KARINA HATAMOTO KAWASATO

**Padronização de sistemas de dupla
amplificação para a detecção de DNA de
Bartonella henselae em casos suspeitos
de bartonelose humana**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Thelma Suely Okay

São Paulo
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Kawasato, Karina Hatamoto

Padronização de sistemas de dupla amplificação para detecção de DNA de
Bartonella henselae em casos suspeitos de bartonelose humana / Karina Hatamoto
Kawasato. -- São Paulo, 2009.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Pediatria.

Área de concentração: Pediatria.

Orientadora: Thelma Suely Okay.

Descritores: 1.*Bartonella henselae* 2.DNA 3.Infecções por Bartonella/diagnóstico
4.Reação em cadeia da polimerase/métodos

USP/FM/SBD-382/09

DEDICATÓRIA

**Ao meu grande amigo Roberto Raiz Júnior (*in memorian*) por
ter sido uma pessoa íntegra, um excelente profissional e um
amigo sincero**

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, **Katutaka Kawasato** e **Teiko Hatamoto**, os mais profundos agradecimentos por suas sábias lições de esperança, sempre repetindo palavras essenciais como, por exemplo, amor, dedicação, compreensão, alegria infundiram-me a confiança necessária para realização dos meus sonhos.

De forma muito especial, sou profundamente grata a “Deus” por ter colocado em meu caminho, profissionais extremamente competentes e dedicados como o **Dr. Roberto Augusto Plaza Teixeira** e a sua esposa a **Dra. Débora Garcia y Narvaiza** a oportunidade de poder viver momentos felizes como esse.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a minha orientadora, Profa. Dra. Thelma Suely Okay que sempre demonstrou acreditar no meu potencial, pela oportunidade oferecida e pela valiosa orientação. Com ela tive a oportunidade de mergulhar no mundo da biologia molecular.

À amiga Dra. Léa Campos de Oliveira, sua disponibilidade irrestrita e extremamente generosa comigo que me ajudou a compreender e a realizar uma análise crítica sobre o trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Ao Laboratório de Investigação Médica (LIM-36) por ter disponibilizado todas as condições necessárias para o desenvolvimento desse trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

À Profa. Dra. Cristina Miuki Abe Jacob, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Pediatria da FMUSP, que reuniu condições necessárias para o término desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Ulysses Doria Filho pela análise estatística.

À Profa. Dra. Elsa Massae Mamizuka pelas suas valiosas sugestões e esclarecimentos sobre a *Bartonella* spp na aula de qualificação.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho, pela sua disponibilidade e resposta “a velocidade da luz” em todos os momentos contribuindo com elementos de interesse e manifestando entusiasmo pelo meu trabalho e pelas sugestões na aula de qualificação.

Ao Prof. Dr. Pedro Paulo Diniz, pesquisador do *Intracellular Pathogens Research Laboratory* da Universidade da Carolina do Norte que embora não me conhecendo pessoalmente respondeu o meu e-mail prontamente, contribuindo para enriquecer o meu trabalho de dissertação.

À biomédica Adriana Fumie Tateno do Laboratório de Virologia do IMT de São Paulo, pelo auxílio no sequenciamento e pela amizade.

À Marli Massae Seque Kastume Inoue, diretora técnica de serviço de saúde de 2001 a 2008 do Laboratório Clínico do ICR-HC/FMUSP pelo estímulo, apoio e compreensão.

À Regina Miyuki Yamagata, bióloga chefe do Laboratório Clínico do ICR-HC/FMUSP pelo apoio manifesto, que permitiu reunir as condições que muito me ajudaram a vencer estes últimos três anos de trabalho intenso.

À Dra. Mônica Polati de Carvalho, médica responsável pelo Laboratório Clínico do ICR-HC/FMUSP pelo apoio e compreensão.

À Dra. Gilda Maria Bárbaro Del Negro, à Dra. Sofia Mizuho Miura Sugayama e à secretária Maria Luisa Nunes pelo apoio e incentivo, meus sinceros agradecimentos.

À Seção de Microbiologia da Divisão de Laboratório Central do HC/FMUSP pela doação de controle positivo da *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus epidermidis*.

Ao Laboratório de Virologia do IMT de São Paulo pela doação de controle positivo de Citomegalovírus e Epstein-Barr vírus.

À Seção de Biologia Molecular do Laboratório Diagnóstico da América (DASA) pela doação de controle positivo de *Mycobacterim tuberculosis* e *Chlamydia pneumoniae*.

Ao Laboratório de Protozoologia do IMT de São Paulo pela doação de controle positivo de *Toxoplasma gondii*.

À Seção de Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo pelo fornecimento da cepa da *Bartonella quintana*.

À colega e amiga Mariana Vitule Brito de Souza pelo seu calor humano e incansável apoio moral, pela ajuda pontual e disponibilidade sempre manifesta e pela amizade, que espero continuar por longos anos.

Às amigas do setor de rotina do Laboratório Clínico do ICR-HC/FMUSP a biomédica Alexandra Rodrigues da Silveira, técnica Fabiana Tartáglio em especial a técnica Solange Aparecida da Silva que sempre disponibilizou condições para que eu pudesse ausentar da área para cumprir com todas as minhas obrigações profissionais e acadêmicas.

Aos funcionários e alunos do LIM-36 pelo apoio e amizade, em especial: a bióloga Lídia Yamamoto pelo auxílio na revisão do texto.

À amiga Patrícia Helena Gradin, pelo seu profissionalismo exemplar, pelo apoio nos momentos bons e menos bons, e pela sua amizade.

Às amigas Filomena De Paula Carneiro Basílio e a Dra. Maria Tereza Assis de Almeida, pelas ajudas pontuais e grande amizade com que sempre me ouviram, meus sinceros agradecimentos.

Aos colegas e amigos do Laboratório Clínico do ICR-HC/FMUSP e do ITACI pelo estímulo e apoio incondicional, pela paciência e grande amizade com que tem sido revelado ao longo desses últimos 10 anos.

Finalmente, agradeço do fundo do coração o apoio de todos para a realização deste trabalho.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journal Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2^a. ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2009.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE FIGURA

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Considerações gerais.....	2
1.2 <i>Bartonella</i> spp. e bartoneloses.....	4
1.3 Ciclo de vida e transmissão da <i>Bartonella henselae</i> na DAG.....	6
1.4 Epidemiologia.....	7
1.5 Formas clínicas das bartoneloses humanas.....	9
1.5.1 Bartoneloses humanas – formas típicas (DAG).....	10
1.5.2 Bartoneloses humanas – formas atípicas.....	10
1.6 Diagnóstico laboratorial.....	13
 2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	 16
 3. HIPÓTESE DO TRABALHO.....	 18
 4. OBJETIVOS.....	 20
4.1 Geral.....	21
4.2 Específicos.....	21

5. ASPECTOS ÉTICOS DO ESTUDO.....	22
6. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	24
6.1 Casuística.....	25
6.2 Métodos.....	25
6.2.1 Extração de DNA.....	25
6.2.1.1 Extração de DNA a partir de sangue periférico.....	26
6.2.1.2 Extração de DNA a partir de tecidos.....	27
6.2.1.3 Extração de DNA a partir de cepas de <i>Bartonella henselae</i> Houston-1 e de <i>Bartonella quintana</i> (bactérias liofilizadas).....	28
6.2.1.4 Extração de DNA de vírus, protozoários e bactérias para a realização de testes de especificidade.....	30
6.2.2 Determinação da concentração de DNA e qualidade da amostra.....	30
6.2.3 Medidas para minimizar os riscos de “contaminação” das amplificações.....	31
6.2.4 Verificação da qualidade das amostras de DNA extraídas e inexistência de inibidores da amplificação.....	32
6.2.5 Padronização dos três sistemas de dupla amplificação (<i>nested</i> -PCR).....	33
6.2.5.1 Detecção dos produtos de amplificação.....	35
6.2.6 Limiar de detecção.....	36
6.2.7 Teste de especificidade dos três sistemas de <i>nested</i> -PCR.....	37
6.2.8 Validação dos três sistemas de <i>nested</i> -PCR padronizados (teste de amostras biológicas provenientes de pacientes com suspeita de bartonelose).....	37
6.2.9 Confirmação dos resultados positivos de amostras que foram amplificadas pelo <i>nested</i> -FtsZ para <i>Bartonella henselae</i>	38
6.2.9.1 Clivagem do produto de amplificação de <i>nested</i> -FtsZ (restrição enzimática ou RFLP para <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>).....	38

6.2.9.2 Sequenciamento dos fragmentos amplificados pelo <i>nested-FtsZ</i>	39
6.2.9.2.1 Purificação do produto de <i>nested-FtsZ</i> para o sequenciamento.....	40
6.2.9.2.2 Reação de sequenciamento.....	40
6.3 Análise Estatística.....	42
7. RESULTADOS.....	43
7.1 Condições de amplificação dos três sistemas de <i>nested-PCR</i>	45
7.2 Limiar de detecção.....	46
7.2.1 Limiar de detecção apenas com DNA de <i>Bartonella henselae</i> e com DNA de <i>Bartonella henselae</i> e DNA humano.....	46
7.3 Especificidade.....	48
7.4 Validação dos sistemas de <i>nested-PCR</i> : teste de amostras de pacientes.....	48
7.5 Confirmação da sequência nucleotídica dos amplificados obtidos no <i>nested-FtsZ</i>	52
7.5.1 Clivagem enzimática (RFLP).....	52
7.5.2 Sequenciamento.....	53
8. DISCUSSÃO.....	54
9. CONCLUSÕES.....	67
10. PERSPECTIVAS.....	69
11. ANEXOS.....	71
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

Apêndices

LISTA DE ABREVIATURAS

16S - 23S rRNA – do inglês “16S - 23S ribosomal Ribonucleic Acid”

A – Adenina

A - do inglês “Annealing”

AB – Angiomatose Bacilar

B. alsatica – *Bartonella alsatica*

B. bacilliformis – *Bartonella bacilliformis*

B. clarridgeiae – *Bartonella clarridgeiae*

B. elizabethae – *Bartonella elizabethae*

B. grahamii – *Bartonella grahamii*

B. henselae – *Bartonella henselae*

B. koehlerae – *Bartonella koehlerae*

B. quintana – *Bartonella quintana*

B. rochalimae – *Bartonella rochalimae*

B. vinsonii* subsp. *arupensis – *Bartonella vinsonii* subespécie *arupensis*

B. washoensis – *Bartonella washoensis*

***Bartonella* spp** – *Bartonella* espécies

C – Citosina

C1 – Controle um

C2 – Controle dois

CD4 – do inglês “Cluster of Differentiation” quatro

CMV – Citomegalovírus

CS-PCR – Citrato Sintetase-PCR

D – Desnaturação

DAG – Doença da Arranhadura do Gato

dATP – deoxiadenosina trifosfato

dCTP – deoxicitosina trifosfato

dGTP – deoxiguanidina trifosfato

dTTP – deoxitimidina trifosfato

ddATP – dideoxiadenosina trifosfato

ddCTP – dideoxicitosina trifosfato

ddGTP – dideoxiguanina trifosfato

ddTTP – dideoximina trifosfato

DNA – do inglês “deoxiribonucleic acid”

dNTP – mistura dos quatro deoxinucleotídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)

E – Extensão

EDTA - do inglês “Ethylene Diamine Tetracetic Acid”

et al. – e outros

FtsZ – do inglês “ Filamenting temperature sensitive mutant Z”

FtsZ 1 – *FtsZ* um (*primer* oriundo da região que codifica a proteína *FtsZ* envolvida na divisão celular)

FtsZ 2 – *FtsZ* dois (*primer* oriundo da região que codifica a proteína *FtsZ* envolvida na divisão celular)

FtsZ 3 – *FtsZ* três (*primer* oriundo da região que codifica a proteína *FtsZ* envolvida na divisão celular)

FtsZ 4 – FtsZ quatro (*primer* oriundo da região que codifica a proteína FtsZ envolvida na divisão celular)

G – Guanina

HIV – do inglês “Human Immunodeficiency Virus”

HSP – do inglês “Heat Shock Protein”

HSP1 – HSP um (*primer* oriundo da sequência nucleotídica do gene que codifica a proteína de choque térmico)

HSP2 – HSP dois (*primer* oriundo da sequência nucleotídica do gene que codifica a proteína de choque térmico)

HSP 3 – HSP três (*primer* oriundo da sequência nucleotídica do gene que codifica a proteína de choque térmico)

HSP 4 – HSP quatro (*primer* oriundo da sequência nucleotídica do gene que codifica a proteína de choque térmico)

IFI – Imunofluorescência Indireta

IgG – Imunoglobulina G

ITS – do inglês “Internal Transcribed Spacer”

ITS 1 – ITS um (*primer* oriundo da sequência nucleotídica que codifica região ITS localizada entre as subunidades ribossomais 16S e 23S do rRNA bacteriano)

ITS 2 – ITS dois (*primer* oriundo da sequência nucleotídica que codifica região ITS localizada entre as subunidades ribossomais 16S e 23S do rRNA bacteriano)

ITS 3 – ITS três (*primer* oriundo da sequência nucleotídica do gene que codifica região ITS localizada entre as subunidades ribossomais 16S e 23S do rRNA bacteriano)

ITS 4 – ITS quatro (*primer* oriundo da sequência nucleotídica do gene que codifica região ITS localizada entre as subunidades ribossomais 16S e 23S do rRNA bacteriano)

min. – minutos

Pac. – Paciente

pb – pares de base

PB – Peliose Bacilar

PCR – do inglês “Polymerase Chain Reaction” ou Reação em Cadeia da Polimerase

q.s.p. – quantidade suficiente para

RFLP – do inglês “Restriction Fragment Length Polymorphism”

ribC – do inglês “riboflavin synthase gene”

RNA – do inglês “Ribonucleic Acid”

rRNA – RNA ribossomal

T – Timina

TAE – solução-tampão composta por Tris, ácido acético glacial e EDTA

Tampão TE – Tampão Tris-EDTA

Taq DNA polimerase – enzima DNA polimerase produzida pela bactéria *Thermus aquaticus*

Tris-HCl – sal Trizma com pH corrigido por adição de ácido clorídrico

β_1 – beta um (*primer* oriundo da sequência nucleotídica do gene da beta actina humana)

β_2 - beta dois (*primer* oriundo da sequência nucleotídica do gene da beta actina humana)

β -actina – beta actina

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

= - igual a

°C – graus Celsius

°GL – Gay Lussac

60 kDA – 60 kilodalton

CFU – do inglês “Colony Forming Unit”

D.O. – Densidade Óptica

fg – fentograma

g – grama

L – Litro

M – Molaridade

mg – miligrama

mg/mL – miligrama por mililitro

mL – mililitro

mM – milimolar

N – Normalidade

N° - Número

ng – nanograma

nm – nanômetro

p – Índice de probabilidade

pg – picograma

pH – potencial hidrogeniônico

s - segundos

U – Unidades

UV – Ultravioleta

V – Volts

x g – força gravitacional

µg – micrograma

µg/mL – micrograma por mililitro

µL – microlitro

µM – micromolar

LISTA DE SIGLAS

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

CO₂ – Dióxido de Carbono

DASA – Diagnóstico da América Sociedade Anônima

EUA – Estados Unidos da América

H₂O – água

HC/FMUSP – Hospital das Clínicas/Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HCl – Ácido Clorídrico

IMT-SP – Instituto de Medicina Tropical – São Paulo

K₂EDTA - difosfato EDTA

KHCO₃ - Carbonato de Potássio

LIM – Laboratório de Investigação Médica

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

NH₄Cl – Cloreto de Amônia

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

USP – Universidade de São Paulo

LISTA DE FIGURA

Figura 1 – RFLP das amostras positivas para <i>nested-FtsZ</i>.....	52
--	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Protocolo de amplificação de fragmento do gene da β -actina humana.....	32
Tabela 2 – Sequência nucleotídica dos iniciadores e peso molecular dos fragmentos amplificados.....	34
Tabela 3 – Sequência do fragmento amplificado pelo <i>nested-FtsZ</i> de <i>Bartonella henselae</i> e o sítio de clivagem da enzima de restrição.....	39
Tabela 4 – Sequência dos iniciadores, condições de amplificação e peso molecular do fragmento amplificado.....	41
Tabela 5 – Padronização das condições das duas etapas de amplificação dos três sistemas de <i>nested-PCR</i>	46
Tabela 6 – Limiar de detecção com amostras oriundas de diluição limite.....	47
Tabela 7 – Frequência de resultados positivos e valores de p obtidos na verificação da concordância ou discordância entre os resultados do primeiro PCR em relação a <i>nested-PCR</i>	49
Tabela 8 – Comparação entre os resultados das amplificações simples e os obtidos pelos <i>nested-PCR</i> com relação a todas as amostras testadas.....	51

RESUMO

Kawasato KH. Padronização de sistemas de dupla amplificação para a detecção de DNA de *Bartonella henselae* em casos suspeitos de bartonelose humana. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 117p.

Bartoneloses são infecções causadas por *Bartonella* spp e constituem zoonoses de importância crescente devido à gravidade da infecção em pacientes imunodeficientes. Existem muitas síndromes clínicas associadas às bartoneloses, desde quadros típicos de doença da arranhadura do gato até lesões cutâneas linfoproliferativas (angiomatose bacilar), ou granulomatosas em órgãos (peliose bacilar), passando por quadros neurológicos, oculares, endocardites e febre prolongada. O diagnóstico laboratorial deveria ser baseado em isolamento da bactéria em cultura, resultados de sorologias e exames imunohistoquímicos, porém estas técnicas não se encontram disponíveis em nosso meio. A Reação da Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido utilizada para aprimorar o diagnóstico das bartoneloses, e o presente estudo teve como objetivo padronizar três sistemas de dupla amplificação para detecção de DNA de *Bartonella henselae* em amostras biológicas de pacientes com suspeita de bartonelose e determinar dentre os sistemas de dupla amplificação (*nested*-PCR), aquele com melhor desempenho. Os *nested*-PCR empregaram oligonucleotídeos

iniciadores das sequências ITS, HSP e *FtsZ* da *Bartonella* spp. Foram incluídos 19 pacientes, sendo 14 crianças/adolescentes e cinco adultos, tendo oito deles referido contato com gatos. Dos pacientes, 10 não tinham doenças de base, e nove apresentavam doença de base (três evoluíram a óbito). Foram coletadas 25 amostras: 14 de sangue periférico, sete biópsias de gânglios, duas punções de gânglios e duas biópsias de pele. Do total de 19 pacientes, 14 tiveram resultados positivos por PCR, e considerando as 25 amostras, 18 foram positivas por PCR (nove amostras de sangue, cinco biópsias de gânglios, duas punções de gânglios e duas biópsias de pele). Dez das 18 amostras positivas por PCR só foram detectadas pelo *nested-FtsZ* (seis amostras de sangue periférico, duas punções de gânglios, uma biópsia de gânglio e uma biópsia de pele). A primeira amplificação do sistema HSP-PCR detectou uma amostra positiva em 25 (1/25 ou 4%), e após o *nested*-HSP este percentual foi de 24% (6/25). Na primeira amplificação do sistema ITS-PCR a positividade foi de 20% (5/25), e no *nested*-ITS 32% (8/25). Após a primeira amplificação do sistema *FtsZ*-PCR a positividade foi de 16% (4/25), e no *nested-FtsZ* foi de 72% (18/25). O teste de McNemar testou a concordância ou discordância dos resultados obtidos pelos três sistemas de *nested*-PCR e revelou que os mesmos foram discordantes, com superioridade do sistema *nested-FtsZ* em relação aos outros dois *nested*-PCR, sendo a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Os resultados do presente estudo permitiram concluir que o *nested-FtsZ* apresentou vantagens para o diagnóstico das bartoneloses em relação aos outros sistemas testados, em materiais biológicos previamente

descritos na literatura (biópsias e punções de gânglios), e até mesmo em sangue periférico de pacientes sem doença de base. Além disso, foi possível determinar, no presente estudo, que as infecções foram causadas por *B. henselae*, uma vez que não houve nenhuma PCR positiva pelos outros dois sistemas que não tenha sido detectada pelo *nested-FstZ*, e este amplifica apenas DNA de *Bartonella henselae* após a segunda amplificação.

Descritores: *Bartonella henselae*, DNA, Infecções por Bartonella/diagnóstico, Reação em cadeia da polimerase/métodos

SUMMARY

Kawasato KH. Standardization of *nested*-PCR amplification systems for *Bartonella henselae* DNA detection in cases of suspected human bartonellosis. [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2009. 117p.

Bartonellosis are infections caused by *Bartonella* spp and this zoonosis is of growing importance due to the severity of infection in immunodeficient patients. Many clinical syndromes are associated with bartonellosis, varying from typical manifestations of cat scratch disease, to lymphoproliferative skin lesions (bacillary angiomatosis) or granulomatous ones in organs (bacillary peliosis), and also neurologic and ocular manifestations, endocarditis and prolonged fever. The laboratory diagnosis should be based on bacteria isolation in culture, serological tests and immunohistochemical examination, but these techniques are not available in our country. The Polymerase Chain Reaction (PCR) has been used to improve the diagnosis of bartonellosis, and this study has aimed at standardizing three *nested*-amplifications for detection of *Bartonella henselae* DNA in biological samples of patients with suspected bartonellosis, and establishing among the three *nested*-PCR, the one presenting with the best performance. *Nested*-PCR amplifications were performed using the ITS, the HSP and the *FtsZ* gene sequences of *Bartonella* spp. We included 19 patients, being 14 children / adolescents and

five adults, and eight reported contact with cats. From these patients, 10 had no underlying disease, and nine patients had underlying conditions (3 evolved to death). We collected 25 samples: 14 peripheral blood samples, seven lymph nodes biopsies, two lymph nodes punctures and two skin biopsies. From the total of 19 patients, 14 had positive results by PCR, and considering the 25 samples, 18 were positive by PCR (nine peripheral blood samples, five lymph nodes biopsies, two lymph nodes punctures and two skin biopsies). Ten of the 18 PCR-positive samples were only detected by the *nested-FtsZ* (six peripheral blood samples, two lymph nodes punctures, one lymph node biopsy and one skin biopsy). The first HSP-PCR amplification detected one positive sample in 25 (1 / 25 or 4%), and after the *nested-HSP* this percentage was 24% (6 / 25). In the first ITS-PCR amplification the positivity was 20% (5 / 25), and after the *nested-ITS* 32% (8 / 25). The first *FtsZ*-PCR amplification positivity was 16% (4 / 25), and after the *nested-FtsZ* it was 72% (18/25). The McNemar test was used to verify the concordance or discordance of the results obtained by the three *nested*-PCR systems and showed that they were discordant, with superiority of the *nested-FtsZ* in relation to the other two *nested*-PCR, being the difference statistically significant ($p < 0.05$). The results of this study indicated that the *nested-FtsZ* showed advantages for the diagnosis of bartonellosis with respect to the other two systems when biological materials previously described in literature were tested (punctures and lymph nodes biopsies), and also in peripheral blood of patients without underlying conditions. Furthermore, it was possible to determine that the infections were caused by

B. henselae, since there was no positive PCR results obtained by the other two systems that were not detected by the *nested-FstZ*, that only amplifies DNA from *Bartonella henselae* after the second round of amplification.

Descriptors: *Bartonella henselae*, DNA, Bartonella infections/diagnostic, Polymerase chain reaction/methods

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Diferentes espécies de *Bartonella* afetam o homem há muitos séculos, como por exemplo, a *B. quintana* que foi considerada um dos fatores que contribuíram para o declínio do império Inca (Huarcaya et al., 2004).

O gênero *Bartonella* recebeu este nome em homenagem a Alberto Leonardo Barton Thompson, pesquisador peruano nascido na Argentina, que em 1905 associou, de forma inequívoca, a infecção causada por *Bartonella bacilliformis* à febre de Oroya (ou doença de Carrion), afecção febril grave acompanhada de bacteremia, endocardite, anemia hemolítica, encefalite, podendo levar a colapso circulatório (Brouqui et al., 2006). Esta foi uma das primeiras infecções humanas a serem relatadas uma vez que várias culturas pré-hispânicas do Peru, tais como os Mochicas, Chimú e Nazca representaram pacientes com lesões de pele típicas em cerâmicas. A doença de Carrion apresenta duas fases: a fase aguda com febre, anemia e icterícia, e a crônica caracterizada pelo aparecimento de lesão cutânea, a chamada verruga peruana. Até 1885, não se sabia ao certo que a febre de Oroya e a verruga peruana constituíam duas fases de uma mesma doença, até que o estudante de medicina peruano, Daniel Alcides Carrion, inoculou em si mesmo a *B. bacilliformis* utilizando material extraído de lesão de pele de paciente com verruga peruana, evoluindo com infecção febril grave (febre de Oroya) que o levou a óbito.

Outro membro do gênero *Bartonella*, a *B. quintana*, é transmitida por fezes de piolhos que contaminam feridas abertas ou conjuntivas. Trata-se do

agente etiológico da febre das trincheiras, infecção febril acompanhada de cefaléias, dores oculares e musculares intensas, e mais raramente associada a quadros de endocardite. A febre das trincheiras foi descrita em 1915, e resultou em um milhão de soldados infectados na Europa durante a primeira guerra mundial. Atualmente, infecções causadas por *B. quintana* são descritas em pacientes alcoólicos e moradores de rua (Mogollon-Pasapera et al., 2009).

Maior exposição dos seres humanos a *Bartonella* spp, especialmente *Bartonella elizabethae*, que tem como reservatório o rato, tem sido relatada com frequência em indivíduos de baixa renda (Ellis et al., 1999; Childs et al., 1999). *Bartonella* spp também pode estar presente em usuários de drogas injetáveis de grandes áreas urbanas, de acordo com descrições feitas nos Estados Unidos (Comer et al., 1996; Comer et al., 2001).

A *Bartonella henselae* é conhecida como agente etiológico da Doença da Arranhadura do Gato (DAG), caracterizada por quadro clínico que vai desde infecção branda que pode ser auto limitada, até sinais e sintomas de acometimento sistêmico com febre, cefaléias, fraqueza e inapetência. Recentemente, foi descrito que *B. quintana* e *B. bacilliformis* podem invadir eritrócitos humanos (Pitassi et al., 2007), e ainda que *B. henselae* e *B. quintana* podem causar angiomatose bacilar e peliose bacilar em pacientes imunodeficientes, notadamente nos infectados pelo HIV (Velho et al., 2007).

A distribuição mundial de diferentes genótipos/fenótipos da *B. henselae* pode ter ocorrido durante a migração dos seres humanos com gatos domésticos. Mais recentemente, foi relatada presença de DNA da

Bartonella henselae cepa Houston I em gatos franceses que viveram entre os séculos XIII e XVI, em lugar da cepa Marseille que predomina atualmente em gatos franceses (La VD et al., 2004).

1.2 *Bartonella* spp. e bartoneloses

Wear et al. (1983), identificaram pequenos bacilos gram-negativos, pleomórficos utilizando a coloração de Warthin-Starry e de Brown-Hopp em linfonodos de pacientes com suspeita de DAG. English et al. (1988) isolaram e obtiveram sucesso no cultivo da bactéria utilizando material de pacientes com DAG. Em 1991, Brenner et al. isolaram bactéria que foi denominada *Afipia*, e a espécie foi chamada de *felis* por ter sido isolada de gato doméstico, *Felis domesticus*, suposto reservatório do microrganismo. Assim, a *Afipia felis* foi considerada, inicialmente, o agente etiológico da DAG.

Bactérias do gênero *Bartonella* fazem parte da família *Bartonellaceae* e mantêm relação filogenética remota com os membros da ordem *Rickettsiales* (Slhessarenko, 1998).

Regnery et al. (1992) isolaram a *Rochalimaea henselae* (nome dado em homenagem ao patologista brasileiro, Henrique da Rocha Lima), em pacientes infectados pelo HIV que apresentavam angiomatose bacilar, peliose hepática e febre.

Outros estudos (Perkins et al., 1992; Dolan et al., 1993), associaram a DAG ao gênero *Rochalimaea*, confirmando que *Afipia felis* não seria o único agente etiológico. Em 1993, Brenner et al., sugeriram que todas as

Rochalimaea fossem transferidas para o gênero *Bartonella*, sendo essa nomenclatura amplamente aceita. Desta forma, a *Bartonella henselae* é atualmente reconhecida como um dos agentes responsáveis pela DAG e por outras bartoneloses humanas.

Tradicionalmente o isolamento da *Bartonella henselae* é realizado em meio ágar infusão cérebro-coração, enriquecido com 5% de sangue de carneiro, coelho ou humano; hemina ou ainda com 6 a 8% da solução de *Fields*, em ambiente micro-aerófilo (5% de CO₂) com alto teor de umidade. A temperatura ótima de crescimento varia de 35 a 37°C. São bactérias de crescimento lento, levando em média sete a 10 dias para a visualização de pequenas colônias, requerendo, por vezes, até cinco semanas para a leitura final (Schwartzman et al., 1993; Wong et al., 1995). O isolamento da bactéria em cultura de sangue periférico ou de outros tecidos não se aplica à rotina da maioria dos laboratórios de microbiologia, tanto pelo tempo prolongado de cultivo, quanto pelas condições especiais necessárias ao crescimento das *Bartonella* spp.

Atualmente, encontram-se identificadas 30 espécies e subespécies de *Bartonella* (Lamas et al., 2008; Saisongkorh et al., 2009; Inoue et al., 2009) sendo que 11 são patogênicas para seres humanos imunodeficientes e imunocompetentes:

- *B. bacilliformis*, *B. quintana* e *B. henselae*, responsáveis pela maioria das infecções humanas (Dehio, 2004);
- *B. elizabethae*, isolada de pacientes com endocardite (Daly et al., 1993);

- *B. clarridgeiae* associada a casos de DAG (Sander et al., 2000.);
- *B. grahamii* em casos de neurorretinite (Kerkhoff et al., 1999);
- *B. vinsonii* subsp *arupensis* isolada de pacientes com bacteremia e febre (Welch et al., 1999);
- *B. washoensis*, causadora de miocardites (Kosoy et al., 2003);
- *B. koehlerae* (Avidor et al., 2004) e *B. alsatica* (Raoult et al., 2006) em pacientes com endocardite;
- *B. rochalimae* descrita em um turista norte americano em visita ao Peru (ano de 2007), que apresentou bacteremia e febre (Eremeeva et al., 2007).

A transmissão de diferentes espécies de *Bartonella* entre o reservatório natural da doença (gatos) e o hospedeiro definitivo (outros mamíferos, incluindo o homem) é feita por vetores tais como moscas, pulgas, piolhos, carrapatos, ou ainda por meio de arranhadura, mordedura ou lambedura de animais infectados, principalmente gatos. A gama de vetores envolvidos na transmissão da doença não para de crescer, e ainda não foi definitivamente caracterizada (Lamas et al., 2008; Mogollon-Pasapera et al., 2009).

1.3 Ciclo de vida e transmissão da *Bartonella henselae* na DAG

Gatos domésticos constituem o reservatório natural da *Bartonella henselae* (Koehler et al., 1994). Mais de 90% dos casos de DAG foram associados ao contato com gatos e a transmissão da bactéria de gato para

gato pode ocorrer por meio de pulgas contaminadas (*Ctenocephalides felis*). Chomel et al., (1996) sugeriram que a infecção entre gatos pode ocorrer pela inoculação de fezes de pulgas contendo bactérias, ao invés da picada de pulgas (Foil et al., 1998; Finkelstein et al., 2002).

A transmissão da *Bartonella henselae* de gatos para seres humanos pode ocorrer indiretamente por intermédio de pulgas, muito embora esse tipo de transmissão ainda não tenha sido comprovado. Estudos recentes encontraram DNA de *Bartonella* spp em pulgas encontradas em seres humanos (Adelson et al., 2004). A transmissão também pode ocorrer de forma direta por intermédio de mordedura, arranhadura ou lambedura (Carithers et al., 1985; Chomel et al., 2000; Lamas et al., 2008; Mändle et al., 2005; Mogollon-Pasapera et al., 2009). Em gatos, a *Bartonella henselae* localiza-se no interior de eritrócitos (Kordick et al., 1995a; Rolain et al., 2001), e esta localização foi demonstrada *in vitro* por Mehock et al. (1998), sendo que a maioria dos felinos apresenta bacteremia assintomática por períodos prolongados (Koehler et al., 1994; Kordick et al., 1995b; Rolain et al., 2001; Dehio et al., 2004). Em seres humanos, a infecção intra-eritrocitária também foi demonstrada *in vitro* no trabalho de Mändle et al. (2005) e de Pitassi et al (2007).

1.4 Epidemiologia

Infecções causadas por bactérias do gênero *Bartonella* constituem zoonoses de importância crescente, distribuição mundial, com casos da

forma clássica da doença (DAG) descrita em pacientes nos Estados Unidos (Carithers et al., 1985), Europa (Bergmans et al., 1996), Japão (Maruyama et al., 2004), Nova Zelândia (Kelly et al., 2004) e Austrália (Fournier et al., 2002b).

Nos Estados Unidos, a distribuição sazonal parece ser importante fator, com maioria de casos ocorrendo entre os meses de julho e janeiro (Carithers, 1985; Jackson et al., 1993), e hospitalizações (no ano de 2000), concentradas entre os meses de julho e outubro (Reynolds et al., 2005). Alguns autores consideram que a variação sazonal da doença está associada à presença de maior reprodução de felinos em determinadas épocas do ano, coincidindo com a época de maior proliferação de pulgas, fatores que interferem no modelo de transmissão da infecção (Anderson et al., 1997).

Em 1993, nos Estados Unidos, Jackson et al. descreveram 22.000 casos de DAG com estimativa de incidência da doença em pacientes ambulatoriais de 9,3 casos por 100.000 habitantes/ ano. Em 1997, Bass et al. relataram, em todas as regiões norte-americanas, aproximadamente 24.000 casos que resultaram em mais de 2.000 internações. Na Holanda, o número estimado de casos de DAG foi de 2.000 casos/ ano, ou 12,5 casos em 100.000 habitantes (Bergmans et al., 1997).

No Brasil, Costa et al. (2005) realizaram estudo soro-epidemiológico com detecção de anticorpos anti-*B.henselae* e anti-*B.quintana* em 457 adultos saudáveis do Piauí, e em população de vilarejo do Estado de Minas Gerais, obtendo 13,7 e 12,8 % de soroprevalência, respectivamente. Lamas

et al. (2006), estudaram 125 pacientes HIV positivos clinicamente assintomáticos em uma pequena cidade do Rio de Janeiro e encontraram 41,6% de soroprevalência para *Bartonella* spp.

Florin et al. (2008) descreveram muita dificuldade para estabelecer a incidência da infecção por *Bartonella* spp, pois a doença não é notificada compulsoriamente na maioria dos estados norte-americanos, e em muitos casos a infecção por *Bartonella* spp não é diagnosticada.

1.5 Formas clínicas das bartoneloses humanas

Do ponto de vista clínico, infecções por *Bartonella* spp podem causar desde quadros autolimitados até infecções fatais, levando a diferentes desfechos, com envolvimento local, ou de múltiplos órgãos e sistemas. As síndromes conhecidas até o momento associadas às bartoneloses incluem a febre de Oroya (doença de Carrion), síndrome óculo-glandular de Parinaud, febre das trincheiras, bacteremias associadas a endocardites, doença da arranhadura do gato, angiomatose bacilar e peliose bacilar (Ahsan et al., 1998; Jacomo et al., 2002; Rolain et al., 2004; López et al., 2008).

A primeira descrição de bartonelose humana ocorreu em 1889 quando Parinaud et al. relataram caso de paciente apresentando conjuntivite, linfadenopatia regional e que havia sido arranhado por um gato. Em 1930, as bartoneloses foram reconhecidas como entidades clínicas por Robert Debré, professor de pediatria da Universidade de Paris, que descreveu pacientes que haviam sido arranhados por gatos e

desenvolveram adenite supurativa. Em 1950, Debré et al., realizaram a primeira divulgação formal e escrita da doença, que chamaram de *maladie des griffes du chat* ou Doença da Arranhadura do Gato (DAG).

1.5.1 Bartoneloses humanas – formas típicas (DAG)

Em sua forma típica, a bartonelose humana corresponde à DAG e compreende a história de contato com gato, além de linfadenopatia regional subaguda que pode estar associada à lesão primária de pele e outras manifestações sistêmicas incluindo quadro febril (Hagiwara, 2005; Del Prete et al., 2000a; Reynolds et al., 2005; Massei et al., 2005; Spach et al., 2007). Usualmente, após a arranhadura, ocorre o aparecimento de lesão primária (pápula eritematosa), com desenvolvimento de nódulo no sítio de inoculação em período de 7 a 12 dias, podendo evoluir com ulceração (Margileth, 1993; Carither et al., 1985; Jacomo et al., 2002). A linfadenopatia regional pode persistir por poucas semanas ou até meses. Para os 1.200 casos relatados por Carithers et al. (1985), menos de 10% apresentaram febre acima de 39°C e 30% não apresentam febre. Foram relatados pacientes com anorexia, cefaléia e esplenomegalia (Boulouis et al., 2005).

1.5.2 Bartoneloses humanas - formas atípicas

Regnery et al., 1992 isolaram pela primeira vez a *B. henselae* em paciente portador do HIV com número reduzido de linfócitos CD4. Pons et al.

(2008) concluíram que a infecção por *Bartonella* spp deve ser considerada em pacientes com HIV e imunodeficiência grave. Pacientes imunodeficientes quando expostos à arranhadura de gatos domésticos podem apresentar bacteremia por muitas semanas (Koehler et al., 1993; Koehler et al., 1997).

A infecção causada por *Bartonella henselae* tem sido observada em pacientes co-infectados com outros microrganismos tais como o HIV (Koehler et al., 2003) e o vírus Epstein-Barr (Signorini et al., 2002).

A angiomatose bacilar (AB), doença cutânea com proliferação de vasos é manifestação clínica relativamente comum dentre as infecções causadas por *Bartonella* spp (Koehler et al., 1993) em pacientes imunodeficientes, especialmente portadores do HIV (Dehio, 2004; Velho et al., 2007), podendo, no entanto, causar infecção em pacientes imunocompetentes (Velho et al., 2006; Petersen et al., 2007). *Bartonella henselae* pode também causar doença em órgãos internos (peliose bacilar), caracterizada por proliferação vascular em fígado e baço, com formação de lesões granulomatosas (Relman et al., 1990; Perkocha et al., 1990; Tappero et al., 1993; Koehler et al., 1993; Mohle-Boetani et al., 1996).

A infecção por *Bartonella* spp deve também ser considerada em receptores de órgãos, especialmente nos casos onde existe contato prévio com gatos, tendo em vista a elevada frequência da bactéria em felinos domésticos (Slhessarenko et al., 1996; Belanger et al., 2006; Bonatti et al., 2006).

A síndrome óculo-glandular de Parinaud é composta por febre, linfadenopatia regional e conjuntivite folicular, tendo sido descrita pela

primeira vez em 1889 por Parinaud, constituindo a manifestação ocular mais comum causada por *Bartonella henselae*, acometendo cerca de 5% dos pacientes (Carithers, 1985).

Associação de bartonelose com quadros neurológicos, em especial encefalopatias, ocorre em aproximadamente 2% dos pacientes com bartonelose atípica (Carithers, 1985). Os sintomas neurológicos geralmente ocorrem duas a três semanas após o aparecimento da linfadenopatia, incluindo cefaléia e alteração do nível de consciência. A epilepsia é frequentemente, o primeiro sinal de envolvimento neurológico (Lewis et al., 1986; Armengol et al., 1999).

Endocardite é a mais comum das manifestações cardíacas causadas pela *Bartonella* spp acometendo aproximadamente 3% dos casos (Brouqui et al., 2001; Gouriet et al., 2007). Foi inicialmente relatada em adultos, mas também pode ocorrer em crianças (Florin et al., 2008) e em animais (Kelly et al., 2006; Diniz et al., 2007). As lesões localizam-se preferencialmente em válvula aórtica (Raoult et al., 1996) e muitos pacientes apresentam altos títulos de anticorpos anti-*Bartonella* (Fournier et al., 2002a), porém com resultados negativos em cultura, sendo positivos apenas por meio da amplificação de DNA de *Bartonella* spp (Fournier et al., 2001).

Muito embora as complicações hematológicas provocadas pela infecção por *Bartonella* spp sejam raras, anemia hemolítica já foi relatada em adultos e crianças (Greenbaum et al., 1986; Van Audenhove et al., 2001). Em pacientes pediátricos existem ainda casos de púrpura trombocitopênica associados a infecções por *Bartonella* spp (Borker et al., 2002).

Lesões ósseas constituem complicações raras da infecção por *Bartonella henselae* e foram associadas a abscessos (Heye et al., 2003; Abdel-Haq et al., 2005) e a granulomas ósseos necrotizantes (Maggiore et al., 1999). Frequentemente, essas lesões evoluem com formação de processo lítico e instalação de osteomielite (Florin et al., 2008), que pode ser contígua ao linfonodo acometido, ou apresentar-se à distância, sugerindo lesão disseminada por via hematogênica ou linfática (Hulzebos et al., 1999).

Hepatoesplenomegalias provocadas por *Bartonella* spp são geralmente acompanhadas de sintomas sistêmicos, tais como febre prolongada, presença de micro-abscessos em fígado e baço. Mais da metade de todos os pacientes com bartoneloses apresenta hepatomegalia, esplenomegalia ou hepatoesplenomegalia ao exame físico (Florin et al., 2008).

1.6 Diagnóstico laboratorial

Até a década de 1990, o diagnóstico das bartoneloses humanas era feito apenas com base nos dados clínicos, epidemiológicos e histopatológicos. A seguir, foram desenvolvidos testes sorológicos tais como a imunofluorescência indireta (IFI), com sensibilidades variando de 14 a 100% (Sander et al., 2001; Rolain et al., 2003), podendo ainda resultar em reações cruzadas com outros microrganismos tais como *B. quintana* (La Scola et al., 1996), *Chlamydia pneumoniae* (Maurin et al., 1997), *Mycoplasma pneumoniae* (Massei et al., 2003), além de testes

imunoenzimáticos que também carecem de sensibilidade e especificidade, e que apresentam reações cruzadas entre *B. henselae* e outras espécies (Sander et al., 2001; Giladi et al., 2001; Maurin et al., 2002; Metzkor-Cotter et al., 2003; Massei et al., 2003; Vermeulen et al., 2007; Herremans et al., 2007).

Nas últimas décadas, devido ao excelente nível de sensibilidade e de especificidade, além da rapidez de execução e versatilidade (pode ser realizada com qualquer tipo de material biológico), a Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, ou PCR) tem sido utilizada em praticamente todas as áreas da pesquisa médica (Goral et al., 1994; Zeaiter et al., 2002a; Chung et al., 2005). Muitos ensaios baseados na PCR têm sido desenvolvidos para a detecção da *Bartonella henselae* em amostras clínicas, ou com finalidades epidemiológicas. No entanto, até o momento, houve pouco sucesso nas tentativas de detecção de *Bartonella* spp em sangue periférico de pacientes com suspeita clínica de bartonelose. Os melhores resultados foram obtidos quando a detecção por PCR foi realizada em aspirado ou biópsia de gânglios, ou utilizando colônias previamente isoladas em meios de cultura (Goral et al., 1994; Avidor et al., 1997; Sander et al., 1999; Hansmann et al., 2005). Entretanto, poucos trabalhos compararam o desempenho de diferentes sistemas de amplificação (Avidor et al., 1997; Sander et al., 1998b; Sander et al., 1999), e esses estudos também foram realizados com aspirados ou biópsias de gânglios.

Cinco genes da bactéria são capazes de diferenciar *Bartonella* spp e têm sido frequentemente utilizados no diagnóstico das bartoneloses por PCR:

- gene que codifica a enzima citrato sintetase (CS-PCR) (Norman et al., 1995);
- gene responsável pela síntese de proteína de choque térmico de 60 kDa (HSP60-PCR) (Anderson et al., 1994);
- gene que codifica região localizada entre a subunidade ribossomal 16S e a 23S do rRNA da *Bartonella* spp (rRNA-PCR ou ITS-PCR) (Minnick et al., 1997).
- gene que codifica a proteína *FtsZ* envolvida na divisão celular da bactéria (Kelly et al., 1998)
- gene que codifica a enzima riboflavina sintetase (*ribC*) (Johnson et al., 2003).

Em nosso estudo, propusemos a padronização de três sistemas de dupla amplificação (*nested*-PCR) utilizando como alvos das amplificações fragmentos dos seguintes genes: *FtsZ*, HSP 60kDa e ITS (16S-23S rRNA), com o intuito de aprimorar a detecção da *B. henselae*, principalmente em amostras de sangue periférico de pacientes com suspeita de bartonelose.

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Bartoneloses humanas constituem afecções de importância crescente devido à gravidade do quadro clínico em pacientes imunodeficientes, porém ainda são pouco estudadas e muito pouco diagnosticadas tendo em vista as dificuldades técnicas dos isolamentos em cultura, limitação das técnicas sorológicas e imunohistoquímicas e à falta de disponibilidade de todos os testes diagnósticos em nosso meio, incluindo os moleculares (PCR).

Outro fator digno de nota é que a produção efetiva de anticorpos específicos pode ocorrer muito tempo após a fase aguda da infecção, porém com persistência de títulos elevados por longos períodos, o que dificulta o diagnóstico laboratorial baseado apenas em títulos de anticorpos IgG, principalmente em pacientes imunodeficientes.

Acreditamos que com as técnicas moleculares seja possível aumentar o poder de detecção de DNA da *Bartonella henselae* com manutenção da especificidade do diagnóstico laboratorial das bartoneloses humanas. No entanto, nossa unidade laboratorial já participou de pesquisa (dissertação de mestrado do aluno Marcelo de Souza Zanutto, do programa de Pós-Graduação da Medicina Veterinária da USP), na qual foram testadas técnicas moleculares de amplificação simples de DNA de *Bartonella henselae* (um único *round* de amplificação), comparando a positividade de dois sistemas de amplificação com os isolamentos em cultura, sendo que as amplificações foram menos sensíveis que as culturas. Esta falta de sensibilidade das amplificações do tipo *one round* nos motivou a propor o presente estudo.

3. HIPÓTESE DO TRABALHO

É possível aumentar o poder de detecção de amplificações direcionadas ao diagnóstico das bartoneloses humanas (sem perda de especificidade), com a utilização de técnicas de dupla amplificação (*nested-PCR*). A falta de sensibilidade de amplificações realizadas em estudos anteriores pode ser devido ao fato das amostras de pacientes apresentarem poucas bactérias (pacientes já receberam antibióticos diversos no momento da coleta), o que requer método molecular que atinja limiares de detecção da ordem de fentogramas de DNA (equivalente a 10^{-15} g de DNA ou uma unidade formadora de colônia), o que pode ser alcançado com técnicas de dupla amplificação.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Aumentar o poder de detecção de DNA da *Bartonella henselae* por meio de técnicas de dupla amplificação (*nested-PCR*), com manutenção da especificidade dos testes.

4.2 Específicos

- padronizar três sistemas de dupla amplificação para a detecção de DNA de *Bartonella henselae* em amostras biológicas de pacientes com suspeita de bartonelose, incluindo amostras de sangue periférico;
- comparar a positividade global das técnicas de amplificação simples com a positividade global obtida após dupla amplificação (*nested-PCR*);
- determinar, dentre os sistemas de dupla amplificação (*nested-PCR*), aquele com melhor desempenho (maior poder de detecção), para que possa ser adotado como padrão do diagnóstico molecular de bartoneloses em nosso laboratório.

5. ASPECTOS ÉTICOS DO ESTUDO

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelas Comissões de Pesquisa e Ética do Departamento de Pediatria (CPE) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 20 de dezembro de 2006, tendo o protocolo recebido o número 1245/06 (Apêndices).

6. CASUÍSTICA E MÉTODOS

6.1 Casuística

O estudo incluiu 19 pacientes com suspeita clínica de infecção causada por *Bartonella* spp e dos quais foram obtidas 25 amostras biológicas, sendo 14 de sangue periférico, sete biópsias de gânglios, duas punções de gânglios e duas biópsias de pele. Tratou-se de casuística de conveniência, limitada pelo número de amostras biológicas disponíveis em nosso laboratório. Apenas seis dos 19 pacientes com suspeita clínica apresentaram resultados em outros testes laboratoriais para investigação de bartonelose: sorologia, isolamento em cultura, microscopia eletrônica ou identificação de bactérias aderidas a eritrócitos ou intra-eritrocitárias sugestivas de *Bartonella* spp pela coloração de Giemsa.

Os dados clínicos e demográficos dos pacientes estão descritos nos Apêndices.

6.2 Métodos

6.2.1 Extração de DNA

O protocolo de extração de DNA foi adaptado ao tipo de material biológico a ser analisado.

6.2.1.1 Extração de DNA a partir de sangue periférico

Foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Miller et al. (1988). Resumidamente, em tubo tipo Falcon de 15mL foi colocado 1mL de sangue coletado em tubo K₂ EDTA 7,2mg (Becton Dickinson). Foram acrescidos 10mL da solução *blood lysis buffer* [1X] e a solução foi incubada por 30 minutos em banho de gelo para promover ruptura dos eritrócitos. A seguir, a amostra foi homogeneizada vigorosamente no agitador da marca *Vortex* e centrifugada a 4°C por 15 minutos a 420 x g (centrífuga refrigerada da marca *Sorwall*, modelo RT6000B). Foi retirado o sobrenadante e acrescido 4mL da solução *blood lysis buffer*. A amostra foi centrifugada a 4°C por 5 minutos a 420 x g. Esta etapa foi repetida por mais duas ou três vezes até ruptura completa dos eritrócitos. Foi retirado o sobrenadante, em seguida, acrescentado ao precipitado de células 1mL da solução *nucleo lysis buffer* [1X], e a solução foi homogeneizada no agitador para promover a lise nuclear. Foram adicionados 5uL de proteinase K a 20 mg/mL (Sigma) e 300uL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% (Merck), e a mistura foi cuidadosamente homogeneizada por inversão e incubada de um dia para o outro a 37°C em banho maria. Um mililitro de solução saturada de NaCl (cloreto de sódio) 6M (Merck) foi adicionado e submetido a agitação vigorosa por 15 segundos e a seguir a amostra foi centrifugada a 4°C por 20 minutos a 420 x g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo tipo Falcon de 15 mL. A amostra foi novamente centrifugada a 4°C por 15 minutos a 420 x g e o sobrenadante foi novamente transferido para outro tubo tipo Falcon de

15mL contendo duas vezes o volume de etanol absoluto (Merck) para promover a precipitação de DNA. O DNA precipitado foi retirado com o auxílio de uma ponteira e transferido para um tubo do tipo eppendorf. Quinhentos microlitros de etanol 70°GL foram acrescentados ao microtubo para retirar o excesso de NaCl e a solução foi centrifugada a 13.500 x g por 5 minutos a 4°C (centrífuga da marca *Eppendorf*, modelo 5417R). O sobrenadante foi desprezado e o tubo contendo o DNA foi deixado aberto em temperatura ambiente para a evaporação completa do etanol 70°GL. Após essa etapa, foram adicionados ao precipitado de DNA, 100 a 400µL de tampão TE (Tris 0,1M, EDTA 0,01M) de acordo com o volume de DNA precipitado obtido e a amostra foi armazenada a -20°C até o momento do uso.

6.2.1.2 Extração de DNA a partir de tecidos

A extração de DNA a partir de tecidos foi realizada com o *kit* da *QIAamp DNA Mini Kit* (*QIAGEN Inc., Germany*) de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, o fragmento de tecido (biópsia) foi colocado em um tubo do tipo eppendorf de 1,5mL. Foram acrescentados 180µL do tampão de lise para tecido “ATL” e 20µL de proteinase K (Sigma) a 20 mg/mL, homogeneizado no agitador e incubado a 56°C (banho seco marca *Grant* modelo QBT2) por 15 minutos. A seguir, foram adicionados 200µL do tampão de lise “AL” e a solução foi homogeneizada no agitador e incubada a 70°C por 10 minutos. A esta mistura foram

acrescentados 200µL de etanol absoluto e a solução resultante foi novamente homogeneizada no agitador.

Seiscentos microlitros da solução foram transferidos para a coluna do *kit* de extração *QIAamp*, e a coluna foi centrifugada por 1 minuto a 6.000 x g. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado, em seguida, foram acrescentados 500µL da solução de lavagem *wash* 1 e a coluna foi novamente centrifugada por 1 minuto a 6.000 x g. O sobrenadante foi desprezado novamente e foram acrescentados a esta coluna, 500µL da solução de lavagem *wash* 2. A centrifugação foi repetida novamente por 3 minutos a 6.000 x g e o sobrenadante foi desprezado.

Finalmente, foram acrescentados à coluna 100µL do tampão de eluição “AE” e a solução contendo o DNA foi deixada em temperatura ambiente por 5 minutos, para em seguida ser centrifugada por 1 minuto por 6.000 x g.

O sobrenadante (contendo DNA) obtido após esta última centrifugação foi armazenado a -20 °C até o momento do uso.

6.2.1.3 Extração de DNA a partir de cepas de *Bartonella henselae* Houston-1 e de *Bartonella quintana* (bactérias liofilizadas)

As cepas de *Bartonella henselae* Houston-1 e de *Bartonella quintana* foram adquiridas da Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz.

As bactérias liofilizadas foram ressuspensas em 500µL de H₂O estéril e em seguida a amostra foi homogeneizada por agitação. Duzentos e

cinquenta microlitros da solução contendo bactérias foram centrifugados a 5.200 x g por 10 minutos.

Após o preparo desse material liofilizado, o procedimento de extração de DNA foi realizado com o *kit* de extração para células liofilizadas da *QIamp DNA Mini Kit* (QIAGEN Inc., Germany) de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e em seguida foram acrescentados 180µL da enzima lisozima 20mg/mL (Sigma) e a solução foi incubada a 37°C por 30 minutos. Após a incubação foram adicionados 20µL da proteinase K (Sigma) a 20 mg/mL e 200µL do tampão de lise “AL” da *QIamp*. Essa solução foi homogeneizada e colocada em repouso por 30 minutos a 56°C, e depois por 15 minutos a 95°C. Em seguida foram acrescentados a esta solução 200µL de etanol absoluto e foi homogeneizada por inversão.

Seiscentos microlitros dessa solução foram transferidos para a coluna do *kit QIAamp*, e em seguida foi realizada centrifugação de 1 minuto a 6.000 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e em seguida, foram acrescentados 500µL do tampão *wash 1* e a coluna foi centrifugada por 1 minuto a 6.000 x g. O sobrenadante foi desprezado novamente e foram acrescentados a esta coluna 500µL do tampão *wash 2*. A centrifugação foi repetida novamente por 3 minutos a 6.000 x g e o sobrenadante foi desprezado.

A esta coluna foram acrescentados 100µL do tampão de eluição “AE”, e a mistura foi deixada em temperatura ambiente por 5 minutos, e em seguida foi centrifugada por 1 minuto por 6.000 x g.

O sobrenadante obtido após a centrifugação (contendo o DNA) foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

6.2.1.4 Extração de DNA de vírus, protozoários e bactérias para a realização de testes de especificidade

As extrações de DNA de diferentes microrganismos: dois vírus (Citomegalovírus, Epstein-Barr vírus), gentilmente cedidos pelo Laboratório de Virologia do IMT-SP; um protozoário (*Toxoplasma gondii*) obtido do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical - SP; e seis bactérias (*Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia pneumoniae* e *Bartonella quintana*), fornecidas pela Seção de Microbiologia da Divisão de Laboratório Central do HC/FMUSP, pela Seção de Biologia Molecular do Laboratório Diagnóstico da América (DASA) e pela coleção de culturas do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, foram realizadas com o *kit* de extração para células liofilizadas da *Qlamp DNA Mini Kit* (QIAGEN Inc., Germany) de acordo com as recomendações do fabricante.

6.2.2 Determinação da concentração de DNA e qualidade da amostra

A estimativa da concentração de DNA nas amostras extraídas foi realizada por espectrofotometria UV (*Beckman* – DU 70) em comprimentos

de onda de 260, 280 e 320 nm. A concentração de DNA foi determinada em 260 nm. No comprimento de onda de 280 nm foi determinada a concentração de proteínas remanescentes na amostra de DNA, e no comprimento de onda de 320 nm verificou-se a presença de traços de solventes na amostra. O índice de pureza foi determinado por meio da razão 260nm/ 280nm, e foi considerado adequado na faixa de 1,2-2,0.

A concentração de DNA ($\mu\text{g/mL}$) foi calculada pela seguinte equação:
[DNA] = leitura 260nm x 50 (1 D.O.) x 50 (fator de diluição da amostra), considerando que uma densidade ótica (D.O.) corresponde a aproximadamente 50 $\mu\text{g/mL}$ de DNA dupla fita.

6.2.3 Medidas para minimizar os riscos de “contaminação” das amplificações

O LIM/36 (Laboratório de Investigação Médica em Pediatria Clínica do Departamento de Pediatria da FMUSP) é um laboratório dedicado ao desenvolvimento de métodos moleculares. Trata-se de estrutura física com as áreas destinadas à amplificação separadas em três salas (com sistema de ar condicionado exclusivo para cada sala): reagentes, extração e amplificação. Todo material descartável e equipamentos são específicos de cada sala e não são, em hipótese alguma, levados de um ambiente ao outro (aventais, luvas, micropipetas, ponteiras com barreira anti-aerosol, estantes etc.). Em todos os testes empregamos uma série de controles negativos e controlamos de maneira bastante rigorosa o uso dos controles positivos.

Além disso, todo material descartável é “DNase e RNase – free”, não havendo reaproveitamento de qualquer um deles, e os reagentes são divididos em pequenas alíquotas para evitarmos ciclos de congelamento e descongelamento.

6.2.4. Verificação da qualidade das amostras de DNA extraídas e inexistência de inibidores da amplificação

Antes da amplificação com iniciadores (oligonucleotídeos ou *primers*) específicos para *Bartonella henselae* foi realizada amplificação com iniciadores ($\beta 1$ e $\beta 2$) oriundos do gene que codifica a proteína β -actina humana descritos por Nakajima-Iijima et al. (1985) que amplificam fragmento de 540pb. Em um microtubo de 0,2 mL, considerando volume final da reação de 50 μ L, foram usados 200 μ M de dNTP; 0,4 μ M dos iniciadores 2,5U da Taq DNA polimerase (Labtrade), tampão [10X] (Labtrade), 1,5mM do MgCl₂ (Cloreto de Magnésio) (Labtrade). As sequências dos iniciadores, bem como as condições de amplificação estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 - Protocolo de amplificação de fragmento do gene da β -actina humana

Iniciadores	Sequência (5' →3')	Ciclos			Produto amplificado (pb)
		D	A	E	
$\beta 1$	GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA	95 °C	45 °C	72 °C	540
$\beta 2$	CTC CTT ATT GTC ACG CAC GATTTC	1 min.	1 min.	1 min.	
D-Desnaturação A - <i>Annealing</i> E - Extensão pb - par de base min. - minuto					

6.2.5 Padronização dos três sistemas de dupla amplificação (nested-PCR)

Primeiro round de amplificação. No primeiro sistema no qual foram usados iniciadores do gene que codifica a proteína de choque térmico (HSP) de 60 kDa, denominados HSP1 e HSP2 (Tabela 2), o protocolo utilizado seguiu a descrição de Anderson et al. (1994). Este sistema permite a diferenciação das espécies *henselae* e *elizabethae*, porém não diferencia *B. henselae* de *B. quintana*, o que teria extrema relevância clínica tendo em vista que ambas podem causar DAG, endocardites e outras bartoneloses.

O segundo sistema de amplificação utilizou iniciadores oriundos da região localizada entre as sequências que codificam as subunidades ribossomais 16S e 23S do rRNA de *Bartonella* spp denominados ITS1 e ITS2 (Tabela 2). Trata-se de região que contém sequências nucleotídicas com pesos moleculares distintos de acordo com a espécie de *Bartonella* spp (Jensen et al., 2000), sendo capaz de diferenciar *Bartonella henselae* das seguintes: *Bartonella quintana*, *Bartonella bacilliformis*, *Bartonella elizabethae*, *Bartonella vinsonii*, porém não sendo capaz de diferenciar *Bartonella clarridgeiae* de *Bartonella quintana*, uma vez que os produtos de amplificação possuem o mesmo peso molecular.

O terceiro sistema de amplificação padronizado empregou iniciadores da região que codifica a proteína *FtsZ* envolvida na divisão celular de *Bartonella henselae*, denominados *FtsZ1* e *FtsZ2* (Tabela 2), descritos por

Kelly et al. (1998). Este sistema amplifica somente DNA de *B. henselae*, não amplificando *B. quintana* e *B. bacilliformis*.

Segundo round de amplificação. No caso dos três *nested*-PCR, três novos pares de iniciadores foram selecionados para cada um dos sistemas, sendo a seguir identificados como HSP3 e HSP4, ITS3 e ITS4 e *FtsZ*3 e *FtsZ*4 (tabela 2), que amplificam regiões internas dos três fragmentos gerados na primeira amplificação, tendo sido selecionados para esta pesquisa, com auxílio do programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tabela 2 - Sequência nucleotídica dos iniciadores e peso molecular dos fragmentos amplificados

PCR	Iniciadores	Sequência (5' → 3')	Produto amplificado (pb)
<i>FtsZ</i>-PCR	<i>FtsZ</i> 1 <i>FtsZ</i> 2	AGGTGAACGCGCTTGTATTTG AGGTGAACGCGCTTGTATTTG	354
<i>nested-FtsZ</i>	<i>FtsZ</i> 3 <i>FtsZ</i> 4	CAAAACGGTTGGAGAGCAGT CGCCTGTCATCTCATCAAGA	218
HSP-PCR	HSP1 HSP2	GATTCAATTGGTTTGAA(G/A)GAGGCT TCACATCACCAGG(A/G)CGTATTC	414
<i>nested</i>-HSP	HSP3 HSP4	AGCTGGTATCAAGGCAGGTG ATTTTCGTCTTCAGGCATCG	184
ITS-PCR	ITS1 ITS2	(C/T)CTTCGTTTCTCTTTCTTCA AACCAACTGAGCTACAAGCC	172
<i>nested</i>-ITS	ITS3 ITS4	GATGATGATCCCAAGCCTTC TCCCCGGCATAATCTCATAA	113

pb = pares de base

Para definir a concentração ideal de DNA *template* a ser utilizada no primeiro sistema de amplificação, foram testadas várias concentrações: 10ng, 100ng, 500ng e 1 micrograma. O mesmo procedimento foi adotado para a definição do volume de amostra a ser transferido do primeiro PCR para o segundo *round* de amplificação (1uL, 2uL, 5uL, 10uL, 15uL e 20uL). Todos os outros reagentes de amplificação (iniciadores, cloreto de magnésio, etc) foram testados em várias concentrações, bem como os tempos de amplificação e temperatura de *annealing* até a escolha da combinação de melhor desempenho. O número de ciclos de amplificação, tanto para o primeiro PCR quanto para o segundo PCR (*nested*) também foram selecionados após teste de 25, 30, 35 e 40 ciclos. As amplificações foram realizadas no termociclador T3 Thermocycler (*Biômetra, Germany*).

Em todas as reações foram utilizados controles positivos, isto é, DNA extraído de cepas de *Bartonella henselae* Houston-1 adquiridas da Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz, e controles negativos (água estéril em lugar de DNA).

6.2.5.1 Detecção dos produtos de amplificação

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal (H-58, *Life Technologies*) em gel de agarose a 2% preparado em tampão TAE (Tris- Ácido acético glacial e EDTA [1X] pH 8,0), corado com brometo de etídio (0,5µg/mL), a 100V por 1 hora. Os amplificados foram visualizados e fotografados em sistema de foto-documentação (*Bio - Vision Vilber*

Lourmat, France). As imagens foram impressas em papel termo sensível para posterior análise.

6.2.6 Limiar de detecção

Para determinar a sensibilidade dos três sistemas de dupla amplificação (limiar de detecção) foram realizadas duas etapas de padronização, uma contendo apenas DNA de *Bartonella henselae* e outra com amostras de DNA humano e DNA de *Bartonella henselae* para simular as condições de análise das amostras de pacientes.

Teste apenas com DNA de *Bartonella henselae*. Foi realizada diluição seriada (1/10) partindo de 1ng até 0,1fg de DNA de *Bartonella henselae*. Essas diluições de DNA de *Bartonella henselae* de 1ng até 0,1fg foram submetidas à amplificação.

Teste realizado com DNA específico de *Bartonella henselae* e DNA humano. Nesta segunda etapa foi realizada diluição seriada (1/10) partindo de 1ng até 0,1fg do controle positivo de DNA de *Bartonella henselae*. Ao DNA bacteriano foi adicionado a 1µg de DNA humano de indivíduo sabidamente sem bartonelose (indivíduo saudável). As diluições contendo 1µg de DNA humano e DNA de *Bartonella henselae* em concentrações variando de 1ng até 0,1fg foram submetidas à amplificação.

É importante que o método molecular atinja limiares de detecção da ordem de fentogramas de DNA (equivalente a uma unidade formadora de

colônia). Uma vez que o tamanho do genoma da *Bartonella henselae* é de 2 x 10⁶ pb (Anderson et al., 2000), uma unidade formadora de colônia (CFU) corresponde a aproximadamente 2 fentogramas de DNA.

6.2.7 Teste de especificidade dos três sistemas de *nested*-PCR

Foi verificada a possibilidade de reação cruzada (amplificação com o DNA de diferentes microrganismos): dois vírus (Citomegalovírus, Epstein-Barr vírus); um protozoário (*Toxoplasma gondii*); seis bactérias (*Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*; *Staphylococcus epidermidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia pneumoniae* e *Bartonella quintana*). Estes microrganismos e seus respectivos DNA foram escolhidos porque causaram infecção, em pacientes atendidos no Instituto da Criança, com quadros clínicos que poderiam ser confundidos com o de bartonelose (febre, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, lesões cutâneas, etc).

6.2.8 Validação dos três sistemas de *nested*-PCR padronizados (teste de amostras biológicas provenientes de pacientes com suspeita de bartonelose)

As vinte e cinco amostras biológicas provenientes dos 19 pacientes com suspeita clínica de infecção causada por *Bartonella* spp foram testadas pelos três sistemas de dupla amplificação (*nested*-PCR), para avaliar o desempenho das técnicas em diferentes amostras biológicas.

6.2.9 Confirmação dos resultados positivos de amostras que foram amplificadas pelo *nested-FtsZ* para *Bartonella henselae*

Para confirmar os resultados positivos para *Bartonella henselae* obtidos pelo *nested-FtsZ*, foram usados dois procedimentos: a restrição (clivagem enzimática) e o sequenciamento dos fragmentos de DNA amplificados, tendo em vista a impossibilidade de compararmos todos os resultados positivos por *nested-FtsZ* com outras técnicas diagnósticas (isolamentos em culturas, sorologias, testes imunohistoquímicos, esfregaço corado pelo Giemsa), realizados em apenas seis dos 19 pacientes da casuística.

6.2.9.1 Clivagem do produto de amplificação de *nested-FtsZ* (restrição enzimática ou RFLP para *Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Para esta reação foram usados 100ng dos 18 fragmentos amplificados pelo *nested-FtsZ* submetidos a seguir a clivagem enzimática com 5 unidades da enzima HpyCH4IV (*New England Biolabs*), sendo a solução incubada a 37°C por 3 horas e os resultados da clivagem analisados em eletroforese horizontal (gel de agarose/nusieve a 3%). Como a enzima HpyCH4IV possui um único sítio de restrição no fragmento de 218pb, este é clivado em duas partes, uma de 127pb e outra de 91pb.

A tabela 3 mostra a sequência completa do fragmento amplificado pelo *nested-FtsZ* de *Bartonella henselae* e o sítio de clivagem da enzima de restrição HpyCH4IV.

Tabela 3 - Sequência do fragmento amplificado pelo *nested-FtsZ* de *Bartonella henselae* e o sítio de clivagem da enzima de restrição

CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACACTGTTGCTGCACGA
AATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAGTGCTCATGGGCAGATATCAAATGCGCCACGTGCAAGTAAGCCGT
AGTTCGAATCCTCATATGGTTGCACCAGTGAGTATGGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGC
G = 218pb

pb = par de base

6.2.9.2 Sequenciamento dos fragmentos amplificados pelo *nested-FtsZ*

O sequenciamento constitui o método de referência para a análise da composição nucleotídica de fragmentos de DNA. Trata-se de procedimento de extrema sensibilidade e especificidade para confirmar os resultados positivos do *nested-FtsZ*. Os sequenciamentos foram realizados no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

6.2.9.2.1 Purificação do produto de *nested-FtsZ* para o sequenciamento

O procedimento de purificação do produto de PCR foi realizado com o kit de purificação da *QIAquick Spin Handbook* (QIAGEN Inc., Germany) de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, foram adicionados cinco volumes do tampão “PBI” para 1 volume do produto de *nested-FtsZ*, e em seguida, essa mistura foi transferida para a coluna do kit do *QIAquick*, e centrifugada por 1 minuto a 18.570 x g.

O sobrenadante foi desprezado e foram acrescentados a esta coluna 750µL do tampão “PE” e a mistura foi centrifugada por 1 minuto a 18.570 x g. O sobrenadante foi desprezado novamente e centrifugado por mais 1 minuto a 18.570 x g. Em seguida, foi eluído com 50µL do tampão “EB”, e deixado por 5 minutos em temperatura ambiente, sendo posteriormente centrifugado por 1 minuto a 18.570 x g.

O sobrenadante obtido após a centrifugação (contendo DNA) foi armazenado a -20 °C até o momento do uso.

6.2.9.2.2 Reação de sequenciamento

Cerca de 100ng de produto amplificado foram adicionados ao microtubo contendo 3,2µM dos iniciadores, 2uL de Mix *Big Dye Terminator Ready Reaction* (Applied Biosystems Incorporation, Foster City, Califórnia, EUA), 4,4uL da solução *save money* (Tris-HCl 200mM, pH 9,0 e 5mM de

MgCl₂). Vinte cinco ciclos de extensão enzimática foram realizados nas condições descritas na tabela 4, utilizando termociclador da marca *Eppendorf*.

Tabela 4 - Sequência dos iniciadores, condições de amplificação e peso molecular do fragmento amplificado

Iniciadores	Sequência (5' →3')	Ciclos			Produto amplificado (pb)
		D	A	E	
<i>FtsZ3</i>	CAAAACGGTTGGAGAGCAGT	96 °C	50 °C	60 °C	218
<i>FtsZ4</i>	CGCCTGTCATCTCATCAAGA	30s	45s	45s	
D-Desnaturação A- <i>Annealing</i> E- Extensão		s - segundos		pb - pares de base	

O produto obtido foi novamente purificado visando a remoção do excesso de dideoxynucleotídeos *terminator* presentes na reação.

Foram utilizados dideoxynucleotídeos marcados com fluoróforos diferentes para cada um deles (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP), permitindo a leitura concomitante em um mesmo sensor do sequenciador automatizado (*ABI PRISM 377 – Applied Biosystems Incorporation, Foster City, Califórnia, EUA*).

Foram adicionados 80µL de isopropanol 75°GL à reação de sequenciamento, que foi em seguida homogeneizada por 15 segundos. A solução foi incubada em temperatura ambiente por 15 minutos. Após a incubação, a solução foi centrifugada a 17.900 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi retirado, e em seguida foram adicionados 160µL de etanol 80°GL com homogeneização por 15 segundos. A solução foi centrifugada a 17.900 x g por 5 minutos e o sobrenadante retirado. Após esta etapa, o

sedimento foi colocado a 45°C por 10 minutos para a evaporação completa do etanol 80°GL. O sedimento foi ressuspenso em 4µL do tampão *loading* (*Applied Biosystems Incorporation, Foster City, Califórnia, EUA*).

As sequências nucleotídicas foram “alinhadas” e analisadas no próprio programa do sequenciador *Sequencer Navigator* (*ABI PRISM 377 – Applied Biosystems Incorporation, Foster City, Califórnia, EUA*). Todas as sequências foram comparadas com àquelas oriundas de cepas de referência de *Bartonella* spp depositadas no GenBank para verificar o grau de homologia. Os alinhamentos foram realizados com o auxílio do programa NCBI/nucleotide-nucleotide BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

6.3 Análise Estatística

A frequência de resultados positivos obtidos com os três sistemas de dupla amplificação foi comparada aos resultados obtidos com os três sistemas de amplificação simples. Também foi realizada comparação da frequência de resultados positivos obtidos com cada uma das três técnicas de dupla amplificação.

A concordância ou discordância entre os sistemas de dupla amplificação e os sistemas de amplificação simples, bem como a concordância ou discordância entre os três sistemas de dupla amplificação entre si foram determinadas por meio do teste de McNemar, utilizando o programa SPSS, versão 13.0, considerando significantes valores de $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

A casuística do presente estudo foi composta por 19 pacientes, sendo 14 crianças ou adolescentes e cinco adultos. Dentre os 19 pacientes, havia nove com doença de base, e 10 sem doença de base. Oito em 19 referiram contato com gatos, sendo que dois pacientes referiram ter sido arranhado por gato. Houve três óbitos dentre os 19 pacientes (duas crianças e um adulto, os três com doença de base).

Considerando os resultados das amplificações por paciente e não por amostras, houve 14 pacientes com PCR positiva (do total de 19), e cinco pacientes com PCR negativa. Dos 14 pacientes com PCR positiva, cinco possuíam doença de base. Dos cinco pacientes com PCR negativa, quatro apresentavam doença de base. Dos oito pacientes com dado epidemiológico de contato com gatos, cinco apresentavam PCR positiva.

Dos 19 pacientes foram obtidas 25 amostras biológicas: 14 de sangue periférico, sete biópsias de gânglios, duas punções de gânglios e duas biópsias de pele. Foram detectadas 18 amostras positivas do total de 25 (pelo *nested-FtsZ*): nove de sangue periférico, cinco biópsias de gânglios (todas deste tipo), duas punções de gânglios (todas deste tipo) e duas biópsias de pele (todas deste tipo). Sete amostras foram negativas (cinco eram amostras de sangue periférico e duas biópsias de gânglios). Houve 10 amostras que só foram positivas pelo *nested-FtsZ* (seis amostras de sangue, as duas punções de gânglios, uma biópsia de gânglio e uma biópsia de pele).

7.1 Condições de amplificação dos três sistemas de *nested*-PCR

Inicialmente, foram definidas as condições de amplificação dos três sistemas de *nested*-PCR, com o intuito de melhorar a detecção de *Bartonella* spp, sem, no entanto, perder a especificidade.

Estimando que a infecção possa ser paucibacilar (presença de poucas bactérias pelo fato da maior parte dos pacientes receber antibióticos antes da coleta de amostras para a PCR), 1 micrograma de DNA genômico (DNA humano contendo possivelmente ínfimas quantidades de DNA de *Bartonella henselae*) foi a concentração de DNA definida como ideal para a realização da primeira etapa de amplificação, em volume final de reação de 50µL contendo 200µM de dNTP; 0,4µM dos iniciadores, 2,5U da Taq DNA polimerase (Labtrade), tampão [10 X] (Labtrade), 1,5mM do MgCl₂ (Labtrade).

Para a segunda etapa (segundo *round*) de amplificação, 5µL do produto do primeiro PCR foram transferidos ao microtubo do *nested*-HSP, *nested*-FtsZ e *nested*-ITS contendo 45µL de volume contendo reagentes em concentrações semelhantes àsquelas da primeira amplificação, apenas diferindo na composição dos iniciadores. As condições de amplificação definidas para as duas etapas dos três sistemas de dupla amplificação foram: desnaturação do DNA a 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos descritos na Tabela 5, e uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos.

Tabela 5 - Padronização das condições das duas etapas de amplificação dos três sistemas de *nested*-PCR

PCR	Ciclos		
	D	A	E
HSP-PCR	95 °C 1 min.	55 °C 1 min.	72 °C 1 min.
<i>nested</i>-HSP	95 °C 1 min.	60 °C 1 min.	72 °C 1 min.
ITS-PCR	95 °C 1 min.	55 °C 1 min.	72 °C 1 min.
<i>nested</i>-ITS	95 °C 1 min.	55 °C 1 min.	72 °C 1 min.
<i>FtsZ</i>-PCR	95 °C 1 min.	55 °C 1 min.	72 °C 1 min.
<i>nested-FtsZ</i>	95 °C 1 min.	60 °C 1 min.	72 °C 1 min.

D-Desnaturação A-Annealing E-Extensão min.-minuto

7.2 Limiar de detecção

7.2.1 Limiar de detecção apenas com DNA de *Bartonella henselae* e com DNA de *Bartonella henselae* e DNA humano

O limiar de detecção obtido com o teste apenas do DNA de *Bartonella henselae* mostrou melhora da sensibilidade com a utilização do *nested*-HSP e *nested-FtsZ*, sendo que os dois sistemas conseguiram amplificar até 10fg de DNA bacteriano. Contrariamente, o sistema ITS-PCR não mostrou ganho de sensibilidade após a dupla amplificação, porém o ITS-PCR já era capaz de detectar 10fg de DNA desde a primeira amplificação (Tabela 6).

Quando o limiar de detecção das amplificações dos três sistemas foi aferido com DNA de *Bartonella henselae* “misturado” ao DNA humano, os resultados obtidos mostraram detecção de 100fg para os três sistemas após a segunda amplificação. No entanto, o *nested*-ITS apresentou ganho com o segundo *round* de amplificação (passou de 1pg para 100fg), e o *nested*-FtsZ também apresentou ganho com o segundo *round* de amplificação (passou de 10pg para 100fg), salientando que no sistema HSP já era possível detectar 100fg após a primeira amplificação, conforme mostra a tabela 6. De uma forma geral, houve piora do limiar de detecção dos *nested*-PCR quando o DNA humano foi acrescido ao DNA de bartonela, passando de 10fg para 100fg (100fg corresponderiam a 50 unidades formadoras de colônias).

Tabela 6 - Limiar de detecção com amostras oriundas de diluição limite

Iniciadores	DNA <i>Bartonella</i>	DNA <i>Bartonella</i> + DNA humano
HSP-PCR	100fg	100fg
<i>nested</i>-HSP	10fg	100fg
ITS-PCR	10fg	1pg
<i>nested</i>-ITS	10fg	100fg
FtsZ-PCR	100fg	10pg
<i>nested</i>-FtsZ	10fg	100fg
pg – picograma fg - fentograma		

7.3 Especificidade

Não foi observada nenhuma reação cruzada com os diferentes microrganismos avaliados: Citomegalovírus, Epstein-Barr vírus, *Toxoplasma gondii*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia pneumoniae* e *Bartonella quintana*. Esta última foi a única outra espécie de *Bartonella* (além da *B. henselae*) que pudemos utilizar para a realização dos testes de especificidade.

7.4 Validação dos sistemas de *nested*-PCR: teste de amostras de pacientes

As 25 amostras de DNA foram amplificadas com sucesso com os iniciadores universais ($\beta 1$ e $\beta 2$), e foram a seguir amplificadas pelos três sistemas para detecção de DNA de *Bartonella henselae*.

Após a primeira amplificação com o sistema HSP-PCR (iniciadores HSP1 e HSP2) foi detectado somente 1 caso positivo correspondendo a 1/25 ou 4,0%. Após o *nested*-HSP (iniciadores HSP3 e HSP4) obtivemos 6 resultados positivos, correspondendo a 6/25 ou 24%, porém, apesar da detecção ter passado de 4 para 24%, esta diferença não foi estatisticamente significativa com $p=0,063$ (Tabela 7).

Após a primeira amplificação com o sistema ITS-PCR (iniciadores ITS1 e ITS2) foram detectados 5 casos positivos correspondendo a 5/25 ou

20%. Após o *nested*-ITS (iniciadores ITS3 e ITS4) obtivemos 8 resultados positivos, correspondendo a 8/25 ou 32%, porém, esta diferença também não foi estatisticamente significativa com $p=0,250$ (Tabela 7).

Após a primeira amplificação com o sistema *FtsZ*-PCR (iniciadores *FtsZ1* e *FtsZ2*) foram detectados 4 casos positivos, correspondendo a 4/25 ou 16%. No entanto, após o *nested-FtsZ* obtivemos 18 resultados positivos correspondendo a 18/25 ou 72% (Tabela 7).

Quando o teste de McNemar foi aplicado para verificar a concordância ou discordância dos resultados da amplificação simples em relação à dupla amplificação, verificou-se discordância dos resultados favorecendo a dupla amplificação, sendo a diferença encontrada entre os dois testes (primeiro sistema de *FtsZ*-PCR versus *nested-FtsZ*) considerada estatisticamente significativa, com $p=0,0001$ (Tabela 7).

Tabela 7. Frequência de resultados positivos e valores de p obtidos na verificação da concordância ou discordância entre os resultados do primeiro PCR em relação a *nested*-PCR

	Positivas/total	% positivas	p
HSP-PCR	1/25	4	0,063
<i>nested</i>-HSP	6/25	24	
ITS-PCR	5/25	20	0,250
<i>nested</i>-ITS	8/25	32	
<i>FtsZ</i>-PCR	4/25	16	0,0001
<i>nested-FtsZ</i>	18/25	72	

Quando o mesmo teste de McNemar foi aplicado para verificar a concordância ou discordância dos resultados obtidos com os três sistemas de dupla amplificação, verificou-se discordância dos resultados favorecendo o sistema *nested-FtsZ*, sendo a diferença entre o desempenho do *nested-FtsZ* em relação aos outros dois sistemas de dupla amplificação (*nested-ITS* e *nested-HSP*) considerada estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Essa diferença se manteve mesmo após a correção de Bonferroni.

É importante salientar que não houve nenhuma amostra positiva pelos *nested-HSP* e *nested-ITS* e que não tenha sido detectada pelo *nested-FtsZ* (Tabela 8).

Tabela 8 – Comparação entre os resultados das amplificações simples e os obtidos pelos *nested*-PCR com relação a todas as amostras testadas

Nº.	Pac.	Material	<i>FtsZ</i> PCR	<i>nested</i> <i>FtsZ</i>	HSP PCR	<i>nested</i> HSP	ITS PCR	<i>nested</i> ITS
1	WSS	Biópsia de pele	+	+	-	+	+	+
2	RAV	Biópsia de gânglio	-	+	-	+	-	+
3	BTP	A. Sangue	-	+	-	-	-	-
		B. Biópsia de gânglio	+	+	-	+	+	+
4	JJS	Sangue	-	+	-	-	-	+
5	TRCO	Biópsia de gânglio	+	+	-	+	+	+
6	CH	Punção gânglio	-	+	-	-	-	-
7	PA	Biópsia de pele	-	+	-	-	-	-
8	MF	Sangue	-	-	-	-	-	-
9	LN	Sangue	-	+	-	-	-	+
10	ESF	Sangue	+	+	-	-	-	-
11	NNM	Sangue	-	-	-	-	-	-
12	PKS	A. Sangue	-	+	-	-	-	-
		B. Biópsia de gânglio	-	+	+	+	+	+
13	MDT	Sangue	-	+	-	-	-	-
14	WVM	Sangue	-	+	-	-	-	-
15	HLS	A. Punção gânglio	-	+	-	-	-	-
		B. Biópsia de gânglio	-	+	-	-	-	-
		C. Sangue	-	+	-	-	-	-
16	ASTG	Sangue	-	+	-	+	+	+
17	MALM	A. Sangue	-	-	-	-	-	-
		B. Biópsia de gânglio	-	-	-	-	-	-
18	IMF	A. Sangue	-	-	-	-	-	-
		B. Biópsia de gânglio	-	-	-	-	-	-
19	JCS	Sangue	-	-	-	-	-	-

- Negativo; + positivo

7.5 Confirmação da sequência nucleotídica dos amplificadores obtidos no *nested-FtsZ*

7.5.1 Clivagem enzimática (RFLP)

Das 25 amostras biológicas analisadas, 18 amplificaram no sistema *nested-FtsZ* e esses produtos de amplificação foram clivados com a enzima de restrição HpyCH4IV, assim como o controle positivo (fragmento de DNA de *Bartonella henselae* amplificado pelo *nested-FtsZ*). Todas as amostras positivas pelo *nested-FtsZ* (bem como o controle) produziram dois fragmentos com os pesos moleculares esperados (127 e 91pb), a partir da restrição do fragmento total de 218 pb do gene *FtsZ*. A clivagem enzimática das 18 amostras positivas foi ilustrada na Figura 1.

Figura 1 - RFLP das amostras positivas para *nested-FtsZ*

25pb: marcador de peso molecular 25 bp ladder (GE Health Care)

Linhas 1, 2, 3A, 3B, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12A, 12B, 13, 14, 15A, 15B, 15C e 16: amostras positivas pelo *nested-FtsZ*

C1: Controle (amplificado de *Bartonella henselae* após clivagem enzimática com HpyCH4IV)

C2: Controle (amplificado de *Bartonella henselae* sem clivagem enzimática)

7.5.2 Sequenciamento

Os resultados do sequenciamento dos fragmentos amplificados pelo *nested-FtsZ* mostraram porcentagem elevada de homologia, variando de 97 a 100%, quando comparadas à sequência nucleotídica de *Bartonella henselae* cepa Houston-1 (número de acesso no GenBank 005956.1). Os resultados dos sequenciamentos das amostras positivas no *nested-FtsZ* e o grau de homologia com a cepa de referência encontram-se nos Anexos.

8. *DISCUSSÃO*

Tendo em vista que na atualidade diferentes espécies de *Bartonella* estão associadas a infecções em seres humanos, e devido às dificuldades para se definir o diagnóstico laboratorial, a padronização de testes capazes de detectar a presença desta bactéria, de forma rápida, sensível e específica, principalmente em pacientes imunodeficientes que apresentam quadros clínicos de maior gravidade, tornou-se de extrema relevância clínica.

Este estudo teve como objetivo aumentar o poder de detecção de DNA da bactéria *Bartonella henselae* para o diagnóstico laboratorial tanto da Doença da Arranhadura do Gato, quanto de outras bartoneloses humanas, por meio de técnica de PCR de dupla amplificação (*nested-PCR*). Esta detecção deveria ser mais sensível e específica em relação aos métodos diagnósticos convencionais, e também apresentar maior versatilidade, uma vez que pode ser realizada com diversos tipos de material biológico, incluindo sangue periférico, bastando que ocorra adaptação da técnica de extração de DNA, que deve, no entanto, considerar as características da bactéria que é intraeritrocitária (Pitassi et al., 2007), privilegiando o uso de protocolos que partam de sangue total, com aproveitamento e lise de eritrócitos, em lugar da utilização da camada de leucócitos e plaquetas. Além disso, na dependência da amostra biológica a ser testada, e do modelo de estudo, deve-se ainda considerar que *Bartonella henselae* também infecta células endoteliais (Dehio et al., 1997; Kempf et al., 2000; Riess et al., 2004), células epiteliais (Batterman et al., 1995; Kempf et al., 2001), monócitos e macrófagos (Resto-Ruiz et al., 2002; Kempf et al., 2005).

Na maior parte dos casos, o diagnóstico é baseado na combinação de dados clínicos, epidemiológicos (contato com gatos), sorológicos e mais raramente histopatológicos, uma vez que a forma clínica mais comumente diagnosticada de bartonelose ainda é a Doença da Arranhadura do Gato, que aparece como processo inflamatório de linfonodos, após lesão de pele causada geralmente por arranhadura, que funciona como sítio de inoculação da bactéria.

Outros testes, tais como os imunohistoquímicos e a microscopia eletrônica, são realizados em alguns poucos centros universitários, assim como a coloração de Giemsa (realizada em esfregaços de sangue periférico), que é utilizada apenas como teste de triagem de casos suspeitos de infecção causada por *Bartonella* spp. Portanto, a busca de métodos diagnósticos mais sensíveis, específicos e rápidos traria contribuição significativa ao diagnóstico e ao manejo de casos de bartonelose humana, notadamente em pacientes imunodeficientes.

A utilização da técnica de PCR como ferramenta diagnóstica de infecções causadas por *Bartonella* spp possibilita a detecção do agente infeccioso diretamente de material biológico representativo do sítio de infecção. Sendo assim, as amostras mais empregadas para a detecção por PCR têm sido fragmentos de biópsias (geralmente de gânglios), e secreção obtida por meio de punção de linfonodos.

Muitas técnicas moleculares têm sido descritas nos últimos anos para a identificação de diferentes espécies de *Bartonella* (Anderson et al., 1994; Sander et al., 1998b; Kelly et al., 1998; Zeaiter et al., 2002; Margolis et al.,

2003; Zeaiter et al., 2003; Hansmann et al., 2005; Ciervo et al., 2005; García-Esteban et al., 2008), mas poucos trabalhos determinaram a sensibilidade, ou seja, o limiar de detecção de cada uma das técnicas (Norman et al., 1995; Avidor et al., 1997; Jensen et al., 2000; Johnson et al., 2003). Além disso, esses estudos se limitaram a analisar biópsias ou secreção de gânglios de pacientes com quadro clínico sugestivo de DAG, e comparar as sensibilidades de diferentes sistemas de detecção (Avidor et al., 1997; Sander et al., 1999).

Na tentativa de alcançar o diagnóstico mais sensível e específico considerando nossas condições laboratoriais, e ainda, de forma bastante versátil (utilizando vários tipos de material biológico, especialmente sangue periférico), padronizamos três sistemas de dupla amplificação (*nested-PCR*). É importante salientar que este é o primeiro trabalho de detecção de DNA de *Bartonella* spp em sangue periférico (com exceção de alguns poucos relatos de caso existentes na literatura) (Del Prete et al., 2000; Arvand et al., 2006), além da análise de amostras convencionalmente utilizadas (gânglios e punção de gânglios). A maior parte dos autores utiliza técnicas de amplificação simples (*one-round PCR*) (Anderson et al., 1994; Kelly et al., 1998; Sander et al., 1999; Jensen et al., 2000; Johnson et al., 2003; Hansman et al., 2005), ou que utilizaram material previamente semeado em cultura, com o objetivo de amplificar possíveis colônias bacterianas de *Bartonella* spp (Norman et al., 1995; Rolain et al., 2006).

Os três sistemas de dupla amplificação (*nested-PCR*) utilizaram como alvo três genes da *Bartonella* spp capazes de detectar a *B. henselae*. O

sistema *nested-FtsZ* detecta especificamente *B. henselae*, enquanto o *nested-HSP* não é capaz de diferenciar *B. henselae* de *B. quintana*, e o *nested-ITS* é capaz de diferenciar *B. henselae* das demais, porém não diferencia *B. quintana* de *B. clarridgeiae*.

O *nested-FtsZ* foi considerada útil uma vez que, dentre as espécies de *Bartonella*, aquela que mereceria maior atenção seria de fato a *Bartonella henselae*, causadora da maior parte das infecções humanas, tendo sido descrita em associação a quadros clínicos de DAG, angiomatose bacilar, peliose bacilar, endocardites, manifestações oculares e etc (Lamas et al., 2008).

Ainda com relação ao diagnóstico molecular de bartoneloses, devemos lembrar que a *B. quintana* também pode causar manifestações clínicas semelhantes àsquelas da *B. henselae*. No entanto, a diferenciação das duas espécies foi possível em nosso estudo graças à utilização do *nested-ITS*, que amplifica fragmentos de peso molecular distintos, não sendo, no entanto, capaz de diferenciar a *B. quintana* de *B. clarridgeiae*. Este último fato não parece, ao menos até o presente, ser clinicamente relevante uma vez que estudos de distribuição geográfica de *Bartonella* spp parecem indicar que a *B. clarridgeiae* está presente na Europa, Estados Unidos e Ásia (Lamas et al., 2008), causando infecções humanas de menor gravidade em relação à *B. henselae* (Zeaiter et al., 2002), mas não foi ainda descrita em nosso meio.

Inicialmente determinou-se o limiar de detecção dos três sistemas de *nested-PCR* (*FtsZ*, *HSP* e *ITS*) apenas com o DNA da *Bartonella henselae*

Houston-1. A sensibilidade foi igual nos três sistemas de dupla amplificação (10 fg), porém todos os sistemas perderam sensibilidade após adição de DNA humano (100fg). Johnson et al. (2003) obtiveram resultados semelhantes aos nossos após a adição do DNA humano, com a detecção de 100fg (que corresponde a 50 unidades formadoras de colônia de *Bartonella* spp), porém, naquele estudo, tratava-se de sistema de amplificação simples do gene que codifica região ITS.

A concentração de *Bartonella* spp em sangue periférico dos pacientes com suspeita de bartonelose deve ser muito baixa (maior concentração esperada em gânglios), fato agravado pela administração prévia de antibióticos que ocorre na maior parte dos casos. Utilizando esta premissa decidimos padronizar três técnicas de dupla amplificação que deveriam ser capazes de contornar a “falta de sensibilidade” das amplificações simples, e nos permitir definir o diagnóstico com ganho de sensibilidade. É preciso também salientar que a dupla amplificação permite não apenas melhorar a sensibilidade, mas também ganhar especificidade, uma vez que uma dada amostra só resultará positiva após o *nested-PCR* caso tenha havido reconhecimento da sequência alvo pelos dois pares de iniciadores (da primeira e da segunda amplificação).

Considerando a situação de infecções paucibacilares pelos motivos já expostos, adotamos a concentração de 1µg de DNA total dos pacientes (contendo muito DNA humano e talvez pouco DNA de *Bartonella* spp) como concentração a ser utilizada na primeira amplificação, pensando justamente em aumentar nossas chances de obter resultados positivos, sem contudo

correr o risco de saturar o sistema, provocando efeito indesejado (inibição da amplificação), o que não ocorreu neste estudo.

No teste de especificidade os três sistemas de PCR mostraram excelentes resultados, uma vez que não houve reações cruzadas com microrganismos que podem causar linfadenopatia febril em crianças, tais como CMV e *Toxoplasma gondii* (síndromes mononucleose símile), ou com outros agentes etiológicos que podem produzir reações falso-positivas em testes imunoenzimáticos, tais como *Bartonella quintana* e *Chlamydia pneumoniae* (La Scola et al., 1996; Maurin et al., 1997).

A validação dos três sistemas de PCR (*FtsZ*, HSP e ITS) foi realizada utilizando-se DNA extraído de diferentes materiais biológicos de pacientes com suspeita de bartonelose (sangue periférico, biópsia de gânglio, punção de gânglio e biópsia de pele), ou seja, que apresentavam sinais e sintomas sugestivos de bartonelose. Nossos resultados mostraram que os três *nested*-PCR apresentaram melhor desempenho em relação às amplificações simples, e dentre os sistemas de dupla amplificação, o *nested-FtsZ* foi o que alcançou os melhores resultados, não havendo nenhuma amostra que tenha sido positiva pelos *nested*-HSP ou ITS que também não tenha sido amplificada pelo *nested-FtsZ*, o que nos permite afirmar que, na presente casuística, as bartoneloses diagnosticadas tenham sido causadas exclusivamente por *B. henselae*. Além disso, a possibilidade de se coletar sangue periférico dos pacientes (principalmente crianças), em lugar de submetê-los a biópsias ou punções de gânglios, constitui medida de extrema relevância assistencial, com redução dos riscos inerentes à realização de

procedimentos diagnósticos mais invasivos, além de possibilitar a definição de casos nos quais não há possibilidade de realização de biópsia ou punção de gânglios, ou ainda nos casos com testes ditos “de triagem” sugestivos de bartonelose (Arvand et al., 2006).

A técnica de *nested*-ITS (Jensen et al., 2000), também poderia ser aperfeiçoada, pois é capaz de diferenciar seis espécies de *Bartonella*, incluindo àquelas de maior relevância em patologia humana, enquanto que o *nested-FtsZ* só detecta *B. henselae*. Muito embora o *nested-FtsZ* tenha sido o mais sensível no presente estudo, o aperfeiçoamento do *nested*-ITS poderia ser útil em casos de escassez de material biológico, fato relativamente frequente em casuísticas pediátricas e havendo necessidade de diagnóstico diferencial de infecções causadas por *B. henselae*, *B. quintana* e outras espécies (*B. elizabethae* e *B. vinsoni*).

Anderson et al. (1994) mostram positividade de 84% de PCR para o gene HSP de *Bartonella* spp em biópsias e punções de linfonodo de indivíduos com linfadenopatia regional e contato com gatos. Avidor et al. (1997), utilizando o mesmo tipo de material biológico e o mesmo sistema de amplificação de Anderson et al. (1994) mostraram sensibilidade mais baixa (69%). Nosso resultado que mais se aproximou do trabalho de Avidor et al. (1997) foi o *nested-FtsZ* que apresentou positividade de 72% em diferentes materiais biológicos (sangue periférico, biópsia e punção de gânglio e biópsia de pele), e se considerarmos somente biópsias e punções de gânglios a positividade passa a ser de 78%. Sander et al., (1999)

observaram sensibilidade menor (43%) em casos sugestivos de bartonelose, porém a técnica usada foi o exame histopatológico de linfonodos.

A grande variabilidade na sensibilidade de técnicas de amplificação enfatiza a importância de triagem clínica e epidemiológica adequada, uma vez que os resultados sorológicos podem ser inconclusivos e os achados histopatológicos podem ser considerados muito sugestivos de bartoneloses, porém não são patognomônicos. Linfadenopatias inguinais, por exemplo, podem ser causadas por outros agentes etiológicos tais como *Chlamydia trachomatis*, micobactérias atípicas, *Yersinia*, *Brucella* e fungos, devendo ser consideradas no diagnóstico diferencial de pacientes imunodeficientes (Kaschula, 1996).

Sander et al (1999) mostraram a importância da confirmação dos resultados histopatológicos pela amplificação de DNA da *Bartonella* spp em amostras de tecido, da mesma forma que Hansmann et al. (2005) que encontraram elevada sensibilidade (detecção em torno de 80%) utilizando amplificação de biópsias de linfonodo, em pacientes com diagnóstico clínico, epidemiológico e laboratorial de DAG (presença de linfadenopatia regional, contato com gatos e exame histopatológico e/ou pela imunofluorescência positiva para *Bartonella* spp). Portanto, essa variação de sensibilidade pode ser explicada pelos critérios clínicos e epidemiológicos utilizados para a seleção dos casos, bem como pela demora em se considerar a possibilidade de bartonelose como hipótese diagnóstica, com administração prévia de vários antibióticos antes da coleta do material biológico para a realização de

testes laboratoriais específicos, tais como isolamento em cultura, sorologias, exames imunohistoquímicos e mais recentemente, a PCR.

Em nosso estudo, a maioria dos pacientes fazia uso de algum antibiótico ou de vários antibióticos, porém esse fato parece não ter influenciado de forma significativa o desempenho dos sistemas de dupla amplificação (especialmente o *nested-FtsZ*), uma vez que houve detecção de 18 amostras positivas das 25 testadas, muito embora não tenha sido possível realizar a comparação dos desempenhos em relação aos métodos diagnósticos convencionais, uma vez que estes testes foram realizados em apenas 6 dos 19 pacientes. O isolamento em culturas, testes sorológicos, imunohistoquímicos e microscopia eletrônica não foram solicitados para todos os pacientes incluídos na casuística devido à indisponibilidade destes exames em nosso meio.

Tendo em vista que na maior parte das suspeitas clínicas de bartonelose os pacientes acabam recebendo antibióticos antes da coleta de exames diagnósticos específicos, com regressão dos sinais e sintomas, o número de pacientes nos quais a hipótese diagnóstica de infecção causada por *Bartonella* spp é aventada permanece restrito. As bartoneloses são provavelmente muito mais frequentes do que se imagina, porém não são diagnosticadas. Este fato explica porque nossa casuística foi composta por apenas 19 pacientes, dos quais obtivemos 25 amostras.

É importante salientar que de nove amostras de sangue periférico que foram positivas pelo sistema *nested-FtsZ*, 7 são de pacientes imunocompetentes. A possibilidade de se detectar *Bartonella henselae* (e

outras espécies) em sangue periférico representa avanço diagnóstico significativo uma vez que permite definição mais rápida e acurada de casos suspeitos de bartonelose. Porém, a detecção da *Bartonella henselae* por PCR em sangue periférico não tem obtido bons resultados em pacientes com bartonelose que não apresentam evidência de doença sistêmica, o que é compreensível. Existem alguns relatos de caso na literatura (Del Prete et al., 2000b; Tsukahara et al., 2001; Arvand et al., 2006; Velho et al., 2007), em pacientes imunodeficientes, notadamente em portadores do HIV que apresentavam sintomatologia mais grave e nos quais foi possível detectar DNA de bartonela em amostras de sangue (Pons et al., 2008).

A pesquisa de *Bartonella* spp em pacientes imunodeficientes deveria ser realizada de forma mais sistemática uma vez que estudo de Pons et al. (2008) mostrou que a frequência de angiomatose bacilar é elevada em portadores do HIV, nos quais o número de lesões, além da extensão e distribuição das mesmas pode ser atípico (Velho et al., 2007). Em nosso estudo conseguimos identificar a presença da *Bartonella henselae* em dois pacientes portadores do HIV pelo *nested-FtsZ*, sendo que um deles (WSS) apresentava quadro clínico bastante complexo (Peliose hepática por bartonela) e evoluiu a óbito 53 dias após o diagnóstico de bartonelose. Portanto, *Bartonella* spp deve ser considerada como agente etiológico em pacientes imunodeficientes (portadores do HIV, doença granulomatosa crônica ou outra condição que predisponha a infecção), com febre e algum outro sinal ou sintoma sugestivo (ou dado epidemiológico de contato com

gatos), e que já tenha sido descrito em associação à bartoneloses (Koehler et al., 2003; Velho et al., 2007; Pons et al., 2008).

Na presente casuística incluímos um paciente portador de Doença Granulomatosa Crônica (HLS), doença causada por defeito genético associado à falha do metabolismo oxidativo de fagócitos e incapacidade destas células de destruírem bactérias e fungos (Hara et al., 2009; Segal et al., 2009). Apesar de ter evoluído a óbito, foi possível se chegar ao diagnóstico laboratorial de bartonelose neste paciente uma vez que o *nested-FtsZ* foi positiva.

Incluímos também em nosso estudo, um paciente (ESF) submetido a transplante hepático apresentando febre e que evoluiu com quadro séptico. O esfregaço de sangue periférico corado pelo Giemsa sugeriu a presença de bactérias que poderiam ser *Bartonella* spp, o que foi confirmado pelo resultado positivo para *nested-FtsZ* (detecção específica de *Bartonella henselae*). Outros autores enfatizaram a importância de se pensar na possibilidade de bartoneloses em pacientes submetidos à imunossupressão após transplante de órgãos (Belanger et al., 2005).

Outro aspecto digno de nota é que, em nosso meio, não existe no momento disponibilidade de centros capazes de realizar o isolamento de *Bartonella* spp em cultura, ou teste sorológicos de forma rotineira. Sendo assim, os testes moleculares podem representar, ao menos por enquanto, a única forma de se chegar ao diagnóstico laboratorial de bartoneloses humanas no Brasil, apresentando vantagens em termos de sensibilidade e especificidade em relação às culturas e sorologias.

O presente estudo padronizou e validou com sucesso os três sistemas de dupla amplificação para a detecção de DNA de *Bartonella henselae*, sendo que o *nested-FtsZ* foi o mais sensível dos três, possibilitando aumento significativo do número de casos diagnosticados, comprovando a possibilidade de sua utilização em amostras de sangue periférico.

9. CONCLUSÕES

Os testes de dupla amplificação foram capazes de melhorar a detecção de *Bartonella henselae* sem perder especificidade.

Os três sistemas de dupla amplificação foram padronizados com sucesso.

Os três sistemas de dupla amplificação detectaram maior número de casos positivos que as amplificações simples.

Dentre os sistemas de dupla amplificação, o *nested-FtsZ* apresentou o melhor desempenho e será doravante adotada como padrão de diagnóstico molecular em nosso laboratório.

10. PERSPECTIVAS

Pretendemos aprimorar o diagnóstico molecular das bartoneloses humanas com a padronização de sistema de dupla amplificação para a detecção de *B. quintana* com iniciadores oriundos do gene *FtsZ*. Além disso, o sistema de amplificação que utiliza iniciadores do gene que codifica a região intergênica 16S-23S do rRNA, chamado de ITS-PCR também necessita de aprimoramento, uma vez que pode ser extremamente útil na diferenciação de seis espécies de *Bartonella*, incluindo as mais importantes em patologia humana, em situações de escassez de material biológico disponível para as amplificações.

11. ANEXOS

RESULTADOS DOS SEQUENCIAMENTOS

Cepa de referência e 18 amostras que foram positivas pelo *nested-FtsZ*

Cepa de referência usada como controle positivo: *Bartonella henselae*

```
>[ref|NC_005956.1|] [D] Bartonella henselae str. Houston-1, complete genome
Length=1931047

Features in this part of subject sequence:
  cell_division_protein_FtsZ

Score = 396 bits (214), Expect = 1e-107
Identities = 217/218 (99%), Gaps = 1/218 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query  2          CAAAACGG-TGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC  60
      |||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||
Sbjct 1232709     CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC 1232650

Query  61          TGTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAAA  120
      |||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||
Sbjct 1232649     TGTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAAA 1232590

Query  121         TGCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT  180
      |||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||
Sbjct 1232589     TGCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT 1232530

Query  181         GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG  218
      |||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||
Sbjct 1232529     GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG  1232492
```

Amostra nº 1

Sigla: WSS Material Biológico: Biópsia de pele

> [ref|NC_005956.1|](#) Bartonella henselae str. Houston-1, complete genome
Length=1931047

Features in this part of subject sequence:
[cell division protein FtsZ](#)

Score = 409 bits (221), Expect = 6e-112
Identities = 223/224 (99%), Gaps = 0/224 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query	3	CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC	62
Sbjct	1232709	CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC	1232650
Query	63	TGTTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAAA	122
Sbjct	1232649	TGTTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAAA	1232590
Query	123	TGCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT	182
Sbjct	1232589	TGCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT	1232530
Query	183	GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCGATGTGC	226
Sbjct	1232529	GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCGTTGTGC	1232486

Amostra nº 2 Sigla: RAV Material Biológico: Biópsia de gânglio

>[[ref|NC_005956.1](#)] [Bartonella henselae str. Houston-1, complete genome
Length=1931047

Features in this part of subject sequence:
[cell division protein FtsZ](#)

Score = 403 bits (218), Expect = 3e-110
Identities = 218/218 (100%), Gaps = 0/218 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query   4          CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC   63
          |||
Sbjct  1232709    CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC   1232650

Query   64          TGTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAAA   123
          |||
Sbjct  1232649    TGTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAAA   1232590

Query   124         TCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT   183
          |||
Sbjct  1232589    TCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT   1232530

Query   184         GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG   221
          |||
Sbjct  1232529    GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG   1232492

```

Amostra nº 3A**Sigla: BTP****Material biológico: Sangue**

> [ref|NC_005956.1|](#) Bartonella henselae str. Houston-1, complete genome
Length=1931047

Features in this part of subject sequence:
[cell division protein FtsZ](#)

Score = 403 bits (218), Expect = 3e-110
Identities = 218/218 (100%), Gaps = 0/218 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query    4      CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC 63
          |||
Sbjct    1232709 CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC 1232650

Query    64      TGTTCCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAAA 123
          |||
Sbjct    1232649 TGTTCCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAAA 1232590

Query    124     TCGGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT 183
          |||
Sbjct    1232589 TCGGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT 1232530

Query    184     GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG 221
          |||
Sbjct    1232529 GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG 1232492

```

Amostra n° 3B Sigla: BTP Material biológico: Biópsia de gânglio

> [ref|NC_005956.1|](#) Bartonella henselae str. Houston-1, complete genome
Length=1931047

Features in this part of subject sequence:
[cell division protein FtsZ](#)

Score = 405 bits (219), Expect = 8e-111
Identities = 221/222 (99%), Gaps = 0/222 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query	1	AGGTCAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTTGCACAGCCTGCAG	60
Sbjct	1232713	AGGGCAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTTGCACAGCCTGCAG	1232654
Query	61	ACACTGTTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATAT	120
Sbjct	1232653	ACACTGTTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATAT	1232594
Query	121	CAAATGCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCACTGA	180
Sbjct	1232593	CAAATGCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCACTGA	1232534
Query	181	GTATGGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG	222
Sbjct	1232533	GTATGGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG	1232492

Amostra n° 4**Sigla: JJS****Material biológico: Sangue**

>[gi|154090266|emb|AM294992.1|](#) Bartonella henselae partial ftsZ gene for cell division protein ftsZ, allele 3
Length=522

Score = 234 bits (118), Expect = 1e-58
Identities = 118/118 (100%), Gaps = 0/118 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 70 AGTGCTCATGGGCAGATATCAAATGCGCCACGTGTGCAAAGTAAGCCGTAGTTGCAATCC
129
      |||
Sbjct 245 AGTGCTCATGGGCAGATATCAAATGCGCCACGTGTGCAAAGTAAGCCGTAGTTGCAATCC
304

Query 130 TCTATGGTTGCACCAAGTGAGTATGGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAG
187
      |||
Sbjct 305 TCTATGGTTGCACCAAGTGAGTATGGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAG
362
```

Amostra n° 5 Sigla: TRCO Material biológico: Biópsia de gânglio

>[gi|154090266|emb|AM294992.1|](#) Bartonella henselae partial ftsZ gene for cell division protein ftsZ, allele 3
Length=522

Score = 274 bits (138), Expect = 1e-70
Identities = 165/170 (97%), Gaps = 3/170 (1%)
Strand=Plus/Plus

```

Query   13   TTTGCACAGCC-GCAGACATTATTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGTGTC AAG
71
      |||
Sbjct  188   TTTGCACAGCCTGCAGACACTGTTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGG-GTCA AAG
246

Query   72   TGCTCATGGGCAGATATCAAATGCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTC
131
      |||
Sbjct  247   TGCTCATGGGCAGATATCAAATGCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTC
306

Query   132  TATGGTTGCACCAAGTGAGTATGGAGNGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAG   181
      |||
Sbjct  307  TATGGTTGCACCAAGTGAGTATGGAG-GCGACGGCGCATGTTCTTGATGAG   355

```

Amostra nº 6 Sigla: CH Material biológico: Punção de gânglio

> [ref|NC_005956.1|](#) Bartonella henselae str. Houston-1, complete genome
Length=1931047

Features in this part of subject sequence:
[cell division protein FtsZ](#)

Score = 403 bits (218), Expect = 3e-110
Identities = 218/218 (100%), Gaps = 0/218 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query	1	CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC	60
Sbjct	1232709	CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC	1232650
Query	61	TGTTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAAA	120
Sbjct	1232649	TGTTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAAA	1232590
Query	121	TGCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT	180
Sbjct	1232589	TGCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT	1232530
Query	181	GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG	218
Sbjct	1232529	GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG	1232492

Amostra nº 7

Sigla: PA

Material biológico: Biópsia de pele

> [ref|NC_005956.1](#) Bartonella henselae str. Houston-1, complete genome
Length=1931047

Features in this part of subject sequence:
[cell division protein FtsZ](#)

Score = 403 bits (218), Expect = 4e-110
Identities = 221/222 (99%), Gaps = 1/222 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query    60      CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC  119
          |||
Sbjct    1232709 CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC  1232650

Query    120     TGTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAA  179
          |||
Sbjct    1232649 TGTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAA  1232590

Query    180     TGCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT  239
          |||
Sbjct    1232589 TGCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT  1232530

Query    240     GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCGATTG  281
          |||
Sbjct    1232529 GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG-TTG  1232489

```

Amostra nº 9**Sigla: LN****Material biológico: Sangue**

> [ref|NC_005956.1|](#) Bartonella henselae str. Houston-1, complete genome
Length=1931047

Features in this part of subject sequence:
[cell division protein FtsZ](#)

Score = 403 bits (218), Expect = 3e-110
Identities = 218/218 (100%), Gaps = 0/218 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query	1	CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC	60
Sbjct	1232709	CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC	1232650
Query	61	TGTTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAAA	120
Sbjct	1232649	TGTTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAAA	1232590
Query	121	TGCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT	180
Sbjct	1232589	TGCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT	1232530
Query	181	GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG	218
Sbjct	1232529	GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG	1232492

Amostra n° 10**Sigla: ESF****Material biológico: Sangue**

> [ref|NC_005956.1|](#) Bartonella henselae str. Houston-1, complete genome
Length=1931047

Features in this part of subject sequence:

[cell division protein FtsZ](#)

Score = 403 bits (218), Expect = 3e-110
Identities = 218/218 (100%), Gaps = 0/218 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query	4	CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC	63
Sbjct	1232709	CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC	1232650
Query	64	TGTTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAAA	123
Sbjct	1232649	TGTTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAAA	1232590
Query	124	TGCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT	183
Sbjct	1232589	TGCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT	1232530
Query	184	GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG	221
Sbjct	1232529	GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG	1232492

Amostra n° 12A**Sigla: PKC****Material biológico: Sangue**

> [ref|NC_005956.1|](#) Bartonella henselae str. Houston-1, complete genome
Length=1931047

Features in this part of subject sequence:
[cell division protein FtsZ](#)

Score = 403 bits (218), Expect = 3e-110
Identities = 218/218 (100%), Gaps = 0/218 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query	4	CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC	63
Sbjct	1232709	CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC	1232650
Query	64	TGTTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAAA	123
Sbjct	1232649	TGTTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAAA	1232590
Query	124	TGCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT	183
Sbjct	1232589	TGCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT	1232530
Query	184	GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG	221
Sbjct	1232529	GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG	1232492

Amostra n° 12B Sigla: PKC Material biológico: Biópsia de gânglio

> [ref|NC_005956.1|](#) Bartonella henselae str. Houston-1, complete genome
Length=1931047

Features in this part of subject sequence:
[cell division protein FtsZ](#)

Score = 396 bits (214), Expect = 5e-108
Identities = 217/218 (99%), Gaps = 1/218 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query	1	CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC	60
Sbjct	1232709	CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC	1232650
Query	61	TGTTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAGTGCTCATGGGCAGATATCAA	120
Sbjct	1232649	TGTTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAGTGCTCATGGGCAGATATCAA	1232590
Query	121	TGCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT	180
Sbjct	1232589	TGCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT	1232530
Query	181	GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATG-CAGGCG	217
Sbjct	1232529	GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG	1232492

Amostra nº 13**Sigla: MDT****Material biológico: Sangue**

> [ref|NC_005956.1|](#) Bartonella henselae str. Houston-1, complete genome
Length=1931047

Features in this part of subject sequence:
[cell division protein FtsZ](#)

Score = 403 bits (218), Expect = 3e-110
Identities = 218/218 (100%), Gaps = 0/218 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1      CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC 60
            |||
Sbjct 1232709 CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC 1232650

Query 61     TGTTCCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAAA 120
            |||
Sbjct 1232649 TGTTCCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAAA 1232590

Query 121    TCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT 180
            |||
Sbjct 1232589 TCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT 1232530

Query 181    GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG 218
            |||
Sbjct 1232529 GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG 1232492

```

Amostra n° 14**Sigla: WVM****Material biológico: Sangue**

>[[ref|NC_005956.1](#)] [Bartonella henselae str. Houston-1, complete genome
Length=1931047

Features in this part of subject sequence:
[cell division protein FtsZ](#)

Score = 403 bits (218), Expect = 3e-110
Identities = 218/218 (100%), Gaps = 0/218 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query    1      CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC  60
          |||
Sbjct   1232709 CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC  1232650

Query    61      TGTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAAA  120
          |||
Sbjct   1232649 TGTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAAA  1232590

Query    121     TCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT  180
          |||
Sbjct   1232589 TCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT  1232530

Query    181     GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG  218
          |||
Sbjct   1232529 GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG  1232492

```


Amostra n° 15B Sigla: HLS Material biológico: Biópsia de gânglio

> [ref|NC_005956.1|](#) Bartonella henselae str. Houston-1, complete genome
Length=1931047

Features in this part of subject sequence:
[cell division protein FtsZ](#)

Score = 403 bits (218), Expect = 3e-110
Identities = 218/218 (100%), Gaps = 0/218 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1          CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC 60
                |||
Sbjct 1232709    CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACAC 1232650

Query 61         TGTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAA 120
                |||
Sbjct 1232649    TGTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAA 1232590

Query 121        TCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT 180
                |||
Sbjct 1232589    TCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT 1232530

Query 181        GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG 218
                |||
Sbjct 1232529    GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG 1232492

```

Amostra n° 15C Sigla: HLS Material biológico: Sangue

> [ref|NC_005956.1](#) Bartonella henselae str. Houston-1, complete genome
Length=1931047

Features in this part of subject sequence:
[cell division protein FtsZ](#)

Score = 396 bits (214), Expect = 5e-108
Identities = 217/218 (99%), Gaps = 1/218 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query	1	CAAAAC-GTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAAGTCAAATTTTTGCACAGCCTGCAGACAC	59
Sbjct	1232709	CAAAACGGTTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAAGTCAAATTTTTGCACAGCCTGCAGACAC	1232650
Query	60	TGTTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAA	119
Sbjct	1232649	TGTTGCTGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAA	1232590
Query	120	TGCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT	179
Sbjct	1232589	TGCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAAGTGAGTAT	1232530
Query	180	GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG	217
Sbjct	1232529	GGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG	1232492

Amostra nº 16**Sigla: ASTG****Material biológico: Sangue**

> [ref|NC_005956.1|](#) Bartonella henselae str. Houston-1, complete genome
Length=1931047

Features in this part of subject sequence:
[cell division protein FtsZ](#)

Score = 392 bits (212), Expect = 1e-106
Identities = 212/212 (100%), Gaps = 0/212 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1      GGTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACACTGTTGC 60
          |||
Sbjct 1232703 GGTGGAGAGCAGTTTCGTCCTAAAAGTCAAATTTTGCACAGCCTGCAGACACTGTTGC 1232644

Query 61     TGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAAATGCCGC 120
          |||
Sbjct 1232643 TGCACGAAATGCTGCCGCTGCTTATGGGTCAAAGTGCTCATGGGCAGATATCAAATGCCGC 1232584

Query 121    ACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAGTGAGTATGGAGGC 180
          |||
Sbjct 1232583 ACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTTGCACCAGTGAGTATGGAGGC 1232524

Query 181    GACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG 212
          |||
Sbjct 1232523 GACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCG 1232492

```

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Haq N, Abuhammour W, Al-Tatari H, Asmar B. Disseminated cat scratch disease with vertebral osteomyelitis and epidural abscess. *South. Med. J.* 2005; 98: 1142-5.

Adelson ME, Rao RV, Tilton RC, Cabets K, Eskow E, Fein L, Occi JL, Mordechai E. Prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Bartonella* spp, *Babesia microti* and *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes scapularis* ticks collected in Northern New Jersey. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 2: 2799-801.

Ahsan N, Holman MJ, Riley TR, Abendroth CS, Langhoff EG, Yang HC. Peliosis hepatitis due to *Bartonella henselae* in transplantation: a hemato-hepato-renal syndrome. *Transplantation.* 1998; 65: 1000-3.

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

Anderson B, Sims K, Regnery R, Robinson L, Schmidt MJ, Goral S, Hager C, Edwards K. Detection of *Rochalimaea henselae* DNA in specimens from cat scratch disease patients by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32: 942-8.

Anderson SG, and Dehio C. *Rickettsia prowazekii* and *Bartonella henselae*: differences in the intracellular life styles revisited. *Inst. J. Med. Microbiol.* 2000; 290: 135-41.

Armengol CE, Hendley JO. Cat-scratch disease encephalopathy: a cause of status epilepticus in school-aged children. *J. Pediatric*. 1999; 134: 635-8.

Arvand M and Schäd SG. Isolation of *Bartonella henselae* DNA from the peripheral blood of a patient with cat scratch disease up to 4 months after the cat scratch injury. *J. Clin. Microbiol*. 2006; 44: 2288-90.

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

Avidor B, Kletter Y, Abulafia S, Golan Y, Ephros M, Giladi M. Molecular diagnosis of cat scratch disease: a two-step approach. *J. Clin. Microbiol*. 1997; 8: 1924-30.

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

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

Belangero VMS, Tresoldi AT, Prates LC, Mendes RP, Catherino P, Rigatto SZP e Barison EM. Angiomatose Bacilar pós-transplante renal: apresentação de um caso. *J. Bras. Nefrol.* 2006; 28: 168-70.

Bergmans AMC, de Jong CMA, Van Amerongen G, Schot CS, Schouls LM. Prevalence of *Bartonella* species in domestic cats in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35: 2256-61.

Bergmans AMC, Schellekens JFP, van Embden JDA, Schouls LM. Predominance of two *Bartonella henselae* variants among cat-scratch disease patients in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34: 254-60.

Bonatti H, Mendez J, Guerrero I, Krishna M, Ananda-Michel J, Yao J, Steers JL, Hellinger W, Dickson RC, Alvarez S. Disseminated *Bartonella* infection following liver transplantation. *Transpl. Inf.* 2006; 19: 683-7.

Borker A, Gardner R. Severe thrombocytopenic purpura as a complication of cat-scratch disease. *Clin. Pediatr. (Philadelphia)*. 2002; 41: 117-8.

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

Brenner DJ, Hollis DG, Moss CW, English CK, Hall GS, Vicent J, Radosevic J, Birkness KA, Bibb WF, Quinn FD, Swaminathan B, Weaver RE, Reeves MW, O'Connor SP, Hayes PS, Tenover FC, Steigerwalt AG, Perkins BA, Daneshvar MI, Hill BC, Washington JA, Woods TC, Hunter SB, Hadfield TL, Ajello GW, Kaufmann AF, Wear DJ and Wenger JD. Proposal of *Afipia* gen. nov., with *Afipia felis* sp. nov. (Formerly the Cat Scratch Disease Bacillus), *Afipia clevelandensis* sp. nov. (Formerly the Cleveland Clinic Foundation Stain), *Afipia broomeae* sp. nov., and three unnamed genospecies. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29: 2450-60.

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

Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001; 14: 177-207.

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

Carithers HA. Cat-scratch disease. An over-view based on a study of 1200 patients. *Am. J. Dis. Child.* 1985; 139: 1124-33.

Childs JE, Ellis BA, Nicholson WL, Kosoy M, Summer JW. Shared vector-borne zoonoses of the old world and new world: home grown or translocated? *Schweiz. Med. Wochenschr.* 1999; 129: 1099-105.

Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins K, Chi B, Yamamoto K, Roberts-Wilson J, Gurfield AN, Abbott RC, Pedersen NC e Koehler JE. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34: 1952-6.

Chomel BB. Cat-scratch disease. *Rev. Sci. Technol.* 2000; 19: 136-50.

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

Ciervo A, Mastroianni CM, Ajassa C, Pinto A, Ciceroni L. Rapid identification of *Bartonella henselae* by real-time polymerase chain reaction in a patient with cat scratch disease. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2005; 53: 75-7.

Comer JA, Diaz T, Vlahov D, Monterroso E, Childs JE. Evidence of rodent-associated *Bartonella* and *Rickettsia* infections among intravenous drug users from Central and East Harlem, New York City. *Am J. Trop. Med. Hyg.* 2001; 65: 855-60.

Comer JA, Flynn C, Regnery RL, Vlahov D, Childs JE. Antibodies to *Bartonella* species in inner-city intravenous drug users in Baltimore, MD. *Arch. Intern. Med.* 1996; 156: 2491-5.

Costa PS, Brigatte ME, Greco DB. Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.* 2005; 100: 853-9.

Daly JS, Worthington MG, Brenner DJ, Moss CW, Hollis DG, Weyant R, Steigerwalt AG, Weaver RE, Daneshvar MI and O'Connor SP. *Rochalimaea elizabethae* sp. nov. Isolated from a patient with endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31: 872-18.

Debré R, Lamy M, Jammet ML, Costil L, Mozziconacci P. La maladie des griffes du chat. *Bull Mem.Soc. Med. Hop.* 1950; 66: 76-9.

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

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

Del Prete R, Fumarola D, Fumarola L, Miragliotta G. Detection of *Bartonella henselae* and *Afipia felis* DNA by polymerase chain reaction in specimens from patients with cat scratch disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2000a; 19: 964-7.

Del Prete R, Fumarola D, Ungari S, Fumarola L, Miragliotta G. Polymerase chain reaction detection of *Bartonella henselae* bacteraemia in an immunocompetent child with cat-scratch disease. *Eur. J. Pediatr.* 2000b; 159: 356-59.

Diniz PP, Maggi RG, Schwartz DS, Cadenas MB, Bradley JM, Hegarty B, Breitschwerdt EB. Canine bartonellosis: serological and molecular prevalence in Brazil and evidence of co-infection with *Bartonella henselae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*. *Vet. Res.* 2007; 38: 697-710

Dolan MJ, Wong MT, Regnery RL, Jorgensen JH, Garcia M, Peters J, Drehner D. Syndrome of *Rochalimaea henselae* adenitis suggesting cat scratch disease. *Ann. Intern. Med.* 1993; 118: 331-6.

Ellis BA, Regnery RL, Beati L, Bacellar F, Rood M, Glass GG, Marston E, Ksiazek TG, Jones D, Childs JE. Rats of the genus *Rattus* are reservoir hosts for pathogenic *Bartonella* species: an old world origin for a new world disease? *The J. Infect. Dis.* 1999; 180: 220-4.

English CK, Wear DJ, Margileth AM, Lissner CR, Walsh GP. Cat-scratch disease: isolation and culture of the bacterial agent. *JAMA.* 1988; 259: 1347-52.

Eremeeva ME, Gerns HL, Lydy SL, Goo JS, Ryan ET, Mathew SS, Ferraro MJ, Holden JM, Nicholson WL, Dasch GA, Koehler JE. Bacteremia, fever, and splenomegaly caused by a newly recognized *Bartonella* species. *N. Engl. J. Med.* 2007; 356: 2381-7.

Finkelstein JL, Brown TP, O'Reilly KL, Wedincamp JJr, Foil LD. Studies on the growth of *Bartonella henselae* in the cat flea (Siphonaptera:Pulicidae). *J. Med. Entomol.* 2002; 39: 915-9.

Florin TA, Zaoutis TE and Zaoutis LB. Beyond cat scratch disease: widening spectrum of *Bartonella henselae* infection. *Pediatrics*. 2008; 121: 1413-25.

Foil L, Andress E, Freeland RL, Roy AF, Rutledge R, Triche PC, O'Reilly KL. Experimental infection of domestic cats with *Bartonella henselae* by inoculation of *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae) feces. *J. Med. Entomol.* 1998; 35: 625-8.

Fournier PE, Lelievre H, Eykyn SJ, Mainardi JL, Marrie TJ, Bruneel F, Roure C, Nash J, Clave D, James E, Benoit-Lemercier C, Deforges L, Tissot-Dupont H, Raoult D. Epidemiologic and clinical characteristics of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* endocarditis: a study of 48 patients. *Medicine* (Baltimore). 2001; 80: 245-51.

Fournier PE, Mainardi JL, Raoult D. Value of microimmunofluorescence for diagnosis and follow-up of *Bartonella* endocarditis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002a; 9: 795-801.

Fournier PE, Robson J, Zeaiter Z, McDougall R, Byrne S, Raoult D. Improved culture from lymph nodes of patients with cat scratch disease and genotypic characterization of *Bartonella henselae* isolates in Australia. *J. Clin. Microbiol.* 2002b; 40: 3620-4.

García-Esteban C, Gil H, Rodríguez-Vargas M, Gerrikagoitia X, Barandika J, Escudero R, Jado I, García-Amil C, Barral M, García-Pérez AL, Bhide M, and Anda P. Molecular method for *Bartonella* species identification in clinical and environmental samples. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46: 776-9.

Giladi M, Kletter Y, Avidor B, Metzkor-Cotter E, Varon M, Golan Y, Weinberg M, Riklis I, Epros M, Slater L. Enzyme immunoassay for the diagnosis of cat-scratch disease defined by polymerase chain reaction. *Clin. Infect. Dis.* 2001; 33: 1852-8.

Goral S, Anderson B, Hager C and Edwards KM. Detection of *Rochalimaea henselae* DNA by polymerase chain reaction from suppurative nodes of children with cat-scratch disease. *Pediatric. Infect. Dis. J.* 1994; 13: 994-7.

Gouriet F, Lepidi H, Habib G, Collart F and Raoult D. From cat scratch disease to endocarditis, the possible natural history of *Bartonella henselae* infection. *BCM Infect. Dis.* 2007; 7: 1-6.

Greenbaum B, Nelson P, Marchildon M, Donaldson M. Hemolytic anemia and hepatosplenomegaly associated with cat scratch disease. *J. Pediatr.* 1986; 108: 428-30.

Hagiwara, MK. Linforreticulose de Inoculação. In: Veronesi. Tratado de Infectologia. São Paulo: *Atheneu*; 2005. 1: 1013-19.

Hansmann Y, DeMartino S, Piémont Y, Meyer N, Mariet P, Heller R, Christmann D and Jaulhac B. Diagnosis of cat scratch disease with detection of *Bartonella henselae* by PCR: a study of patients with lymph node enlargement. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 3800-6.

Hara K, Kajiume T, Kondo T, Sera Y, Kawaguchi H, Kobayashi M. Respiratory complications after haematopoietic stem cell transplantation in a patient with chronic granulomatous disease. *Transfus. Med.* 2009; 19: 105-8.

Herremans M, Vermeulen MJ, Van de Kasstele J, Bakker J, Schellekens JFP, Koopmans MPG. The use of *Bartonella henselae*-specific age dependent IgG and IgM in diagnostic models to discriminate diseased from non-diseased in cat scratch disease serology. *J. Microbiol. Methods.* 2007; 71: 107-13.

Heye S, Matthijs P, Wallon J, Van Campenhoudt M. Cat-scratch disease osteomyelitis. *Skeletal. Radiol.* 2003; 32: 49-51.

Huarcaya E, Maguinã C, Torres R, Rupay J, Fuentes L. Bartonellosis (Carrion's Disease) in the pediatric population of Peru: na overview and update. *Braz. J. Infect. Dis.* 2004; 8: 331:9.

Hulzebos CV, Koetse HA, Kimpen JLL, Wolfs TFW. Vertebral osteomyelitis associated with cat-scratch disease. *Clin. Infect. Dis.* 1999; 28: 1310-12.

Inoue K, Kabeya H, Shiratori H, Ueda K, Kosoy MY, Chomel BB, Boulouis HJ, Maruyama S. *Bartonella japonica* sp. nov. and *Bartonella silvatica* sp. nov.; isolated from *Apodemus* mice in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009 (artigo in press).

Jackson LA, Perkins BA, Wenger JD. Cat-scratch disease in the United States: an analysis of three national databases. *Am. J. Public Health.* 1993; 83: 1707-11.

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

Jensen WA, Fall MZ, Rooney J, Kordick DL, Breitschwerdt EB. Rapid identification and differentiation of *Bartonella* species using a single-step PCR assay. *J.Clin. Microbiol.* 2000; 38: 1717-22.

Johnson G, Ayers M, McClure SCC, Richardson SE, and Tellier R. Detection and identification of *Bartonella* species pathogenic for humans by PCR amplification targeting the riboflavin synthase gene (*ribC*). *J.Clin. Microbiol.* 2003; 41: 1069-72.

Kaschula ROC. Infectious diseases. Paediatric pathology. 3rd ed. Springer, London, United Kingdom. *Inc* C. Berry (ed.), 1996: 729-820.

Kelly P, Rolain JM, Maggi R, Sontakke S, Keene B, Hunter S, Lepidi H, Breitschwedt KT, Breitschwedt EB, Raoult D. *Bartonella quintana* endocarditis in dogs. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12: 1869-72.

Kelly PJ, Meads N, Theobald A, Fournier PE, Raoult D. *Rickettsia felis*, *Bartonella henselae*, and *B. clarridgeiae*, New Zealand. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10: 967-8.

Kelly TM, Padmalayam I, Baumstark BR. Use of the cell division protein *FtsZ* as a means of differentiating among *Bartonella* species. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 1998; 5: 766-72.

Kempf VAJ, Schairer A, Neumann D, Grassi GA, Lauber K, Lebidziejewski M, Schaller M, Kyme P, Wesselborg S and Autenrieth IB. *Bartonella henselae* inhibits apoptosis in Mono Mac 6 Cells. *Cell. Microbiol.* 2005; 7: 91-104.

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

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

Kerkhoff FT, Bergmans AMC, van Der Zee A, Rothova A. Demonstration of *Bartonella grahamii* DNA ocular fluids of a patient with neuroretinitis. *J.Clin. Microbiol.* 1999; 37: 4034-8.

Koehler JE, Glaser CA, Tappero JW. *Rochalimaea henselae* infection. A new zoonosis with the domestic cat as reservoir. *JAMA.* 1994; 271: 531-5.

Koehler JE, Sanchez MA, Garrido CS, Whitfeld MJ, Chen FM, Berger TG, Rodriguez-Barradas MC, LeBoit PE, Tappero JW. Molecular epidemiology of *Bartonella* infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis. *N. Engl. J. Med.* 1997; 337: 1876-83.

Koehler JE, Sanchez MA, Tye S, Garrido-Rowland CS, Chen FM, Maurer T, Cooper JL, Olson JG, Reingold AL, Hadley WK, Regnery RR, Tappero JW. Prevalence of *Bartonella* infections among human immunodeficiency virus-infected patients with fever. *Clin. Infect. Dis.* 2003; 37: 559-66.

Koehler JE, Tappero JW. Bacillary angiomatosis and bacillary peliosis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* 1993; 17: 612-24.

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

Kordick DL, Wilson KH, Sexton DJ, Hadfield TL, Berkhoff HA, Breitschwerdt EB. Prolonged *Bartonella* bacteremia in cats associated with cat-scratch disease patients. *J. Clin. Microbiol.* 1995b; 33: 3245-51.

Kosoy M, Murray M, Gilmore RD Jr, Bai Y, Gage KL. *Bartonella* strains from ground squirrels are identical to *Bartonella washoensis* isolated from a human patient. *J.Clin. Microbiol.* 2003; 41: 645-50.

La VD, Clavel B, Lepetz S, Aboudharam G, Raoult D, Drancourt M. Molecular detection of *Bartonella henselae* DNA in the dental pulp of 800-year-old French cats. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 39: 1391-4.

Lamas C, Curi A, Bóia MN, Lemos ERS. Human bartonellosis: seroepidemiological and clinical features with an emphasis on data from Brazil – A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2008; 103: 221-35.

Lamas C, Rozental T, Favacho A, Bóia MN, Maduro R, Oliveira AP, Lemos ERS. *Bartonella* spp. infections in HIV positive individuals in Rio de Janeiro, Brazil. *Infect. J. Dis.* 2006; 10 (Supl. 1): S176.

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

Lewis DW, Tucker SH. Central nervous system involvement in cat scratch disease. *Pediatrics.* 1986; 77: 714-21.

López CAV; Andraca RA. Bartonelosis: espectro clínico actual de um viejo patógeno. *Med. Int. Mex.* 2008; 24: 217-23.

Maggiore G, Massei F, Bussani R, Ventura A. Bone pain after lymphadenitis. *Bartonella henselae* granulomatous osteitis. *Eur. J. Pediatr.* 1999; 158: 165-6.

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

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

Margolis B, Kuzu I, Herrmann M, Raible MD, Hsi E, Alkan S. Rapid polymerase chain reaction – based confirmation of cat scratch disease and *Bartonella henselae* infection. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2003; 127: 706-10.

Maruyama S, Izumikawa K, Miyashita M, Kabeya H, Mikami T, Yamanouchi H, Sasaki E, Yoshida H, Izumikawa K. First isolation of *Bartonella henselae* type I from a cat-scratch disease patient in Japan and its molecular analysis. *Microbiol. Immunol.* 2004; 48: 103-9.

Massei F, Gori L, Macchia P, Maggiore G. The expanded spectrum of bartonellosis in children. *Infect. Dis. North Am.* 2005; 19: 691-711.

Massei F, Messina F, Gori L, Macchia P, and Maggiore G. High prevalence of antibodies to *Bartonella henselae* among Italian children without evidence of cat scratch disease. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 38: 145-8.

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

Maurin M, Rolain JM, Raoult D. Comparison of in-house and commercial slides for detection by immunofluorescence of immunoglobulin G and M against *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002; 9: 1004-9.

Mehock JR, Greene CE, Gherardini FC, Hahn TW and Krause DC. *Bartonella henselae* invasion of feline erythrocytes in vitro. *Infect. Immun.* 1998; 66: 3462-6.

Metzkor-Cotter E, Kletter Y, Avidor B, Varon M, Golan Y, Ephros M, Giladi M. Long-term serological analysis and clinical follow-up of patients with cat scratch disease. *Clin. Infect. Dis.* 2003; 37: 1149-54.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic. Acids. Res.* 1988; 16: 1215.

Minnick MF, Barbian KD. Identification of *Bartonella* using PCR; genus- and species-specific primer sets. *J. Microbiol. Methods.* 1997; 31: 51-7.

Mogollon-Pasapera E, Otvos Jr L, Giordano A, Cassone M. *Bartonella*: emerging pathogen or emerging awareness? *Int. J. Infect. Dis.* 2009; 13: 3-8.

Mohle-Boetani JC, Koehler JE, Berger TG, LeBoit PE, Kemper CA, Reingold AL, Plikaytis BD, Wenger JD, Tappero JW. Bacillary angiomatosis and bacillary peliosis in patients infected with human immunodeficiency virus: clinical characteristics in a case-control study. *Clin. Infect. Dis.* 1996; 22: 794-800.

Nakajima-Iijima S, Hamada H, Reddy P, and Kakunaga T. Molecular structure of the human cytoplasmic β -actin gene: Interspecies homology of sequences in the introns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1985; 82: 6133-7.

Norman AF, Regnery R, Jameson P, Greene C and Krause DC. Differentiation of *Bartonella*-like isolate at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33: 1797-1803.

Parinaud H. Conjunctivite infectieuse transmise par les animaux. *Ann. d'Oculistique*. 1889; 101: 252-3.

Perkins BA, Swaminathan B, Jackson LA, Brenner DJ, Wenger JD, Regnery RL, Wear DJ. Case 22-1992: pathogenesis of cat-scratch disease. *N Engl. J. Med.* 1992; 327: 1599-1601.

Perkocha LA, Geaghan SM, Yen TS, Nishimura SL, Chan SP, Garcia-Kennedy R, Honda G, Stoloff AC, Klein HZ, Goldman RL. Clinical and pathological features of bacillary peliosis hepatitis in association with human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 1990; 323: 1581-6.

Petersen K, Earhart KC, Wallace MR. Bacillary angiomatosis in a patient with chronic lymphocytic leukemia. *Infection*. 2008; 36: 480-4.

Pitassi LHU, Magalhães RF, Barjas-Castro ML, de Paula EV, Ferreira MRM e Velho PENF. *Bartonella henselae* infects human erythrocytes. *Ultrastruct. Pathol.* 2007; 31: 369-72.

Pons I, Sanfeliu I, Nogueras MM, Sala M, Cervantes M, Amengual MJ and Segura F. Seroprevalence of *Bartonella* spp. infection in HIV patients in Catalonia, Spain. *BMC Infect. Dis.* 2008; 8: 1-6.

Raoult D, Roblot F, Rolain JM, Besnier JM, Loulergue J, Bastides F, Choutet P. First isolation of *Bartonella alsatica* from a valve of a patient with endocarditis. *J.Clin. Microbiol.* 2006; 44: 278-9.

Raoult D, Fournier PE, Drancourt M, Marrie TJ, Etienne J, Cosserat J, Cacoub P, Poinsignon Y, Leclercq P, Sefton AM. Diagnosis of 22 new cases of *Bartonella* endocarditis. *Ann. Intern. Med.* 1996; 125: 646-52.

Regnery RL, Anderson BE, Clarridge JE. 3rd, Rodriguez-Barradas MC, Jones DC, Carr JH. Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30: 265-74.

Relman DA, Loutit JS, Schmidt TM, Falkow S, Tompkins LS. The agent of bacillary angiomatosis: an approach to the identification of uncultured pathogens. *N. Engl. J. Med.* 1990; 323: 1573-80.

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

Reynolds MG, Holman RC, Curns AT, O'Reilly M, McQuiston JH, Steiner CA. Epidemiology of cat-scratch disease hospitalizations among children in the United States. *Pediatric Infect. Dis. J.* 2005; 24: 700-4.

Riess T, Andersson SGE, Lupas A, Schaller M, Schäfer, Kyme P, Martin Jörg, Wälzlein JH, Eehalt U, Lindroos H, Schirle M, Nordheim A, Autenrieth IB and Kempf VAJ. *Bartonella* adhesion A mediates a proangiogenic host cell response. *J. Exp. Med.* 2004; 200: 1267-78.

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

Rolain JM, Gouriet F, Enea M, Aboud M and Raoult D. Detection by immunofluorescence assay of *Bartonella henselae* in lymph nodes from patients with cat scratch disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; 10: 686-91.

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

Rolain JM, Lepidi H, Zanaret M, Triglia JM, Michel G, Thomas PA, Texereau M, Stein J, Romaru A, Eb F and Raoult D. Lymph node biopsy specimens and diagnosis of cat-scratch disease. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12: 1338-44.

Saisongkorh W, Rolain JM, Suputtamongkol Y, Raoult D. Emerging *Bartonella* in Humans and Animals in Asia and Australia. *J Med Assoc Thai.* 2009; 92: 707-31.

Sander A, Berner R, Ruess M. Serodiagnosis of Cat Scratch Disease: response to *Bartonella henselae* in children and review of diagnostic methods. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2001; 20: 392-401.

Sander A, Posselt M, Böhm N, Ruess M, Altwegg M. Detection of *Bartonella henselae* DNA by two different PCR assays and determination of genotypes of strains involved in histologically defined cat scratch disease. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 993-7.

Sander A, Ruess M, Bereswill S, Schuppler M, Steinbrueckner B. Comparison of different DNA fingerprinting techniques for molecular typing of *Bartonella henselae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 2973-81.

Sander A, Zagrosek A, Bredt W, Schiltz E, Piémont Y, Lanz C and Dehio C. Characterization of *Bartonella clarridgeiae* flagellin (FlaA) and detection of anti-flagellin anti-bodies in patients with lymphadenopathy. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 2943-8.

Schwartzman WA, Nesbit CA and Baron EJ. Development and evaluation of a blood-free medium for determining growth curves and optimizing growth of *Rochalimaea henselae*. *J.Clin. Microbiol.* 1993; 31: 1882-5.

Segal BH, Romani L and Puccetti P. Visions & Reflections (Minireview). Chronic granulomatous disease. *Cell Mol. Life Sci.* 2009; 66: 553-8.

Signorini L, Simeone F, Tonegatti L, Colombini P, Cadeo B, Cristini F, Matteoli A and Viale P. Co-infection with Epstein-Barr Virus and *Bartonella henselae* resulting in systemic Bartonellosis. *J. Infect.* 2002; 45: 206-7.

Slhessarenko N, Camargo MCGO, D'auria SRN. Soroprevalência de *Bartonella henselae* em gatos do município de São Paulo. *Ver. Soc. Brás. Méd. Trop.* 1996; 29: 104-11.

Slhessarenko N. Doença da arranhadura do gato: aspectos clínicos – epidemiológicos e laboratoriais em 38 pacientes. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1998.

Spach DH, Kaplan SL. Microbiology, epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis of cat scratch disease: UpToDate 2007, Available at: www.uptodate.com. Accessed 23 October 2007.

Tappero JW, Mohle-Boetani J, Koehler JE, Swaminathan B, Berger TG, LeBoit PE, Smith LL, Wenger JD, Pinner RW, Kemper CA. The epidemiology of bacillary angiomatosis and bacillary peliosis. *JAMA*. 1993; 269: 770-5.

Tsukahara M, Iino H, Ishida C, Murakami K, Tsuneoka H and Uchida M. *Bartonella henselae* bacteraemia in patients with cat scratch disease. *Eur. J. Pediatr*. 2001; 160: 316

Van Audenhove A, Verhoef G, Peetermans WE, Boogaerts M, Vanderberghe P. Autoimmune hemolytic anemia triggered by *Bartonella henselae*: a case report. *Br. J. Haematol*. 2001; 115: 924-5.

Velho PENF, de Souza EM, Cintra ML, de Moraes AM, Uthida-Tanaka AM. Diagnóstico da infecção por *Bartonella* spp: a propósito de um caso de angiomatose bacilar. *An. Bras. Dermatol*. 2006; 81: 349-53.

Velho PENF, Pimentel V, Del Negro GM, Okay TS, Diniz PPVP, Breitschwerdt EB. Severe anemia, panserositis and cryptogenic hepatitis in an HIV patient infected with *Bartonella henselae*. *Ultrastruct. Pathol*. 2007; 31: 373-7.

Vermeulen MJ, Herremans M, Verbakel H, Bergmans AMC, Roord JJ, Van Dijken PJ and Peeters MF. Serological testing for *Bartonella henselae* infections in the Netherlands: clinical evaluation of immunofluorescence assay and ELISA. *Clin. Microbiol. Infect.* 2007; 13: 627-34.

Wear DJ, Margileth AM, Hadfield TL, Fischer GW, Schlagel CJ, King FM. Cat-scratch: a bacterial Infection. *Science*. 1983; 221: 1403-5.

Welch DF, Carroll KC, Hofmeister EK, Persing DH, Robison DA, Steigerwalt AG, Brenner DJ. 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* . 1999; 37: 2598-601.

Wong MT, Thorton DC, Kennedy RC and Dolan MJ. A chemical defined liquid medium that supports primary isolation of *Rochalimaea* (*Bartonella*) *henselae* from blood and tissue specimens. *J.Clin. Microbiol.* 1995; 33: 742-4.

Zeaiter Z, Fournier PE, Greub B, and Raoult D. Diagnosis of *Bartonella* endocarditis by a real-time nested PCR assay using serum. *J.Clin. Microbiol.* 2003; 41: 919-25.

Zeaiter Z, Fournier PE and Raoult D. Genomic variation of *Bartonella henselae* strains detected in lymph nodes of patients with cat scratch disease. *J.Clin. Microbiol.* 2002b; 40: 1023-30.

Zeaiter Z, Liang Z, and Raoult D. Genetic classification and differentiation of *Bartonella* species based on comparison of partial *ftsZ* gene sequences. *J.Clin. Microbiol.* 2002a; 40: 3641-7.

APÊNDICES

DADOS DEMOGRÁFICOS, QUADRO CLÍNICO, LABORATORIAL E DESFECHO DOS PACIENTES DO ESTUDO

Nº pac	Sigla	Material biológico	Sexo	Idade	Doença de base	Quadro clínico	Diagnóstico laboratorial	Antibiótico(s)	Desfecho
1	WSS	Biópsia de pele	M	7	AIDS Peliose hepática	Febre alta persistente com hemoculturas, uroculturas e cultura de LCR negativas	PCR para <i>Bartonella</i> sp positiva em biópsia de pele	Cefalexina	Óbito após 53 dias
2	RAV	Biópsia de gânglio	M	12	Sem doença de base	Adenomegalia cervical	PCR para <i>Bartonella</i> sp positiva em biópsia de gânglio	Cotrimoxazol	Alta após 6 dias
3	BTP	A-sangue B-Biópsia de gânglio	M	5	Sem doença de base	Febre, adenomegalia cervical e infecção de vias aéreas superiores	PCR para <i>Bartonella</i> sp positiva em sangue e biópsia de gânglio	Cotrimoxazol	Alta após 10 dias
4	JJS	Sangue	M	5	Sem doença de base	Febre e adenomegalia axilar. Contato com gato	PCR para <i>Bartonella</i> sp positiva em sangue	Cotrimoxazol	Alta após 5 dias
5	TRCO	Biópsia de gânglio	F	9	Sem doença de base	Febre alta há três meses e adenomegalia cervical	PCR para <i>Bartonella</i> sp positiva em biópsia de gânglio	Claritromicina	Alta após 10 dias
6	CH	Punção de gânglio	F	8	Sem doença de base	Gânglio em pescoço, dor local, sem febre, esplenomegalia Contato com gato	PCR para <i>Bartonella</i> sp positiva em punção de gânglio	Sem antibiótico	Seguimento ambulatorial
7	PA	Biópsia de pele	M	36	AIDS, usuário de drogas injetáveis	Anemia, panserosite, hepatite criptogênica. Lesão angioproliferativa Contato com gatos e cães	PCR para <i>Bartonella</i> sp positiva em biópsia de pele	Cotrimoxazol, Ceftriaxona, Metronidazol	Recuperação e alta. Paciente mudou para outro Estado
8	MF	Sangue	F	14	Sem doença de base	Lesão angioproliferativa	Microscopia eletrônica sugestiva de <i>Bartonella</i> spp. Sorologia: positiva para <i>Bartonella</i> spp. PCR para <i>Bartonella</i> sp negativa	Eritromicina	Seguimento ambulatorial

9	LN	Sangue	F	27	Sem doença de base	Assintomática (descoberta de <i>Bartonella</i> spp em sangue doado a banco de sangue) Mãe da paciente NNM (número 11) Contato com gatos	PCR para <i>Bartonella</i> sp positiva em sangue	Não recebeu	Seguimento ambulatorial
10	ESF	Sangue	F	37	Hepatite C, Transplante hepático,	Febre, anemia crônica, sepse e choque séptico	Sugestivo de <i>Bartonella</i> spp em esfregaço de sangue (Giemsa) PCR para <i>Bartonella</i> sp positiva em sangue	Vancomicina, Clindamicina, Doxicilina	Recuperação do quadro séptico; óbito posterior por complicações do transplante
11	NNM	Sangue	F	3	Síndrome colestática do recém-nascido	Icterícia com predomínio de BD (41,8 mg/dl), hepatoesplenomegalia, plaquetopenia, anemia crônica grave (necessidade de múltiplas transfusões) Contato com gatos	<i>Bartonella</i> spp em microscopia eletrônica (três anos) PCR para <i>Bartonella</i> sp negativa	Eritromicina, Gentamicina, Azitromicina	Alta após tratamento, com melhora da anemia
12	PKS	A-sangue B-Biópsia de gânglio	F	9	Sem doença de base	Febre, dor. Arranhado há três meses por gato	PCR para <i>Bartonella</i> sp positivas em sangue e biópsia de gânglio	Cotrimoxazol Cefalexina	Seguimento ambulatorial
13	MDT	Sangue	F	9	Síndrome convulsiva, microcefalia (sequela de encefalite viral com 1 ano de idade)	Febre há dois meses, adenomegalia axilar e epitroclear (esquerda). Recebeu amoxicilina e cefalexina, sem melhora.	PCR para <i>Bartonella</i> sp positiva em sangue	Após suspeita de DAG recebeu 14 dias de Eritromicina,	Seguimento ambulatorial Recebeu alta do ICr em 2001 (encaminhada neuropediatria da UNIFESP)
14	WVM	Sangue	M	11	Sem doença de base	Febre persistente e hepatoesplenomegalia	Hemocultura positiva para <i>Bartonella</i> spp PCR para <i>Bartonella</i> sp positiva em sangue	Cefotaxima Amicacina	Alta após 3 meses de internação

15	HLS	A-Punção de gânglio B-Biópsia de gânglio C-Sangue	M	12	Doença Granulomatosa Crônica	Gânglio cervical doloroso Sem febre	PCR para <i>Bartonella</i> sp positiva em punção, gânglio e sangue	Cefalexina	Óbito após longa internação
16	ASTG	Sangue	F	6	Sem doença de base	Febre 38-39°C Arranhado por gato há 2 meses	PCR para <i>Bartonella</i> sp positiva em sangue	Cotrimoxazol	Alta após 5 dias
17	MALM	A-Sangue B-Biópsia de gânglio	F	61	Linfoma não Hodgkin	Linfadenopatia inguinal, cervical, temporal e retroauricular Contato com gatos	PCR para <i>Bartonella</i> sp negativa	Não recebeu	Realiza quimioterapia
18	IMF	A-Sangue B-Biópsia de gânglio	F	80	Linfoma não Hodgkin	Pneumonia, derrame pleural, linfadenopatia cervical	PCR para <i>Bartonella</i> sp negativa	Ciprofloxacina	Evoluiu bem da infecção e realiza quimioterapia
19	JCS	Sangue	F	2	Anemia, plaquetopenia, transfusão	Febre, anemia, trombose de veia porta, varizes de esôfago, hiperesplenismo	PCR para <i>Bartonella</i> sp negativa	Cefepime	Melhora do quadro infeccioso, alta hospitalar

PREPARO DE REAGENTES

Blood lysis buffer [10X]

NH₄Cl 1.550 mM

KHCO₃ 100 mM

EDTA pH 7,4 10 mM

Preparo:

NH₄Cl 82,91 g

KHCO₃ 10,01 g

EDTA 0,5M pH 7,4 20 mL

H₂O Milli Q q.s.p. 1.000 mL

EDTA (solução estoque 0,5M - pH 7,4)

EDTA 186,1 g

H₂O MilliQ 800 mL

Agitar, com aquecimento até 45°C. Ajustar o pH para 7,4 com NaOH (10N).

Completar o volume para 1.000 mL. Armazenar em geladeira (4-8°C).

EDTA (solução estoque 0,5M - pH 8)

EDTA 186,1 g

H₂O MilliQ 800 mL

Agitar, com aquecimento até 45°C. Ajustar o pH para 8,0 com NaOH (10 N).

Completar o volume para 1.000 mL. Armazenar em geladeira (4-8°C).

EDTA (solução estoque 0,5M - pH 8,2)

EDTA 186,1g

H₂O MilliQ 800 mL

Agitar, com aquecimento até 45°C. Ajustar o pH para 8,2 com NaOH (10N).

Completar o volume para 1.000 mL. Armazenar em geladeira (4-8°C).

NaOH 10N

NaOH 400 g

H₂O MilliQ 700 mL

Agitar, completar o volume para 1.000 mL. Armazenar em geladeira (4-8°C).

Tris-HCl (Solução 100mM, pH 8,0)

Tris 3,15 g

H₂O Milli Q q.s.p.100 mL

Ajustar o pH para 8,0 com HCl fumegante. Ajustar o volume para 200 mL.

Armazenar em geladeira (4-8°C).

SDS 10% (Duodecil sulfato de sódio)

SDS 10 g

H₂O Milli Q q.s.p.100 mL

Dissolver em banho-maria 56 °C. Não agitar. Armazenar em temperatura ambiente.

Nucleo lysis buffer [10X]

Tris-HCl pH 8,0	100 mM
-----------------	--------

NaCl	4 M
------	-----

EDTA pH 8, 2	20 mM
--------------	-------

Preparo:

Tris-HCl pH 8.0	10 mL
-----------------	-------

NaCl	23,38 g
------	---------

EDTA 0,5 M pH 8,2	4 mL
-------------------	------

H ₂ O MilliQ	100 mL
-------------------------	--------

CaCl₂ 40mM

CaCl ₂	0,147 g
-------------------	---------

H ₂ O Milli Q	q.s.p.25 mL
--------------------------	-------------

Enzima lisozima (20mg/mL)

Lisozima	20 mg
----------	-------

H ₂ O	1,0 MI
------------------	--------

NaCl 6M

NaCl	70,13 g
------	---------

H ₂ O MilliQ	180 mL
-------------------------	--------

Agitar. Completar o volume para 200 mL. Armazenar em geladeira (4-8°C).

Proteínase K (solução a 20mg/mL)

Diluir a Proteinase K (100 mg) em 5 mL em solução contendo:

Tris HCl (100 mM)	10 mM
CaCl ₂ (40 mM)	20 mM
Glicerol	50%

Preparo:

Tris HCl	0,5 mL
CaCl ₂	2,5 ml
Glicerol	50%

Aliquotar e armazenar a -20 °C

Tampão Tris-EDTA (TE)

Tris.HCl 2 M pH 7,6	1 mL
EDTA 0,2 M pH 8	1 mL
H ₂ O Milli Q	q.s.p.200 mL

Tris.HCl 2 M pH 7,6

Tris	242,2 g
H ₂ O MilliQ	800 mL

Ajustar o pH da solução para 7,6 com HCl fumegante. Ajustar o volume para 1000 mL. Armazenar em geladeira (4-8°C).

dNTP (200 µM)

A	100 mM	20 µL
T	100 mM	20 µL
C	100 mM	20 µL
G	100 mM	20 µL
H ₂ O MilliQ	q.s.p.	320 µL

TAE [50X]

Trizma base 2 M	242,28 g
EDTA 0,05 M	18,61 g
Ácido acético glacial	57 mL
H ₂ O MilliQ	800 mL

Agitar, completar volume para 1 L.