 1998.

GOURIET, F.; LEPIDI, H.; HABIB, G.; COLLART, F.; RAOULT, D. From cat scratch disease to endocarditis, the possible natural history of *Bartonella henselae* infection. **BMC Infect Dis.**, v. 18, n. 7, p. 30, 2007.

GRAHAM, J. C.; GOULD, F. K. Role of aminoglycosides in the treatment of bacterial endocarditis. **J Antimicrob Chemother.**, v. 49, n. 3, p. 437-44, 2002.

GRAND, A.; CELARD, M.; EL BELGHITI, R.; GHADBAN, W.; DE GEVIGNEY, G.; DABBOURA, A.; BESNARD, C.; OUANES, K.; HURET, J. F.; FICHTER, P. Subacute infectious endocarditis due to the agent of cat scratch fever: *Bartonella henselae*. **Arch Mal Coeur Vaiss.**, v. 94, n. 2, p. 157-61, 2001.

GREENE, C. E. ROCKY MOUNTAIN SPOTTED FEVER. **J. AM. VET. MED. ASSOC.**, v. 191, p. 666-71, 1987.

GUCCION, J. G.; GILBERT, C. L.; ORTEGA, L. G.; HADFIELD, T. L. Cat scratch disease and acquired immunodeficiency disease: diagnosis by transmission electron microscopy. **Ultrastruct. Pathol.**, v. 20, p. 195-202, 1996.

HELLER, R.; KUBINA, M.; MARIET, P.; RIEGEL, P.; DELACOUR, G.; DEHIO, C.; LAMARQUE, F.; KASTEN, R.; BOULOUIS, H. J.; MONTEIL, H.; CHOMEL, B.; PIEMONT, Y. *Bartonella alsatica* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rabbits. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 49, p. 283-288, 1999.

HELLER, R.; RIEGEL, P.; HANSMANN, Y.; DELACOUR, G.; BERMOND, D.; DEHIO, C.; LAMARQUE, F.; MONTEIL, H.; CHOMEL, B.; PIEMONT, Y. *Bartonella tribocorum* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rats. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 48, p. 1333-1339, 1998.

HIGGINS, J. A.; RADULOVIC, S.; JAWORSKI, D. C.; AZAD, A. F. Acquisition of the cat scratch disease agent *Bartonella henselae* by cat fleas (*Siphonaptera pulicidae*). **J. Med. Entomol.**, v. 33, p. 490-5, 1996.

HOFMEISTER, E. K.; KOLBERT, C. P.; ABDULKARIM, A. S.; MAGERA, J. M. H.; HOPKINS, M. K.; UHL, J. R.; AMBYAYE, A.; TELFORD III, S. R.; COCKERILL III, F. R.; PERSING, D. H. Cosegregation of a novel *Bartonella* species with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* in *Peromyscus leucopus*. **J. Infect. Dis.**, v. 177, p. 409-416, 1998.

JADO, I.; OTEO, J. A.; ALDÁMIZ, M.; GIL, H.; ESCUDERO, R.; IBARRA, V.; PORTU, J.; PORTILLO, A.; LEZAUN, M. J.; GARCÍA-AMIL, C.; RODRÍGUEZ-MORENO, I.; ANDA, P. *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. **Emerg Infect Dis.**, v. 13, n. 9, p. 1405-7, 2007.

JENSEN, W. A.; FALL, M. Z.; ROONEY, J.; KORDICK, D. L.; BREITSCHWERDT, E. B., Rapid Identification and Differentiation of *Bartonella* Species Using a Single-Step PCR Assay. **Journal of Clinical Microbiology.**, v. 38, n. 5, p. 1717-1722, 2000.

JONES, E. M.; COLLEY, D. G.; TOSTES, S.; LOPES, E. R.; VNENCAK-JONES, C. L.; MCCURLEY, T. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 48, p. 348-57, 1993.

JUST, F. T.; GILLES, J.; PRADEL, I.; PFALZER, S.; LENGAUER, H.; HELLMANN, K.; PFISTER, K. Molecular Evidence for *Bartonella spp.* in Cat and Dog Fleas from Germany and France. **Zoonoses Public Health.**, v. 15, 2008.

KAREM, K. L.; PADDOCK, C. D.; REGNRRY, R. L. *Bartonella henselae*, *B. quintana*, and *B. bacilliformis*: historical pathogens of emerging significance. **Microbes Infect.**, v. 2, n. 10, p. 1193-205, 2000.

KARCHMER, A. W.; LONGWORTH, D. L. Infections of intracardiac devices. **Infect Dis Clin North Am.**, v. 16, n. 2, p. 477-505, 2002.

KELLY, P. J.; ROONEY, J. J. A.; MARSTON, E. L.; JONES, D. C.; REGNERY, R. L. *Bartonella henselae* isolated from cats in Zimbabwe. **Lancet.**, v. 351, p. 1706, 1998.

KERKHOFF, F. T.; BERGMANS, A. M. C.; VAN DER ZEE, A.; ROTHOVA, A. Demonstration of *Bartonella grahamii* DNA in ocular fluids of a patient with neuroretinitis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 4034-4038, 1999.

KOEHLER, J. E.; GLASER, C. A.; TAPPERO, J. W. *Rochalimaea henselae* infectiona new zoonosis with the domestic cat as reservoir. **JAMA.**, v. 271, p. 531-535, 1994.

KOEHLER, J. E.; QUINN, F. D.; BERGER, T. G.; LE BOIT, P. E.; TAPPERO, J. W. Isolation of *Rochalimaea* species from cutaneous and osseous lesions of bacillary angiomatosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 327, p. 1625-1631, 1992.

KORDICK, D. L.; SWAMINATHAN, B.; GREENE, C. E.; WILSON, K. H.; WHITNEY, A. M.; O'CONNOR, S.; HOLLIS, D. G.; MATAR, G. M.; STEIGERWALT, A. G.; MALCOLM, G. B.; HAYES, P. S.; HADFIELD, T. L.; BREITSCHWERDT, E. B.; BRENNER, D. J. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* subsp. nov., isolated from dogs; *Bartonella vinsonii* subsp. *vinsonii*; and emended description of *Bartonella vinsonii*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 46, p. 704-709, 1996.

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

KOSOY, M. Y.; REGNERY, R. L.; TZIANABOS, T.; MARSTON, E. L.; JONES, D. C.; GREEN, D.; MAUPIN, G. O.; OLSON, J. G.; CHILDS, J. E. Distribution, diversity, and host specificity of *Bartonella* in rodents from the southeastern United States. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 57, p. 578-588, 1999.

KOSTRZEWSKI, J. The epidemiology of trench fever. **Sci. Lett. Classe Med.**, v. 7, p. 233-263, 1949.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ROBBINS & COTRAN. Patologia - Bases Patológicas das doenças. 7a ed. **Elsevier editora Ltda.**, 2005.

LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Culture of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* from Human Samples: a 5-Year Experience (1993 to 1998). **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 1899-1905, 1999.

LAMAS, C.; FAVACHO, A.; RAMOS, R. G.; SANTOS, M. S.; FERRAVOLI, G. I.; WEKSLER, C.; ROZENTAL, T.; BÓIA, M. N.; LEMOS, E. R. S. *Bartonella* native valve endocarditis: the first brazilian case alive and well. **Braz J Infect Dis.**, v. 11, n. 6, p. 2007.

LANG, S.; WATKIN, R. W.; LAMBERT, P. A.; BONSER, R. S.; LITTLER, W. A.; ELLIOTT, T. S. Evaluation of PCR in the molecular diagnosis of endocarditis. **J Infect.**, v. 48, n. 3, p. 269-75, 2004.

LAWSON, P. A.; COLLINS, M. D. Description of *Bartonella clarridgeiae* sp. nov. isolated from the cat of a patient with *Bartonella henselae* septicemia. **Med. Microbiol. Lett.**, v. 5, p. 64-73, 1996.

LEMOS, E. R. S. Febre maculosa brasileira em uma área endêmica no município de Pedreira, São Paulo, Brasil. Rio de Janeiro, 1996. Tese - Doutorado – Instituto Oswaldo Cruz.

LOULY, C. C. B.; FONSECA, I. N.; OLIVEIRA, V. F.; BORGES, L. M. F.

Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* em trabalhadores de Clínicas Veterinárias e Canis, no município de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira Goiânia.**, v. 7, n. 1, p. 103-106, 2006.

LOUTIT, J. S. *Bartonella* infections. **Clin. Top. Infec. Dis.**, v. 17, p. 269-90, 1997.

LUCEY, D.; DOLAN, M. J.; MOSS, C. W.; GARCIA, M.; HOLLIS, D. G.; WEIGNER, S. Relapsing illness due to *Rochalimaea henselae* in immunocompetent hosts: implication for therapy and new epidemiological associations. **Clin. Infect. Dis.**, v. 14, p. 683-688, 1992.

MARGILETH, A. M. Cat - scratch disease. **Adv. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 8, p. 1-21, 1993.

MAGUINA VARGAS, C. *Bartonellosis* o enfermedad de carrion. Nuevos aspectos de una vieja enfermedad, Lima, Peru. **AFA Editores Importadores.**, p. 7-195, 1998.

MARÍN, M.; MUÑOZ, P.; SÁNCHEZ, M.; DEL ROSAL, M.; ALCALÁ, L.; RODRÍGUEZ-CRÉIXEMS, M.; BOUZA, E. Group for the Management of Infective Endocarditis of the Gregorio Marañón Hospital Molecular diagnosis of infective endocarditis by real-time broad-range polymerase chain reaction

(PCR) and sequencing directly from heart valve tissue. **Medicine (Baltimore)**, v. 86, n. 4, p. 195-202, 2007.

MATTEELLI, A.; CASTELLI, F.; SPINETTI, A.; BONETTI, F.; GRAIFENBERGHI, S.; CAROSI, G. Verruga peruana in an Italian traveler from Peru. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 50, p. 143-4, 1994.

MAURIN, M.; RAOULT, D. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* infections. **Clin. Microbiol.**, v. 9, p. 273-292, 1996.

MAURIN, M.; EB, F.; ETIENNE, J.; RAOULT, D. Serological cross-reactions between *Bartonella* and *Chlamydia* species: implications for diagnosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 2283-2287, 1997.

MEHOCK, J. R.; GRENNE, C. E.; GHERARDINI, F. C.; HAHN, T. W.; KRAUSE, D. C. *Bartonella henselae* invasion of feline erythrocytes in vitro. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 3462-6, 1998.

MILAZZO, A. S.; JR.LI, J. S. Bacterial endocarditis in infants and children. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 20, n. 8, p. 799-801, 2001.

MOREILLON, P.; QUE, Y. A.; BAYER, A. S. Pathogenesis of streptococcal and staphylococcal endocarditis. **Infect Dis Clin North Am.**, v. 16, n. 2, p. 297-318, 2002.

MOREILLON, P.; QUE, Y. A. Infective endocarditis. **Lancet.**, v. 10, n. 363 (9403), p. 139-49, 2004.

MOSER, D. R.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polimerase chain reaction. **J Clin Microbiol.**, v. 27, p.1477-82, 1989.

MURANO, I.; TSUNEOKA, H.; IINO, H.; KAMEI, T.; NAKAMURA, I.; TSUKAHARA, M. Two patients with *Bartonella henselae* infection from a dog. **KansenshogakuZasshi.**, v. 75, n. 9, p. 808-11, 2001.

MURRAY P. R.; BARON E. J.; PFALLER M. A., TENOVER F. C.; YOKEN R. H., (ed): Manual of Clinical Microbiology., 7th ed, **ASM, Washington, DC**, 1999.

MYLONAKIS, E.; CALDERWOOD, S. B. Infective endocarditis in adults. **N Engl J Med.**, v. 345, n. 18, p. 1318-30, 2001.

NG, S. O.; YATES, M. T. Ease of isolation and semiquantitative culture of *Bartonella henselae* from cats in Melbourne. **Pathology.** p. 333, 1997.

OTEO, J. A.; CASTILLA, A.; AROSEY, A.; BLANCO, J. R.; IBARRA, V.; MORANO, L. E. Endocarditis due to *Bartonella spp.* Three new clinical cases and Spanish. **Enferm Infec Microbiol Clin.**, v. 24, n. 5, p. 297-301, 2006.

- PAPPALARDO, B. L.; CORREA, M. T.; YORK, C. C.; PEAT, C. Y.; BREITSCHWERDT, E. B. Epidemiologic evaluation of the risk factors associated with exposure and seroreactivity to *Bartonella vinsonii* in dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v. 58, p. 467-471, 1997.
- PIÉMONT, Y.; HELLER, R. Les bartonelloses II. *Autres Bartonella* responsables de maladies humaines. **Ann. Biol. Clin.**, v. 57, p. 29-36, 1999.
- PITCHFORD, C. W.; CREECH, C. B.; PETERS, T. R.; VNENCAK-JONES, C. L. *Bartonella henselae* endocarditis in a child. **Pediatr Cardiol.**, v. 27, n. 6, p. 769-71, 2006.
- PIPER, C.; KORFER, R.; HORSTKOTTE, D. Prosthetic valve endocarditis. **Heart.**, v. 85, n. 5, p. 590-3, 2001.
- PORTELA-LINDOSO, A. A. B.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. **Rev. Saúde Pública.**, v. 37, n. 1, 2003.
- RAOULT D.; ROBLOT F.; ROLAIN J. M.; BESNIER J. M.; LOULERGUE J.; BASTIDES F.; CHOUTET P. First isolation of *Bartonella alsatica* from a valve of a patient with endocarditis. **J Clin Microbiol.**, v. 44, p. 278-279, 2006.
- RAOULT, D.; ROUX, V. The body louse as a vector of reemerging human diseases. **Clin. Infect. Dis.**, v. 29, p. 888-911, 1999.

RAOULT, D.; FOURNIER, P. E.; DRANCOURT, M.; MARRIE, T. J.; ETIENNE, J.; COSSERAT, J.; CACOUB, P.; POINSIGNON, Y.; LECLERCQ, P.; SEFTON, A. M. Diagnosis of 22 new cases of *Bartonella* endocarditis. **Ann. Intern. Med.**, v. 125, p. 646-652, 1996.

RATH, P. M.; VON RECKLINGHAUSEN, G.; ANSORG, R. Seroprevalence of immunoglobulin G antibodies to *Bartonella henselae* in cat owners. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v. 16, p. 326-7, 1997.

REGNERY, R. L.; MARTIN, M.; OLSON, J. G. Naturally occurring *Rochalimaea henselae* infection in domestic cat. **Lancet.**, v. 340, p. 557-558, 1992.

REGNERY, R. L.; OLSON, T. G.; PERKINS, B. A.; BIBB, W. Serological response to *Rochalimaea henselae* antigen in suspected cat-scratch disease. **Lancet.**, v. 339, p. 1443-1445, 1992.

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. **N. Engl. J. Med.**, v. 323, p. 1573-1580, 1990.

ROUX, V.; EYKYN, S. J.; WYLLIE, S.; RAOULT, D. First report of *Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffii* as an agent of afebrile blood culture-negative endocarditis in man. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 1698-1700, 1999.

ROUX, V.; EYKYN, S. J.; WYLLIE, S.; RAOULT, D. *Bartonella visonii* subsp. *Berkhoffi* as an agent of afebrile blood culture-negative endocarditis in a human. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 1698-700, 2000.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 24, p. 5463-5467, 1977.

SCHALLER, J. L.; BURKLAND, G. A.; LANGHOFF, P. J. Do *Bartonella* Infections Cause Agitation, Panic Disorder, and Treatment-Resistant Depression? **MedGenMed.**, v. 9, n. 3, p. 54, 2007.

SHAPIRA, N.; MERIN, O.; ROSENMAN, E.; DZIGIVKER, I.; BITRAN, D.; YINNON, A. M.; SILBERMAN, S. Latent infective endocarditis: epidemiology and clinical characteristics of patients with unsuspected endocarditis detected after elective valve replacement. **Ann Thorac Surg.**, v. 78, n. 5, p. 1623-9, 2004.

SICILIANO, R. F.; STRABELLI, T. M.; ZEIGLER, R.; RODRIGUES, C. Infective Endocarditis due to *Bartonella* spp. and *Coxiella burnetii*: Experience at a Cardiology. **NY Acad. Sci.**, v. 1078, p. 215-222, 2006.

SLHESSARENKO, N. Doença da arranhadura do gato: aspectos clínico - epidemiológicos e laboratoriais em 38 pacientes. São Paulo, Tese - Mestrado - **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, 1998.

SPACH, D. H.; CALLIS, K. P.; PAAUW, D. S.; HOUZE, Y. B.; SCHOENKNECHT, F. D.; WELCH, D. F.; ROSEN, H.; BRENNER, D. J. Endocarditis caused by *Rochalimae quintana* in a patient infected with human immunodeficiency virus. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 692-4, 1993.

SPACH, D. H.; KOEHLER, J. E. *Bartonella* - associated infections. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, p.137-55, 1998.

SPACH, D. H.; KANTER, A. S.; DOUGHERTY, M. J.; LARSON, A. M.; COYLE, M. B.; BRENNER, D. J.; SWAMINATHAN, B.; MATAR, G. M.; WELCH, D. F.; ROOT, R. K.; STAMM, W. E. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* bacteremia in inner-city patients with chronic alcoholism. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, p. 424-428, 1995.

STURM, N. R.; DEGRAVE, W.; MOREL, C.; SIMPSON, L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells amplification of kinetoplast minicircle DNA sequence: use in diagnosis of Chagas disease. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 33, p. 205-14, 1989.

TAK, T.; REED, K. D.; HASELBY, R. C. An update on the epidemiology, pathogenesis and management of infective endocarditis with emphasis on *Staphylococcus aureus*. **WMJ.**, v. 101, n. 7, p. 24-33, 2002.

TAPPERO, J. W.; MOHLE-BOETANI, J.; KOEHLER, J. E.; SWAMINATHAN, B.; BERGER, T. G.; LEBOIT, P. E.; SMITH, L. L.; WENGER, J. D.; PINNER, R. W.; KEMPER, C. A.; REINGOLD, A. L. The epidemiology of bacillary

angiomatosis and bacillary peliosis. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 269, p. 770-5, 1993.

TSUKAHARA, M.; TSUNEOKA, H.; IINO, H.; OHNO, K.; MURANO, I. *Bartonella henselae* infection from a dog. **Lancet**, v. 352, p. 1682, 1998.

UENO, H.; MURAMATSU, Y.; CHOMEL, B. B.; HOHDATSU, T.; KOYAMA, H.; MORITA, C. Seroepidemiological survey of *Bartonella (Rochalimae) henselae* in domestic cats in Japan. **Microbiol. Immun.**, v. 39, p. 339-41, 1995.

VELHO, P. E .N. F.; MORAES, A. M.; CINTRA, M. L.; GIGLIOLI, R.; GONÇALVES, S. A.; SHLESSARENKO, N.; CAMARGO, M. E. - Bacillary angiomatosis: negative results using normal Balb/c and Balb/c nude mice. **Brazil. J. Infect. Dis.**, v. 2, p. 300–3, 1998.

VELHO, P. E. N. F. Estudo das bartoneloses humanas e da *Bartonella henselae*: infecção experimental, microbiologia, microscopia de luz e eletrônica de transmissão. **Tese de Doutorado. UNICAMP**. 2001.

VIKRAM, H. R.; BACANI, A. K.; DEVALERIA, P. A.; CUNNINGHAM, S. A.; COCKERILL, F. R. Bivalvular *Bartonella henselae* prosthetic valve endocarditis. **J Clin Microbiol.**, v. 45, n. 12, p. 4081-4, 2007.

VOLDSTEDLUND, M.; PEDERSEN, L. N.; BAANDRUP, U.; KLAABORG, K. E.; FUURSTED, K. Broad-range PCR and sequencing in routine diagnosis of infective endocarditis. **Journal Compilation C.**, v. 116, p. 190-8. 2008.

WALKER, D. H.; BARBOUR, A. G.; OLIVER, J. H.; LANE, R. S.; DUMLER, S.; DENNIS, D. T.; PERSING, D. H.; AZAD, A. F.; MCSWEEGAN, E. Emerging bacterial zoonotic and vector-borne diseases. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 275, p. 463-9, 1996.

WALKER, D. H.; GUERRA, H.; MAGUINA, C.; GUERRANT, R. L.; WALKER, D. H.; WELLER, P. F. Tropical infectious diseases: principles, pathogens & practice. **Churchill Livingstone.**, p. 492-497, 1999.

WELCH, D. F.; PICKETT, D. A.; SLATER, L. N.; STEIGERWALT, A. G.; BRENNER, D. J. *Rochalimaea henselae* sp. nov., a cause of septicemia, bacillary angiomatosis, and parenchymal bacillary peliosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 275-80, 1992.

WELCH, D.; CARROL, K.; HOFMEISTER, E.; PERSING, D.; ROBISON, D.; STEIGERWALT, A.; BRENNER, D. Isolation of a new subspecies, *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis*, from a cattle rancher: identity with isolates found in conjunction with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* among naturally infected mice. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 2598-2601, 1999.

WESSLEN, L.; EHRENBORG, C.; HOLMBERG, M.; MCGILL, S.; HJELM, E.; LINDQUIST, O.; HENRIKSEN, E.; ROLF, C.; LARSSON, E.; FRIMAN, G. Subacute *Bartonella* infection in Swedish orienteers succumbing to sudden unexpected cardiac death or having malignant arrhythmias, **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 33, p. 429-438, 2001.

WINN, W. C.; KONEMAN, E. W. Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1997.

ZANGWILL, K. M.; HAMILTON, D. H.; PERKINS, B. A.; REGNERY, R. L.; PLIKAYTIS, B. D.; HADLER, J. L.; CARTTER, M. L.; WENGER, J. D. Cat scratch disease in Connecticut-epidemiology, risk factors, and evaluation of a new diagnostic test. **N. Engl. J. Med.**, v. 329, p. 8-13, 1993.

ZANUTTO, M.S. Estudo da infecção dos felinos domésticos (*Felis domesticus* - Linnaeus, 1758) por *Bartonella henselae* através do isolamento e da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em sangue. São Paulo, 2000. [Tese - Mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo].

ZEAITER, Z.; FOURNIER, P. E.; GREUB, G.; RAOULT, D. Diagnosis of *Bartonella* endocarditis by a real-time nested PCR assay using serum. **J Clin Microbiol.**, v. 41, p. 919-925, 2003.

ANEXO I: FICHA DE ANAMNESE

ANEXO I

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós - Graduação em Ciências Fisiológicas

Nome:

Endereço:

Bairro:

Cidade:

Estado:

CEP:

Telefone: ()

Data:

Data Nascimento:

Idade:

Sexo: () M () F

Peso:

Altura:

Contato com animais:

() Sim () Não

Qual espécie?

 Cardiologista:

Cardíaco:

() Sim () Não

Diagnóstico: _____

Terapia medicamentosa:

() Sim () Não

Qual? _____

Álcool:

() Sim () Não

Fumo:

() Sim () Não

Hiperglicemia:

() Sim () Não

Obesidade:

() Sim () Não

Hipertensão Arterial:

() Sim () Não

Diabete Melito:

() Sim () Não

Atividade Física:

() Sim () Não

História familiar de coronariopatias: () Sim () Não

Outros sintomas: _____

ANEXO II: SUBMISSÃO DO ARTIGO

●MS7536

De:

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research

Para:

fagcorrea@bol.com.br

Assunto:

MS7536

Data:

04/09/2008 09:01

Ref. MS7536 " PCR Detection Of Bartonella SP in humans with cardiopathies"

Prezado Dr.Corrêa,

Temos a satisfação de comunicar a V.Sa. o recebimento do artigo acima mencionado, o qual foi registrado com o número de referência MS7536. Favor utilizar o número da referência em futuras correspondências.

Daremos prosseguimento ao processo junto ao Editor Seccional.

Atenciosamente,

Dalva Pizeta

Editora Executiva

Brazilian Journal of Medical and Biological Research

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP

Av. Bandeirantes 3900

14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brasil

fax/phone: 55+16-3630-2778

fax/phone:55+16-3602-3173

fax/phone: 55+16-3633-3825

E-mails: bjournal@fmrp.usp.br

bjournal@terra.com.br

On Line Version - <http://www.bjournal.com.br/>

www.scielo.br/bjmr

ANEXO III: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ANEXO III**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS****Centro de Ciências Biológicas e da Saúde****Programa de Pós - Graduação em Ciências Fisiológicas****RESPONSÁVEIS:**

Estamos realizando um projeto de pesquisa cujo objetivo consiste em analisar um grupo controle de humanos na faixa etária de 5 a 90 anos de idade, que teve contato com animais e ectoparasitas e um grupo de humanos cardiopatas, para verificarmos a incidência e a correlação da bactéria *Bartonella vinsonni* subespécie *berkhoffii* que é considerada uma zoonose e causadora de cardiopatias em humanos e animais.

Trata-se de um Projeto de Doutorado da Universidade Federal de São Carlos, realizado no Departamento de Ciências Fisiológicas e da Saúde, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos (CAAE 0024.1.135.000-06). O projeto é coordenado pela Profa. Dra. Heloísa Sobreiro S. de Araújo do DCF/UFSCar tendo como pesquisador principal o aluno Fabrício Gonçalves Corrêa (graduado em Medicina Veterinária e Mestre em Genética pela UFSCar), contando com o auxílio do médico Prof. Dr. Roberto M. Verzola (cardiologista) também pertencente ao curso de Ciências Fisiológicas desta mesma Universidade.

A inclusão dos humanos nesta pesquisa deu-se por avaliações clínicas realizadas por um médico cardiologista, questionário (ficha de Anamnese), contato com animais e ectoparasitas, sendo aplicados os seguintes coletas e exames:

a) Indivíduos doadores de sangue:

Serão estudados indivíduos voluntários normais (grupo controle) sem apresentarem patologia cardíaca, mas que tiveram contato com animais e ectoparasitas (carrapatos) e indivíduos voluntários cardiopatas, que apresentam cardiopatias (arritmia cardíaca, miocardite e endocardite) e que tiveram contato com animais e ectoparasitas

b) Avaliação da incidência com ectoparasitas e animais:

Realizada através de ficha de Anamnese (questionário) que deverá ser respondida pelas pessoas selecionadas, pais ou responsáveis pela criança, contendo informações sobre a incidência, contato com animais e ectoparasitas, histórico de cardiopatias na família, fonte de renda;

c) Coleta de sangue, Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento:

Um (1,0) ml de sangue venoso será colhido em tubo Vacutainer, contendo 72 unidades U.S.P. de EDTA/ tubo, que será utilizado para a extração de DNA genômico.

A colheita será realizada por um médico, enfermeiro ou bioquímico em consultório médico, clínica médica, laboratório e hospitais.

O DNA será extraído a partir de 500 µl de sangue total.

Salientamos que a criança que tiver autorização dos pais para participar da pesquisa poderá abandonar qualquer uma das colheitas de material para pesquisa (sangue) se for de sua vontade, a qualquer momento, devendo apenas comunicar um dos responsáveis pela colheita, não sendo necessário prestar qualquer tipo de explicação.

Para maiores informações os senhores podem entrar em contato por:

Telefone 55-16-33518333 ou fax 55-16-33518327 Rodovia Washington Luís km 235 São Carlos SP Brasil CEP 13565-905 (DCF/UFSCar, Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo) ou (0XX16) 97141220 Fabrício Gonçalves Corrêa.

E-mail: hsaraujo@power.ufscar.br ou fagcorrea@bol.com.br

ESTA CARTA DEVE FICAR EM POSSE DOS PAIS OU RESPONSÁVEIS.

ANEXO III

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Educação Física

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Procedimento da Coleta de Sangue:

As pessoas avaliadas serão submetidas à colheita com os seguintes objetivos:

1. **Avaliação Clínica**: será realizada uma avaliação por um médico cardiologista e determinado o estado clínico da pessoa ou criança através de um exame clínico;
2. **Diagnóstico Clínico**: após a avaliação clínica o médico cardiologista determinará se a pessoa ou a criança é considerada cardiopata, assim as pessoas serão selecionadas para o grupo controle ou grupo de cardiopatas; Todas as coletas de sangue serão realizadas por via endovenosa. É considerado um procedimento invasivo direto.

Direitos da pessoa submetida à coleta de sangue:

Toda pessoa submetida à coleta de sangue terá acesso a seus dados, bem como a seus resultados finais. Todo participante ou seu responsável terá o direito de abandonar a colheita de sangue qualquer momento sem prestar qualquer tipo de esclarecimento, devendo apenas comunicar sua decisão ao responsável.

Riscos nas coletas de sangue:

Os riscos pertinentes ao protocolo da colheita de sangue são aqueles inerentes a qualquer coleta, riscos estes que podem ser esclarecidos a qualquer momento pelo responsável, e que tendem a ser minimizados pelas condições de pronto atendimento em caso de acidentes.

Utilização de dados em pesquisa:

Os resultados dos testes serão utilizados para atividades de pesquisa, ensino e extensão, sendo assegurado o anonimato do voluntário, desde que autorizada expressamente sua participação neste termo de consentimento.

Eu _____, portador do RG
nº _____, autorizo a participação do menor
_____ e afirmo ter
ciência dos seus direitos e deveres, e concordo que o mesmo se submeta a
este teste, autorizando a utilização dos dados para fins de pesquisa e ensino.
São Carlos, ____/____/____

De Acordo (Assinatura do responsável)

ANEXO IV: Métodos difundidos

ANEXO IV

MEIOS DE CULTURA	
Meio de Ágar sangue de carneiro e Ágar chocolate	
Meio de Cultura	Quantidades
Peptona	10g
NaCl	5g
Extrato de carne	3g
Agar	14g
Água destilada qsp	1L

Observação: Ajustar o pH para 7,4, dissolver os ingredientes e em seguida esterilizar em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Ágar sangue: Colocar sangue desfibrinado de coelho na proporção 5% em relação ao meio base. O sangue deve ser adicionado quando o meio base estiver a menos de 56°C. Distribuir em placas de Pétri estéreis. Ágar chocolate: Depois de fundir a base ágar, acrescentar sangue desfibrinado de coelho na proporção 5% no meio resfriado a 56°C. Aquecer até 80°C, mantendo em banho Maria e agitando constantemente. Fazer prova de esterilidade em estufa 37°C por 24 horas.

ANEXO IV

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

As soluções de DNAs foram analisadas por meio de eletroforese em gel agarose (seção Anexos: “Géis”) e reveladas com brometo de etídio conforme previamente descrito (SAMBROOK, FRITSCH, & MANIATIS, 1989), utilizando um transiluminador UV em comprimento de onda igual a 302nm.

As imagens foram digitalizadas utilizando uma câmera (Kodak DC120) e analisadas com o programa Kodak Digital Science 1D.

GEL DE AGAROSE

GEL DE AGAROSE	
Componentes	Quantidades
TBE	3ml
Água deionizada	27ml
Agarose	0,3g
Brometo de Etídeo (10mg/ml)	1 µl

Observação: Fundir os componentes acima e deixar resfriar até aproximadamente 50°C para a adição do Brometo de Etídeo.

SOLUÇÕES

Componentes	Quantidades
TBE	10x
Água deionizada qsp	1 litro
MOPS	200 mM
Acetato de sódio	50 mM
MOPS	10x

Observação: Ajustar o pH entre 6,5 e 7,0 com NaOH.