



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL NA AMAZÔNIA - UFRA  
INSTITUTO EVANDRO CHAGAS - IEC  
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

**MARCELLA KATHERYNE MARQUES BERNAL**

**Detecção molecular de *Bartonella* spp. no tecido hepático de quirópteros neotropicais**

Belém-PA

2018

**MARCELLA KATHERYNE MARQUES BERNAL**

**Detecção molecular de *Bartonella* spp. no tecido hepático de quirópteros neotropicais**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia da Universidade Federal Rural da Amazônia como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Saúde & Meio Ambiente.  
Orientador: Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira.

Co-orientador: Dr. Alex Junior de Souza de Souza

Belém - PA  
2018

**MARCELLA KATHERYNE MARQUES BERNAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Mestrado em Saúde e Produção Animal: área Sanidade Animal, para a obtenção da defesa da dissertação para o título de Mestre.

Belém, 21 de fevereiro de 2018  
Data da aprovação

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira  
Universidade Federal Rural da Amazônia - Orientador

---

Profa. Dra. Nazare Fonseca de Souza - 1º Examinador  
Universidade Federal Rural da Amazônia

---

Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho - 2º Examinador  
Universidade Federal Rural da Amazônia

---

Dr. Sandro Patroca da Silva - 3º Examinador  
Instituto Evandro Chagas

---

Prof. Dra. Ana Silvia Ribeiro Sardinha - Suplente  
Universidade Federal Rural da Amazônia

“<sup>4</sup>O amor é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso; o amor não trata com leviandade, não se ensoberbece;  
<sup>5</sup>Não se porta com indecência, não busca os seus interesses, não se irrita, não suspeita mal;  
<sup>6</sup>Não folga com a injustiça, mas folga com a verdade;  
<sup>7</sup>Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.”1 Coríntios 13:4-7.

Dedico essa conquista as mães que Deus me concedeu: Itala, Sônia Suely, Karla, Sulamita e Dorinha, são os meus pilares em todos os momentos. Obrigada pela força, para que pudesse concluir mais essa etapa da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Á Deus toda honra e glória, pois sem a Sua presença na minha vida nada conseguiria, nos momentos de escuridão que presenciei nos últimos meses o Senhor foi a minha luz, na fraqueza o Senhor segurou as minhas mãos e nunca as soltou, no desespero o Senhor me trouxe a calma que eu tanto precisava. Obrigada pela sua bondade e misericórdia infinita por mim, e que não há limites para todo esse Amor que me abraça todos os dias quando vejo que estou viva, perdoe-me nos momentos em que fraquejei diante do mais valioso dom que o Senhor me concedeu, a vida.

Agradeço aos meus anjos da guarda, minha família, que no momento que eu pensei em abandonar a minha caminhada, pude sentir abraços e ouvir palavras de apoio. Á minha tia Ítala que mesmo ausente fisicamente, esta todos os dias presentes com o seu amor e lembranças, que me alegram nos intervalos em que descanso. Á minha vó Sulamita pela criação incansável. Á minha tia Suely que mostrou toda dedicação nos últimos 5 meses em que passamos juntas, foram dias cheios de orações, repletos de altos e baixos, mas de muito aprendizado e fortalecimento. Á minha prima Karla que se mostrou sempre prestativa, abdicando de suas tarefas para me acompanhar. Aos meus pais (Dorinha e Marcelo) pelo dom da vida, que me deram várias risadas e conselhos de força para que pudesse me recuperar. Á minha irmã Gabriella que com seu jeito descontraído me trouxe alegria.

Ao Flávio Hernan que se mostrou um verdadeiro companheiro nas madrugadas em que eu não via mais nenhum sentido, esteve do meu lado me dando o seu abraço e acreditando que tudo daria certo depois da tempestade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Washington Pereira que sempre foi como um pai, adotando -me no momento em que bati na sua porta, são anos de convivência, conselhos, choros na e risadas. Sabes o quanto eu lhe admiro e que a nossa parceria possa perdurar por um longo período. Ao meu coorientador Dr. Alex Souza, amigo, que também me adotou e me mostrou o quanto é valoroso se dedicar ao que gosta de forma honesta e correta, lógico que até hoje vou à sala dele pedir conselhos, porque ele já deve ter notado que sou agoniada. Nossos estudos ainda continuarão, porque temos muito que desvendar nesse mundo que é a hepatologia.

Aos meus amigos que ganhei no Instituto Evandro Chagas, e que me acolheram com muita alegria. Mestre André por sempre sorrir ao ver que eu faço “mil coisas ao mesmo tempo”; Dr. Pedro que sempre me arranca risadas com as suas frases um tanto engraçadas, e pelo chocolate quase que diários (eu cobro dele); Kemere (a famosa maninha) que sempre me ajudou no decorrer dos experimentos e com os seus lanches saudáveis; “Desirreté” pelas coxinhas diárias, palavras de alegria (suas piadas não fazem nenhum sentido), pelo sorriso e escrever nos “tubinhos”; Bruno pela alegria descontraída e parceria (as vezes ele me escuta); Luiz por ser sempre responsável; Dickson, Raul, Max, Jocilene, Mônica e Vânia pelos dias compartilhados com café e palavras de apoio.

A minha amiga Dr.a Fernanda Mendes que mesmo distante fisicamente, sempre me deu todo apoio possível e inimaginável em tão pouco tempo que eu a conheço, o que seria de nós duas sem um “Oi amiga...Tudo bem? Como foi o seu dia?”. Aos meus amigos do LABOPAT – UFRA, Laura que sempre me repassou a sua confiança; Sara Letícia que somos tão verdadeiras juntas que não tem o porque esconder o quanto nos gostamos; Karina que me em ouve e esta me devendo “canudinhos”; Geice que sempre se mostrou muito prestativa e que eu invejo o seu almoço; Márcio que chegou na UFRA com todo o seu conhecimento sobre Patologia.

Agradeço a todos que contribuíram para que esse sonho fosse possível de se realizar, ajudando de forma direta e indireta. Todos foram fundamentais para o desenvolvimento do trabalho.

## RESUMO

O gênero *Bartonella* é composto por bacilos gram-negativos que apresentam tropismo por eritrócitos e células endoteliais, com infecção já descrita em animais das ordens: Rodentia, Lagomorpha, Carnivora, Artiodactyla, Eulipotyphla e Chiroptera. A infecção pela bactéria pode estar associada à linfadenite, endocardite, angiomatose bacilar e peliose hepática. Treze espécies de *Bartonella* são tidas como zoonóticas e, os quirópteros, considerados como potenciais reservatórios do agente. Nesse sentido, objetivou-se detectar molecularmente a ocorrência de *Bartonella* spp. em fígados de morcegos neotropicais. Foram analisadas 316 amostras de fígados de quirópteros, pertencente às famílias Molossidae, Phyllostomidae e Vespertilionidae distribuídos em 21 gêneros, provenientes do bioma de mata Atlântica, do Estado de São Paulo, para amplificação parcial do gene *gltA* do gênero *Bartonella* spp. por reação em cadeia da polimerase (PCR). Amostras obtidas de dois morcegos (0,6%) da espécie *Glossophaga soricina* do município de Franca foram positivas por PCR. Os amplicons foram sequenciados e as sequências consenso foram posteriormente alinhadas com sequências nucleotídicas representativas do gênero *Bartonella* para análise filogenética. A análise filogenética indicou que as sequências agruparam em um clado próximo a sequência de *Bartonella* sp. detectada em morcego da espécie *Glossophaga soricina* coletada no bioma de Cerrado, no Estado do Tocantins, Brasil.

**Palavras-chave:** Morcegos neotropicais; Fígado; *Bartonella* spp.

## ABSTRACT

The genus *Bartonella* is composed of gram-negative bacilli that are used by tropism by erythrocytes and endothelial cells, Rodentia, Lagomorpha, Carnivora, Artiodactyla, Eulipotyphla and Chiroptera. Bacterial infection may be associated with lymphadenitis, endocarditis, bacillary angiomatosis and hepatic peliosis. Thirteen species of *Bartonella* are considered as zoonotic and, the chiroptera, as potential reservoirs of the agent. In this sense, it was aimed to detect the occurrence of *Bartonella* spp. in livers of neotropical bats. A total of 316 livers from chiroptera livers belonging to the families Molossidae, Phyllostomidae and Vespertilionidae were analyzed in 21 genera from the Atlantic forest biome of the State of São Paulo for partial amplification of the *gltA* gene of the genus *Bartonella* spp. by polymerase chain reaction (PCR). Samples obtained from two bats (0.6%) of the species *Glossophaga soricina* from the municipality of Franca as positive by PCR. The amplicons were sequenced and as consensus sequences were aligned with representative nucleotide sequences of the genus *Bartonella* for phylogenetic analysis. A phylogenetic analysis indicated that as sequences clustered in a clade near the sequence of *Bartonella* sp. detected in bat of the species *Glossophaga soricina* collected without Cerrado biome, in the State of Tocantins, Brazil.

**Keywords:** Neotropical bats; Liver; *Bartonella* spp.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	<b>Pg.</b>
<b>Figura 1</b> - Soldados alemães em uma trincheira, verificando manualmente piolhos e ovos de <i>Pediculus humanus</i> em suas roupas.	<b>15</b>
<b>Figura 2</b> - Estruturas de superfície de <i>Bartonella</i> . Micrografia eletrônica de transmissão de <i>B. henselae</i> (A) pilado e flagelado <i>B. clarridgeiae</i> (B). As barras de escala correspondem para 1 ~ 1 µm	<b>17</b>
<b>Figura 3</b> - As colônias suspeitas de <i>Bartonella</i> isoladas de <i>Ozotona curzonizante</i> (OC19QH) foram cultivadas em agar de tripsina com 5% de sangue de ovelha defibrável. A: Colônia de cultura primária no 13º dia; B: colônia de subcultura no 5º dia.	<b>17</b>
<b>Figura 4</b> - Ciclo da <i>Bartonella hensale</i> spp.	<b>19</b>
<b>Figura 5</b> - Transmissão por vetor invertebrado (a), as bartonelas colonizam o nicho primário (b) e transporte para o endotélio vascular (c). Do nicho primário, as bactérias são semeadas na corrente sanguínea (d), onde invadem eritrócitos e reintroduzir o nicho primário. Após uma replicação limitada dentro do glóbulo vermelho (e), eles persistem no nicho intraeritrocítico (f) competente para transmissão por um artrópode de sangue (g).	<b>20</b>
<b>Figura 6</b> - Deformação de eritrócitos visto por microscopia eletrônica de varredura. (a) Grupos de bactérias e (b) bactéria solitária ligada a indentações. (c a e) poços profundos que resultam de bactérias que se empurram para dentro da membrana dos eritrócitos. (f) Membrana do eritrócito aparentemente puxado para cima do citoesqueleto e torcido.	<b>22</b>
<b>Figura 7</b> - Distribuição mundial de espécies de <i>Bartonella</i> spp.	<b>24</b>
<b>Figura 8</b> - Árvore filogenética do gênero <i>Bartonella</i> inferida pelo método de Máxima verossimilhança, baseada em sequências nucleotídicas parciais (243 pb) do gene <i>gltA</i> . As sequências estão identificadas pelo código de acesso Genbank, identificação das espécies/isolados, hospedeiros e procedência geográficas. As Amostras positivas do presente estudo estão destacadas (●) e os ramos que contém sequências obtidas outros de quirópteros estão marcados em vermelho. Uma sequência de <i>Brucella abortus</i> (NC006932) foi utilizada como grupo externo. Valores de <i>bootstrap</i> > 70 estão expressos nos nós. Barra representa substituições nucleotídicas por sítio.	<b>37</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Espécies de <i>Bartonella</i> , seus hospedeiros e as doenças causadas em seres humanos.	<b>Pg.</b> <b>26</b>
<b>Tabela 2</b> - Morcegos neotropicais distribuídos em famílias, espécies e sexo.	<b>32</b>

## SUMÁRIO

	Pg.
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>14</b>
2.1 Histórico da <i>Bartonella</i> spp.....	14
2.2 Taxonomia e características microbiológicas da <i>Bartonella</i> spp.:.....	16
2.3 Ciclo de transmissão da bartonelose.....	18
2.4 Patogenicidade da <i>Bartonella</i> spp.....	21
2.5 Aspecto clínico - epidemiológico.....	23
2.6 Diagnóstico.....	27
2.7 Quirópteros brasileiros.....	29
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>31</b>
3.1. Objetivo geral.....	31
3.2. Objetivos específicos.....	31
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
4.1 Animais utilizados.....	32
4.2 Testes moleculares.....	33
4.2.1 Extração do DNA.....	33
4.2.2 Amplificação da <i>gltA</i> .....	33
4.2.3 Análise dos produtos amplificados.....	34
4.2.4 Sequenciamento nucleotídico e análise filogenética.....	34
4.3 Análise estatística.....	35
4.4 Considerações bioéticas.....	35
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>44</b>
ANEXO 01.....	53
ANEXO 02.....	55
ANEXO 03.....	56

## 1 INTRODUÇÃO:

As relações hospedeiro-parasita constituem um caso particular das relações alelobiótica, que implica em um processo adaptativo entre as espécies envolvidas, tanto que animais podem ser potenciais hospedeiros assintomáticos para diversas infecções, e o ser humano ao entrar em contato com esse ambiente de ciclo enzoótico pode se infectar, influenciando, deste modo, o grau epidemiológico da enfermidade (CHENG, 1970).

A fauna silvestre é constituída por hospedeiros bem adaptados a diversos agentes virais, bacterianos, fúngicos e parasitários e, neste sentido, animais silvestres podem ser reservatórios e fonte de infecção para os seres humanos e animais domésticos (CUBAS, 1996).

Fatores como a introdução do homem no ambiente silvestre, desequilíbrio ambientais, migração de hospedeiros e vetores, e exposição de hospedeiros suscetíveis podem contribuir para emergência ou reemergência de doenças zoonóticas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Dentre da mastofauna, os quirópteros, comportam algumas bactérias que são importantes na epidemiologia de doenças zoonóticas e enzoóticas, dentre elas bactérias do gênero *Bartonella* spp. (KOSOY et al., 2010; LIN et al., 2012), já identificada em morcegos das famílias Phyllostomidae, Molossidae, Mormoopidae, Noctilionidae, Vespertilionidae e Pteropodidae (MUHLDORFER, 2012).

O gênero *Bartonella*, é composto por bacilos gram-negativos pertencentes ao subgrupo alfa-2 da classe Proteobacteria que apresentam tropismo por eritrócitos e células endoteliais (ANGELAKIS; RAOULT, 2014; OKARO et al., 2017). Entre as 45 espécies de *Bartonella* reconhecidas, a grande maioria é descrita em animais pertencentes às ordens Rodentia (ratos, camundongos e esquilos), Lagomorpha (coelhos), Carnívora (raposas, cães, coiotes, gatos, guaxinins e pumas), Artiodactyla (bovinos, cervos, camelos), Eulipotyphla (toupeiras) e Chiroptera (morcegos) (SAISONKORH et al., 2009; OKARO ET AL., 2017).

Em seres humanos, 13 espécies zoonóticas ou potencialmente zoonóticas de *Bartonella* estão associadas a síndromes com manifestações clínicas variadas, incluindo a “Doença da arranhadura do gato” e linfadenite causadas por *B. henselae* e *B. clarridgeiae* ou quadros sistêmicos de febre associada à bacteremia persistente (*B. rochalimae*, *B. henselae*, *B. quintana*, *B. tamiiae*), a febre das trincheiras (*B. quintana*), febre de Oroya (*B. bacilliformis*), neurorretinite (*B. grahamii*), endocardite (*B. alsatica*, *B. elizabethae*, *B. henselae*, *B. koehlerae*, *B. mayotimonensis* e *B. vinsonii*) ou lesões angioproliferativas como a angiomatose

bacilar/peliose hepática (*B. henselae* e *B. quintana*) e verruga peruana (*B. ancashensis*, *B. bacilliformis*) (OKARO et al., 2017).

Os reservatórios e vias de transmissão de muitas espécies de *Bartonella* permanecem indeterminados, no entanto, já foi demonstrado na infecção natural e experimentalmente que alguns vetores artrópodes como pulgas, piolhos, mosquitos, moscas hematófagas e carrapatos participam no ciclo de transmissão da infecção em animais, o que sugere que esses também são potenciais dispersores do patógeno para seres humanos (BREITSCHWERDT, 2017).

Morcegos são reservatórios de *B. mayotimonensis*, *B. naantaliensis* (OKARO et al., 2017), sendo a espécie *B. mayotimonensis* também um agente causador de endocardite em humanos (LIN et al., 2010; ANGELAKIS; RAOULT, 2014; OKARO et al., 2017).

Na América latina, isolados de *Bartonella* spp. foram até então identificados em morcegos na Guatemala (BAI et al., 2011), Peru (BAI et al., 2012) e Argentina (CICUTTIN et al., 2017), incluindo morcegos hematófagos. Recentemente, os primeiros isolados de *Bartonella* spp. em quirópteros no Brasil foram caracterizados em morcegos capturados nos Estados do Paraná, Pará e Tocantins e apresentaram relações filogenéticas com isolados de *Bartonella* spp. previamente detectados na América latina (IKEDA et al., 2017).

Estudos sobre esses mamíferos voadores ainda deve ser realizado, pois pouco se sabe sobre a exploração de seus nichos, distribuição geográfica e a sua capacidade em potencial para albergarem esta proteobactéria (SAISONGKORH et al., 2009), além de identificar a possibilidade de vetoração de possíveis espécies de *Bartonella* que tenham caráter zoonótico (OKARO et al., 2017).

Devido à escassez de estudos sobre o tema e a exponencial relevância que o gênero *Bartonella* tem apresentado como um agente causador de doença na medicina humana e veterinária, pesquisas relacionados à avaliação molecular desta infecção em reservatórios animais, incluindo morcegos, justificam-se pela contribuição para melhor caracterização da distribuição geográfica, da variabilidade genética da bactéria e seus hospedeiros, além das características eco-epidemiológicas da doença nestes animais, que representam potenciais fontes de infecção para seres humanos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico da *Bartonella* spp.

Um dos primeiros registros que relatam a presença da bartonelose data de relíquias encontradas no “Império Inca”, que retratam características da “doença da verruga peruana”, tanto que posteriormente com estudos na área da paleontologia molecular puderam afirmar que tais achados eram referentes a infecções por *B. bacilliformis* (SCHULTZ, 1968).

O segundo achado histórico da doença se deu pela análise do DNA, realizada recentemente, que foi extraído da polpa dentária de soldados de Napoleão Bonaparte em um túmulo lituano datado de 1812 evidenciando a presença de *B. quintana* (FOURNIER et al., 2015).

Infecções acarretadas pela *Bartonella* spp., foram reportadas sobretudo nas grandes guerras mundiais. Tanto que até hoje se suspeita que a "febre de cinco dias" em 1800 na literatura da medicina russa e a febre da Moldávia da na guerra russo-turca de 1877 foi provavelmente causada pela mesma espécie de bactéria da “febre das trincheiras” em 1920 (BYAM; LLOYD, 1920; ANSTEAD, 2016).

Então, durante a primeira guerra mundial, uma enfermidade designada como “febre das trincheiras” acometeu cerca de meio milhão de soldados que apresentaram sinais de endocardite, mialgia, dor óssea, febre e cefaleia na região retro-orbital, incapacitando os soldados a continuar nos campos de batalha (VENNING, 1919).

Naquela circunstância, a doença foi atribuída à infecção por *Rickettsia* transmitida por piolhos, tanto que pesquisadores da época acreditavam que era preciso “Efetuar pesquisas para encontrar a causa e a cura da febre da trincheira” (ANSTEAD, 2016), porém apenas estudos subsequentes confirmaram a participação de *B. Quintana* como o verdadeiro agente etiológico da febre das trincheiras (Figura 1) (VENNING, 1919; ANSTEAD, 2016; OKARO et al., 2017).

Nesse pós-guerra a enfermidade ainda foi vista na Polônia e era comum entre as tropas alemãs na Frente Oriental durante a segunda guerra mundial em 1939 (ZDRODOVSKII, 1960). E depois desse evento a “febre das trincheiras” ainda foi relatada em casos esporádicos na Polônia, Rússia, Etiópia, México e China (VINSON, 1966).

**Figura 1** - Soldados alemães em uma trincheira, verificando manualmente piolhos e ovos de *Pediculus humanus* em suas roupas.



**Fonte:** Anstead, 2016.

Nos 1980, a infecção por *Bartonella* spp. foi descrita em pacientes imunossuprimidos, com HIV e moradores de rua que apresentavam febre e endocardite (OKARO et al., 2017), representando um novo grupo que é altamente suscetível a infecção por *Bartonella* spp. (ANSTEAD, 2016). Nessa mesma década várias espécies e subespécies foram descobertas, juntamente, com o aumento de reservatórios e vetores (BREITSCHWERDT; KORDICK, 2000).

Wesslen et al. (2001), avaliaram que em 1992, 16 suecos tiveram mortes cardíacas de forma inexplicada, que posteriormente identificaram por testes moleculares que tal miocardite foi acometida por *Bartonella* spp. Nesta mesma época, Noguchi e Battistini (1926), registraram a primeira ocorrência *B. bacilliformis*, causador da “Febre de Oroia” no Peru que se manifesta com anemia, verrugas, nódulos altamente vascularizados, tal enfermidade esta restrita a região da Cordilheira dos Andes, devido ao seu vetor.

E em 1999, habitantes na região dos Andes, no Peru, mostraram uma taxa de exposição de 12% a *B. quintana*, a primeira evidência deste patógeno na América do Sul (RAOULT et al., 1999). Somando a *B. bacilliformis*, transmitida pelo mosquito *Lutzomyia verrucarum* causadora da enfermidade conhecida como “Doença do Carrión”, que dizimou, aproximadamente, 7000 ferroviários, com sinais de febre, linfadenopatia, icterícia, cefaleia, anemia hemolítica e erupções cutâneas (MAGUINA; COTUZZO, 2000). Hoje se sabe que essa enfermidade é endêmica nas áreas do Peru, Colômbia e Equador (OKARO, 2017).

## 2.2 Taxonomia e características microbiológicas da *Bartonella* spp.

A *B. Quintana* causadora da “febre das trincheiras” foi isolada pela primeira vez em 1961, por William Vinson da Universidade de Harvard e Henry Fuller do Walter Reed Army Institute of Research, permitindo verificar a susceptibilidade ao teste de antibiograma (ANSTEAD, 2016).

Posteriormente, Vinson et al. (1969) realizando seus estudos microbiológicos, infectaram voluntários com isolados de bactérias in vitro, produzindo a febre das trincheiras e finalmente cumprindo os postulados de Koch (VISON et al., 1969). Por causa disso esse agente etiológico poderia ser cultivado, e devido as suas características morfológicas e físico-químicas, este microorganismo foi classificado no gênero *Rochalimaea* em 1961 (KRIEG, 1961).

Então, Brenner et al. (1993) propuseram que as espécies de bactérias *Rochalimaea* fossem unidas as do gênero *Bartonella*, tanto que resultou em uma reclassificação que retirou a família Bartonellaceae da ordem Rickettsiales. Porém, Birtles et al. (1995) sugeriram a unificação do gênero *Grahamella* ao da *Bartonella*, havendo a inserção de cinco novas espécies: *B. talpae*, *B. grahamii*, *B. peromysci*, *B. doshiae* e *B. taylorii*.

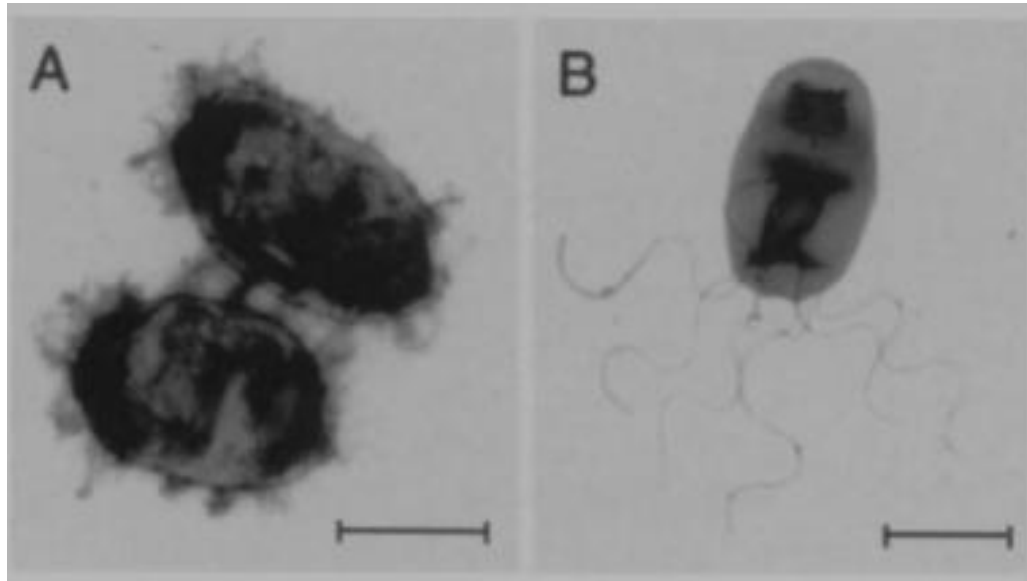
E no decorrer dos anos novas espécies de *Bartonella* foram sendo isoladas de diversos hospedeiros, como *B. clarridgeiae*, *B. koehlerae* (DROZ et al., 1999) de gatos domésticos, *B. tribocorum* de roedores silvestres (HELBER et al., 1998) e *B. alsatica* de coelhos selvagens (HELBER et al., 1999). Deste modo, pode se verificar que ainda há muitas espécies de *Bartonella* a serem descritas, assim como, os seus hospedeiros, aumentando as bactérias que constituem a família Bartonellaceae (OKARO et al., 2017).

A taxonomia de *Bartonella* está intimamente relacionada para os gêneros *Brucella*, *Rhizobium* e *Agrobacterium*, pelas suas características morfológicas e físico-químicas (REGNERY; TAPPERO, 1995). Atualmente, se conhece cerca de 45 espécies de *Bartonella*., dentre elas 13 são hospedeiro em seres humanos (OKARO et al., 2017).

Todas as bactérias deste gênero são bacilos gram-negativos ou coccobacilos, verifica-se que algumas espécies apresentam flagelos como a *B. bacilliformes* e *B. Clarridgeiae* (Figura 2), além de estruturas similares a fimbrias foram observadas em *B. tribocorum* e pili do *B. hensale* (Figura 2), tais características facilitam na infecção em seus hospedeiros (BREITSHWERDT; KORDICK, 2000). O tamanho bacteriano tem menos de 3 µm de largura, com a maioria das células medindo 0,5 µm x 1,0 µm (REGNERY; TAPPERO, 1995).



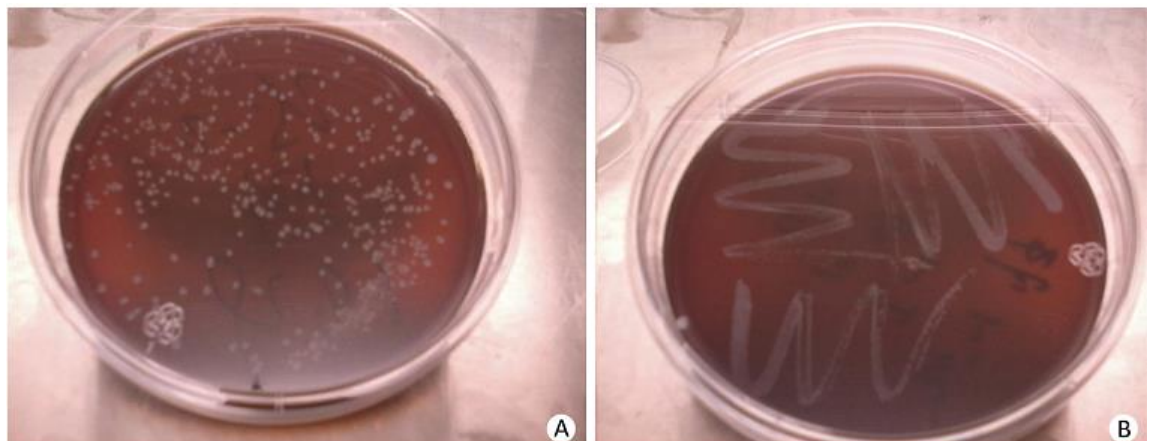
**Figura 2-** Estruturas de superfície de *Bartonella*. Micrografia eletrônica de transmissão de *B. henselae* (A) pilado e flagelado *B. clarridgeiae* (B). As barras de escala correspondem para 1 ~ 1 µm.



**Fonte:** Andersson; Dehion, 2000.

São bactérias catalases, ureases, oxidase e nitrato redutase negativa (HENSEL; STALER, 1995; OKARO et al., 2017), e aeróbicas que levam de 5 a 45 dias para formar colônias visíveis no meio enriquecido por sangue, pois são microorganismos dependente de hemina (BREITSHWERDT; KORDICK, 2000) e hemotrópicos (ANGELAKIS; RAOULT, 2014). As colônias são tipicamente pequenas (1-3 mm de diâmetro) e variam de translúcido a opaco, em uma cor branca creme. A morfologia pode exibir um produto seco para fase mucóide (Figura 3) (REGNERY; TAPPERO, 1995).

**Figura 3 -** As colônias suspeitas de *Bartonella* isoladas de *Ozotona curzonizante* (OC19QH) foram cultivadas em agar de tripsina com 5% de sangue de ovelha defibravel. A: Colônia de cultura primária no 13° dia; B: colônia de subcultura no 5° dia.



**Fonte:** Xiang et al. (2015).

### 2.3 Ciclo de transmissão da bartonelose

No século XX, as contribuições feitas pelas infecções ocasionadas pela *Bartonella* spp., que está dentro do grupo conhecido como “as doenças infecciosas emergentes”, elucidaram o seu comportamento biológico em uma grande variedade de hospedeiros, já que incluem diversas espécies de animais silvestres e o ser humano (BREITSHWERDT; KORDICK, 2000; BREITSCHWERDT, 2017).

O hospedeiro é um reservatório competente, a partir do qual um o vetor artrópode pode se infectar e as bactérias podem ser transmitidas para outros hospedeiros suscetíveis. Nesse sentido, numerosas espécies de *Bartonella* podem infectar um variedade de hospedeiros mamíferos domésticos e selvagens (REGNERY; TAPPERO, 1995).

Quanto a hospedeiro animal, o gênero *Bartonella* já foi isolado de roedores (CHOMEL et al., 1996), leões, lincos, coiotes, raposas, alces, cervo (GURFIELD et al., 1996), gatos e cachorros domésticos (BREITSHWERDT; KORDICK, 2000), bovinos (CHANG et al., 2000). Animais de estimação representam um grande reservatório de espécies *Bartonella* spp. (CHOMEL et al., 2006).

Ainda nesse contexto, pode-se exemplificar alguns hospedeiros e espécies de *Bartonella*: *B. doshiae*, *B. grahamii* e *B. taylorii* isoladas de *Microtus agrestis*, *B. talpae* de *Clethrionomys glareolus* (BREITSHWERDT; KORDICK, 2000), e *Bartonella* spp. em *Miniopterus* sp. (ISMAIL et al., 2010).

E foram isoladas, *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, *B. vinsonii* subsp. *berhoffii*, *B. merieuxii* e *B. rochalimae* em *Canis familiares*, *B. tamiae*, *B. mayotimonensis*, *B. ancashi* em humanos (ANGELAKIS; RAOULT, 2014). Lin et al. (2010) consideraram que qualquer espécie de *Bartonella* encontrada em animais pode infectar os seres humanos, porém deve ser considera o grau de morbidade e mortalidade que pode causar.

Cada espécie é altamente adaptada ao hospedeiro e ao reservatório, tanto que geralmente causam uma bacteriemia intraeritrocitária duradoura, dependendo da relação hospedeiro - espécie - específico (DEHIO; SANDER, 2003).

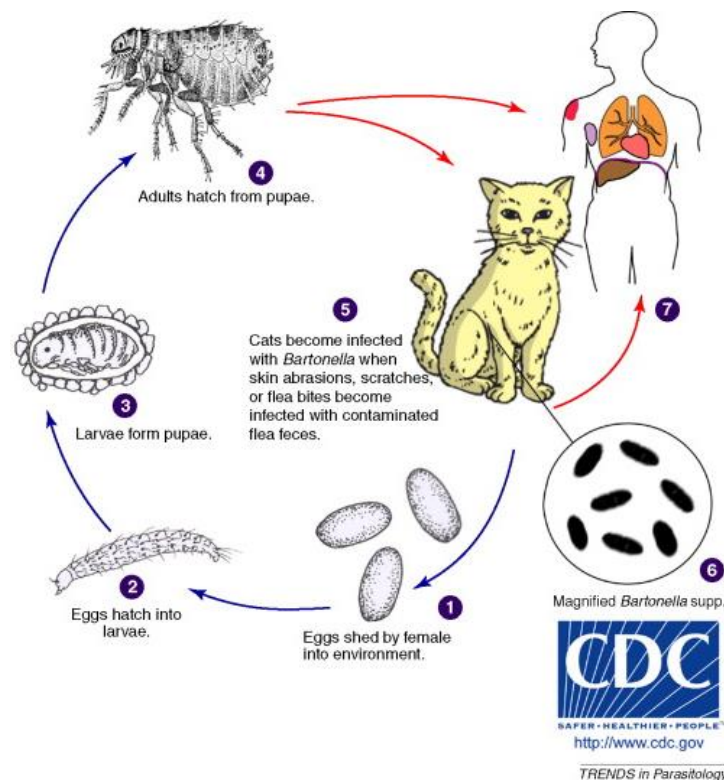
As bartoneláceas causam infecção persistente em seus hospedeiros, porém o período da incubação da infecção ainda esta indeterminado, notando certa variação de espécie de animal para animal ou, até mesmo dentro da mesma espécie animal, tal variação pode ser influenciada pelo estado imunológico e idade em que o animal é infectado (BREITSHWERDT; KORDICK, 2000).

Sabe-se que esta bactéria é intracelular e altamente adaptada aos mecanismos de defesa do organismo, além de haver a possibilidade de co-infecção por espécies diferentes de *Bartonella* (HELBER et al., 1999). No hospedeiro, esta proteobacteria, tem como habitat o intestino, sangue e medula óssea (OKARO et al., 2017).

Sua transmissão ocorre através de vetores invertebrados (HIRSH; ZEE, 2012), mas ainda há certo desconhecimento quanto a sua vetoração (Figura 4). Porém, alguns registros já foram feitos em piolho (ROUX; RANOULT, 1999), carrapatos (WELCH et al., 1999), pulgas (HIGGINS et al., 1996), além do que, a infecção por fômites já foi demonstrada como possível via de transmissão (HIRSH; ZEE, 2012; BREITSCHWERDT, 2017). A capacidade dessa bactéria em ser transmitida através de artrópodes, tem facilitado a sua dispersão e sua sobrevivência (OKARO et al., 2017).

Por exemplo, a *B. bacilliformis* é vetorada pelo *Lutzomia* sp., *B. quintana* pelo piolho da espécie *Pediculus humanus*, *B. henselae* é transmitida entre gatos por meio da pulga *Ctenocephalides felis*, *B. vinsonii* por ácaros *Trombicula microti*, porém o caso da doença conhecida como “Doença da arranhadura do gato” (DAG) causada pela *B. henselae* esta associada a própria lesão que o felino pode produzir em um hospedeiro susceptível (BATTERMAN et al., 1995).

**Figura 4** - Ciclo da *Bartonella henselae* spp.

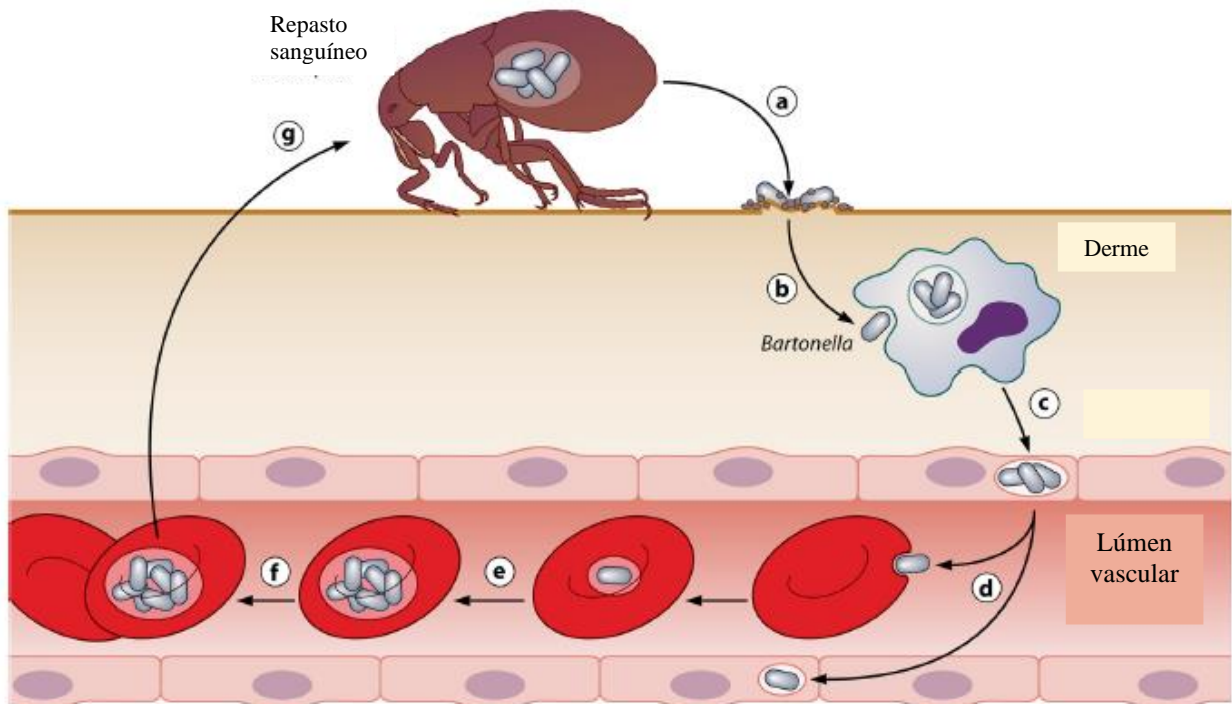


Fonte: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov).

Pressupõem que as pulgas desempenham um papel primordial na transmissão da doença, sendo recomendado o controle desses ectoparasitas, sobretudo em pacientes imunodeprimidos, os quais já foram detectados nesses indivíduos e em seus animais de estimação (BREITSHWERDT; KORDICK, 2000).

Estudos realizados por Chomel et al. (1996) sugerem que transmissão mecânica pode ocorrer através da ingestão, escarificação da pele ou contato conjuntival das fezes dos ectoparasitas infectados por *Bartonella* spp. estes vetores se tornam infectados através do repasto sanguíneo em animal positivo para tal bactéria. (Figura 5). Há relatos, também, da transmissão através da inoculação de matérias contaminadas ou, a partir de lesões por traumas sofridos de animais infectados (BREITSCHWERDT, 2017).

**Figura 05** - Transmissão por vetor invertebrado (a), as bartonelas colonizam o nicho primário (b) e transporte para o endotélio vascular (c). Do nicho primário, as bactérias são semeadas na corrente sanguínea (d), onde invadem eritrócitos e reintroduzir o nicho primário. Após uma replicação limitada dentro do glóbulo vermelho (e), eles persistem no nicho intraeritrocítico (f) competente para transmissão por um artrópode de sangue (g)



**Fonte:** Adpatado de Harms; Dehlo, 2012.

Além disso, Breitshwerdt e Kordick (2000) sugerem que as diferentes espécies de *Bartonella* apresentam preferência vetorial, e deste modo, influenciaria na infecção de hospedeiro específico, por exemplo, *B. henselae* e *B. clarridgeiae* foram isoladas em gatos, *B. quintana* em humanos, *B. vinsonii berkhoffi* em canídeos domésticos e selvagens, tanto que,

quando o animal se infecta por uma espécie de *Bartonella* não habitual, não desenvolve bacteremia.

Kosoy et al. (1998) estudaram isolados de *Bartonella* spp. em embriões em ratos infectados naturalmente, e puderam sugerir uma infecção via transplacentária, propondo que a questão hospedeiro espécie-específico poderia ser explicada pelas diferenças anatômicas de cada placenta segundo a espécie animal.

## **2.4 Patogenicidade da *Bartonella* spp.**

As bartoneláceas geram respostas do sistema imunológico tanto celular quanto humoral em indivíduos infectados, os anticorpos, podem ser detectados em torno de uma semana, porém tem sido observado que não há uma relação nos títulos de anticorpos e a manifestação de bacteremia (HIRSH; ZEE, 2012).

Segundo Breitschwerdt e Kordick (2000) a manifestação da bacteremia está relacionada na relação hospedeiro espécie-específico para determinada espécie de *Bartonella*, conforme descrito em canídeos infectados experimentalmente por *B. henselae*.

Para Kitchell et al. (2000), os sinais clínicos em canídeos e seres humanos infectados por *Bartonella* spp. apresentavam semelhanças, pois em ambos se observou endocardite multifocal, linfadenite granulomatosa, rinite granulomatosa e hepatite.

Assim, verifica-se que mais pesquisas sobre a relação da espécie da Bartonellaceae e a sintomatologia de seus hospedeiros, ainda devem ser verificadas para futuras considerações (NGELAKIS; RAOULT, 2014).

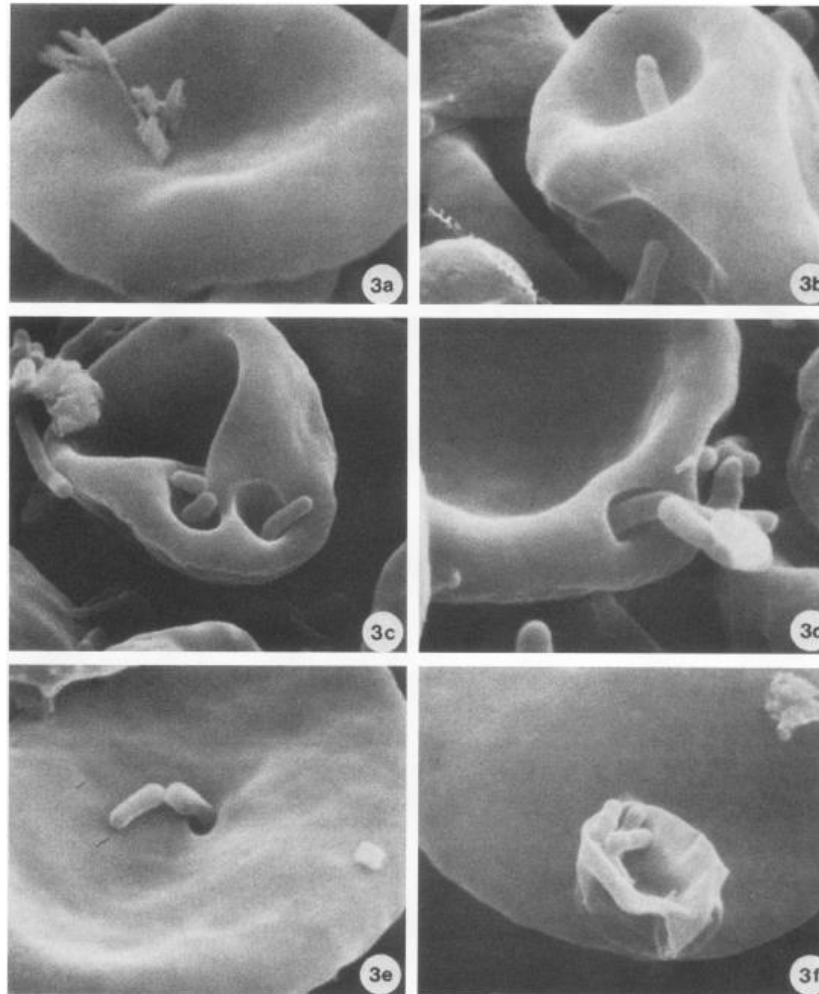
O gênero *Bartonella* foi recentemente considerado como um dos principais agentes etiológicos de causador de endocardite em seres humanos (FOURNIER et al., 2010). Estudos histopatológicos de amostras cardíacas mostraram processo inflamatório, fibrose e calcificação do tecido valvar, associadas à infecção pela bactéria (LEPIDI et al., 2000).

Em sua patogênese se nota que após a infecção, as bartoneláceas, invadem o sistema inato do hospedeiro, pois os receptores do tipo toll, que são proteínas transmembrânicas do tipo I, não conseguem detectar os lipopolissacarídeos exterior da membrana das bactérias, resultando em atividade endotóxica por estes microrganismos (ZHRINGER et al. 2004; OKARO et al., 2017).

Deste modo, invadem as células endoteliais, que é o nicho primário, e a circulação sanguínea (Figura 6), já que são parasitas intraeritrocitários (OKARO et al., 2017). A invasão em eritrócitos resulta em um longo período bacteremia intraeritrocitária e formação de lesões

angioproliferativas. Além do que, a doença pode causar colonização do tecido induzindo a angiogênese, que é um processo patológico que atingem capilares ou vasos (RISAU, 1997).

**Figura 6** - Deformação de eritrócitos visto por microscopia eletrônica de varredura. (a) Grupos de bactérias e (b) bactéria solitária ligada a indentações. (c a e) poços profundos que resultam de bactérias que se empurram para dentro da membrana dos eritrócitos. (f) Membrana do eritrócito aparentemente puxado para cima do citoesqueleto e torcido.



**Fonte:** Benson et al., 1986.

De acordo com Hirsh e Zee (2012), os mecanismos patogênicos estão muito associados à espécie da *Bartonella*. e a sua forma de vetoração, por exemplo, enquanto a *B. quintana* e a *B. henselae* estão associadas às lesões angioproliferativas (angiomatose bacilar), pois induzem aos eritrócitos a modificarem o seu citoesqueleto, na “Doença da arranhadura do gato” são observadas lesões ulcerativas e vesículas na pele, linfadenite, febre, cefaleias, conjuntivite palpebral, meningite, encefalite, púrpura trombocitopênica e lesões osteolíticas.

Outro aspecto patogênico é que a infecção por bartoneláceas pode estimular a angiogênese pela indução da síntese de proangiogênicos como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), ocasionando proliferação de células endoteliais e suprimindo a apoptose das células endoteliais vasculares e microvasculares, e sendo um potente fator mitogênico pode estimular uma angiogênese (KEMPF et al., 2001), além de peliose em pacientes imunodeprimidos (OKARO et al., 2017).

Ainda se nota que há diferença na sintomatologia manifestada, quando se realiza infecções *in vitro* quando comparada com a infecção natural. Infecções experimentais realizadas por Breitshwerdt e Kordick (2000) em felinos domésticos, mostraram que os animais não apresentaram sintomatologia, no entanto pode ocorrer bacteremia curta geralmente de 7 dias.

Diferentemente, gatos com infecção natural, por inoculação intravenosa acidentais ou através de pulgas infectadas, manifestaram sinais clínicos e uma bacteremia com duração de até 454 dias (CHOMEL et al., 1995), acrescentando infecção persistente com a presença da *Bartonella* spp. nos eritrócitos (MAURIN et al., 1997).

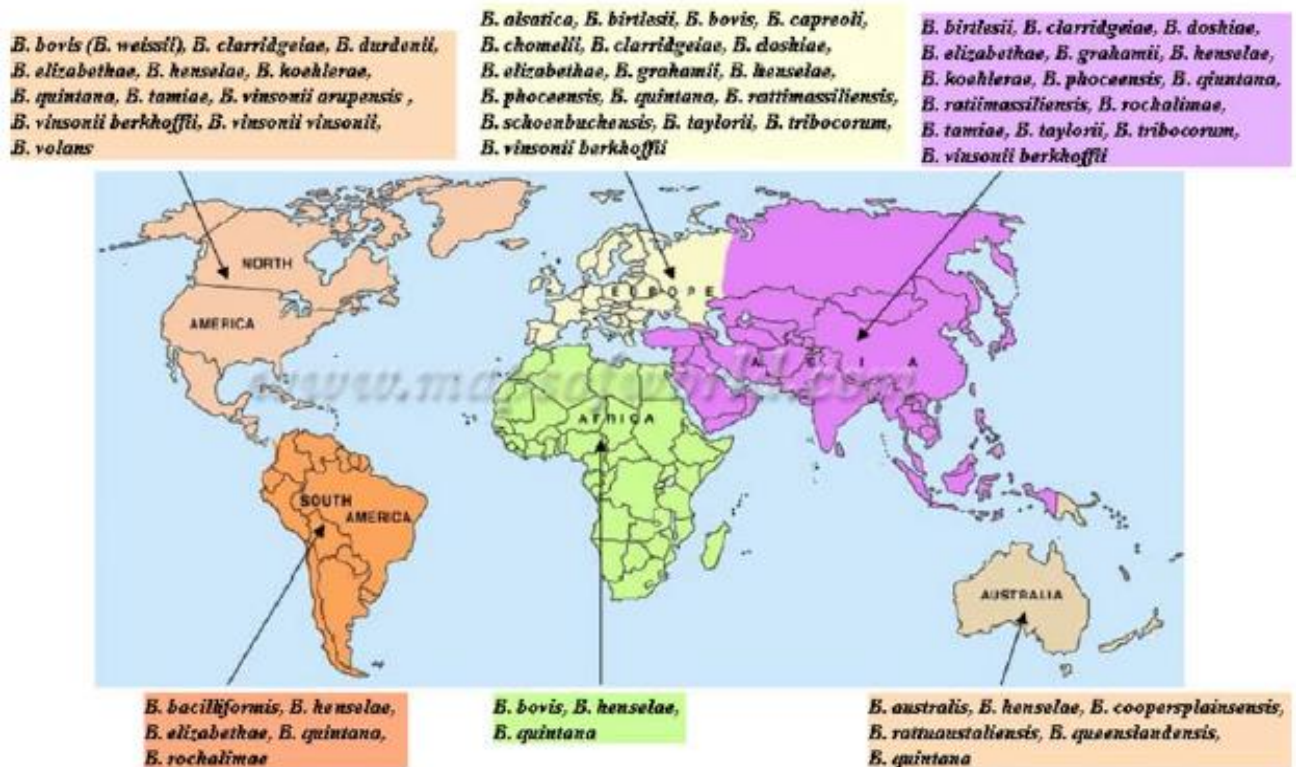
A sintomatologia descrita em felinos com infecção natural, inclui febre, anemia, eosinofilia, linfadenomegalia, colangite, lesões cardíacas e renais, disfunções neurológicas e reprodutivas, hiperplasia dos linfonodos, colangite linfocítica, hepatite e nefrite (KORDICK; BREITSCHWERALT, 1997; BREITSHWERDT; KORDICK, 2000). Os sinais neurológicos se caracterizam por letargia e desorientação, e no coração por miocardite focal (KORDICK; BREITSCHWERALT, 1997).

## **2.5 Aspecto clínico-epidemiológico**

Isolados de bartoneláceas têm sido descritos em uma grande variedade de animais terrestres, marinhos e voadores como os morcegos, sendo que a maioria desses reservatórios não apresenta sintomatologia ou doença grave (OKARO et al., 2017). As diferentes espécies possuem uma ampla distribuição geográfica (Figura 7) (SAISONKORH et al., 2009).



Figura 7 - Distribuição mundial de espécies de *Bartonella* spp.



Fonte: Saisongkorh et al., 2009.

Nota-se que em regiões tropicais há uma maior prevalência da doença causada por *Bartonellas* spp., podendo, associá-la, as condições favoráveis a proliferação vetorial (BREITSHWERDT; KORDICK, 2000). Porém, no Brasil, além de se verificar escassez de registros e a falta de dados sobre a taxonomia das bartonellas, soma-se ao fato a questão de não ter muitos laboratórios especializados na investigação epidemiológica dessa bactéria (LAMAS et al., 2013).

Desde o ano de 2014 a bartonelose se tornou doença de notificação obrigatória pelo Ministério da Saúde, no entanto, as informações a cerca da enfermidade ainda são limitadas sobre o aspecto epidemiológico, diversidade genética, distribuição e possíveis casos de infecções (GOLÇALVES et al., 2016).

Em alguns estados do Brasil já foi registrado casos de bartonelose em humanos como em Minas Gerais (COSTA et al., 2005), São Paulo (PITASSI et al., 2015) e Rio de Janeiro (LAMAS et al., 2010).

Assim como, a *Bartonella* spp. em roedores sinantrópicos, o *Rattus norvegicus*, no Estado da Bahia (COSTA et al., 2014) e do Mato Grosso do Sul (FAVACHO et al., 2015). Golçalves et al. (2016), encontraram positividade de 25,60% (117/457) para *Bartonella* spp.,



em roedores de vários estados do Brasil: Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina, Pará, Mato Grosso, Bahia, Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte, Goiás e Tocantins.

Fleischman et al. (2015) observaram soroprevalência de 11% em canídeos silvestres do Estado de São Paulo e Mato Grosso do Sul. e em felinos domésticos no Rio de Janeiro foi detectado soropositividade em 47,5% (CRISSIUMA et al., 2011).

Estudos recentes no Quênia e Guatemala têm identificado quirópteros como reservatórios de espécies de *Bartonellas* (LAMAS et al., 2013). Bay et al. (2012), sugeriram que a alta prevalência de casos positivos em morcegos no Peru pode ser atribuída a sua vida longa, somando a alta incidência de ectoparasitas que estes mamíferos albergam mantendo o ciclo enzoótico da doença.

Infecção por bartoneláceas em morcegos foi reportada em Taiwan (LIN et al., 2012), Finlândia (LILEY et al., 2015), Reino Unido (CONCANNON et al., 2005), Porto Rico (OLIVAL et al., 2015), Costa Rica (JUDSON et al., 2016), Guatemala (WRAY et al., 2016), Guiana Francesa (DAVOUST et al., 2016), Madagáscar (BROOK et al., 2015), Ghanga (MANNERINGS et al., 2016), África do Sul (DIETRICH et al., 2016) e Argélia (LEULMI et al., 2016).

Dentro deste contexto, recentemente no Brasil estudos de Ikeda et al. (2017), identificaram 17 morcegos positivos em testes moleculares das seguintes espécies e localidades: *Sturnira lilium* no Paraná, *Carollia perspicillata*, *Phyllostomus discolor*, *Natalus espiritosantensis* e *Mimon crenulatum* no Pará, e *Glossophaga soricina* e *Carolina perspicillata* no Tocantins.

Na área clínica se nota que estudos demonstram que as espécies de *Bartonella* apresentam uma relação espécie-hospedeiro específico (McKEE et al., 2016), assim como manifestação de sintomatologia específica para cada hospedeiro infectado, incluindo os seres humanos quando são alvos da infecção, como mostra a Tabela 1, segundo (OKARO et al., 2017).

Ademias nas últimas publicações se verifica que hospedeiros podem albergar mais de uma espécie, além do que, a crescente descoberta de novos reservatórios de animais que estão sendo publicadas nos últimos anos, vem estimulando estudos sobre esta enfermidade, já que apresenta caráter zoonótico (IKEDA et al. 2017; KARO et al., 2017).

**Tabela 1-** Espécies de *Bartonella*, seus hospedeiros e as doenças causadas.

<b>Espécie</b>	<b>Hospedeiros</b>	<b>Doença em humanos</b>
<i>B. acomydis</i>	<i>Acomys russatus</i> (Roedor)	-
<i>B. alsatica</i>	Coelhos	Endocardite
<i>B. ancashensis</i>	Seres humanos	Doença da “Verruga peruana”
<i>B. apis</i>	Abelha	-
<i>B. australis</i>	Canguru	-
<i>B. bacilliformis</i>	Seres humanos	Doença da “Febre de Oroya”, “Verruga peruana”
<i>B. birtlesi</i>	Roedor	“Doença de Carrion”
<i>B. bovis</i>	Gado leiteiro	-
<i>B. callosciuri</i>	Esquilo	-
<i>B. capreoli</i>	Veado	-
<i>B. chomelii</i>	Gado francês	-
<i>B. clarridgeiae</i>	Gato	Linfoadenopatia, febre, pápula, Doença da arranhadura do gato
<i>B. coopersplainsensis</i>	Roedor	-
<i>B. doshiae</i>	Roedor	-
<i>B. dromedarii</i> Camels	Camelo	-
<i>B. elizabethae</i>	Roedor	Endocardite, neurorinite.
<i>B. florenciae</i>	Roedor	-
<i>B. fuyuanensis</i>	Roedor	-
<i>B. grahamii</i>	Roedor e veado	Neuroretinite, Doença da arranhadura do gato
<i>B. heixiaziensis</i>	Veado	-
<i>B. henselae</i>	Gato	Doença da arranhadura do gato, endocardite, angiomatose bacilar, bacteremia
<i>B. jaculi</i>	Roedor (Dipodidae)	-
<i>B. japonica</i>	Roedor	-
<i>B. koehlera</i>	Gato	Endocardite
<i>B. koehleraesubsp. bothieri</i>	Lince	-
<i>B. koehleraesubsp. boulouisii</i>	Puma	-
<i>B. mayotimonensis</i>	Morcego	Endocardite
<i>B. melophagi</i>	Ovelha	-
<i>B. naantaliensis</i>	Morcego	-
<i>B. peromysci</i>	Roedor	-
<i>B. pachyuromydis</i>	Esquilo	-
<i>B. phoceensis</i>	Roedor	-
<i>B. queenslandensis</i>	Roedor	-
<i>B. Quintana</i>	Seres humanos	“Febre das trincheria”, endocardite, bacteremia, angiomatose bacilar
<i>B. rattaaustraliani</i>	Roedor	-
<i>B. rattimassiliensis</i>	Roedor	-
<i>B. rochalimae</i>	Canídeos	Bacteremia e esplenomegalia
<i>B. silvatica</i>	Roedores	-
<i>B. schoenbuchensis</i>	Cervídeo	-
<i>B. senegalensis</i>	Carrapato	-
<i>B. talpae</i>	Toupeira	-
<i>B. tamiiae</i>	Roedor, seres humanos	Febre
<i>B. taylorii</i>	Roedor	-
<i>B. tribocorum</i>	Roedor	-
<i>B. vinsonii subsp. arupensis</i>	Roedor	Endocardite
<i>B. vinsonii subsp. berkhoffii</i>	Canídeo	Endocardite
<i>B. vinsonii subsp. vinsonii</i>	Roedor	-
<i>B. vinsonii subsp. yucatanensis</i>	Roedor	-
<i>B. weissii</i>	Felino	-
<i>B. washoensis</i>	Canídeo	-

**Fonte:** Adaptado de Okaro et al., 2017.

## 2.6 Diagnóstico

Para a realização do diagnóstico de bartonellas necessita-se de laboratórios bem equipados com ensaios e teste sorológicos específicos, tal exigência aumenta quando se pretende trabalhar com análises moleculares (LAMAS et al., 2013).

Os testes sorológicos desempenharam inicialmente um papel fundamental na detecção de pacientes soropositivos para *Bartonella* spp. (OKARO et al., 2017). Tanto que para enfermos que apresentam endocardite, com suspeita de bartonelose, emprega-se análises diretas com anticorpos fluorescentes para verificar a titulação de IgM e IgG; soropositivos podem ser considerados quando o IgM tem título de 16 e IgG com 64, observando uma aumento da titulação aproximado de quatro vezes da fase aguda para a de convalescência (CAPONETTI et al., 2009).

Porém, estudo com enzimaímmunoensaios (ELISA) em amostras de soros humanos vem demonstrando reação cruzada com outras espécies de microrganismos como a *Coxiella* sp. e *Chlamydia* sp., sugerindo uma baixa especificidade destes testes sorológicos (MAURIN et al., 1997). A proposta para diminuir a incidência de reações inespecíficas esta em utilizar antígenos completos, por exemplo, o antígeno 17 kDa que foi adaptado para o teste de ELISA para IgG contra *B. henselae* (BREITSHWERDT; KORDICK, 2000; OKARO et al., 2017).

A imunofluorescência, também, pode ser utilizada no diagnóstico e identificação de espécies a partir de sua cultura, podendo ser confirmada por testes moleculares (LIN et al., 2010). Porém, devido ao seu crescimento lento em cultura, métodos bioquímicos de rotina não são muito indicados para a sua identificação, sendo que a maioria das espécies é inerte a estes testes, exceto às peptidases (BREITSHWERDT; KORDICK, 2000).

A *Bartonella* spp. é exigente ao crescimento no meio de cultura, observando as suas colônias em meio enriquecido por hemoglobina, hemina e eritrócitos, assim faz a opção do ágar com infusão de coração, ágar Columbia, ágar Brucella, ágar Trypticase de soja (OKARO et al., 2017), a temperatura ótima 35 a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>, exceto a *B. bacilliformis* que cresce em 29 °C com ausência de CO<sub>2</sub> (RIESS et al., 2008).

As bactérias são cultivadas, geralmente, em Ágar nutriente semi-sólido contendo sangue de coelho, equino ou ovino a 35 °C, nota-se que no isolamento que algumas espécies como: *B. clarridgeiae*, *B. elizabethae* e *B. vinsonii* se caracterizam por colônias de coloração esbranquiçada, rugosa, seca, já a *B. quintana* apresenta uma coloração acinzentada, e forma colônias menores, mucóides (BREITSHWERDT; KORDICK, 2000).

A histopatologia tem sido aplicada em tecidos cardíacos, representando uma técnica de diagnóstico, foi utilizada por Riess et al. (2008) que observaram na região valvar cardíaca de pacientes positivos para *Bartonella* spp., bactérias na área fibrótica utilizando como coloração a prata Warthin-Starry. Okaro et al. (2017), realizaram imuno-histoquímica, com anticorpos monoclonais e policlonais e verificaram especificidade na reação para a bactéria, já Vermeulen et al. (2010), através da microscopia eletrônica de transmissão, visualizaram partículas de bacteriófagos de *B. henselae* coradas com acetato de urânio.

Atualmente, técnicas moleculares em amostras de sangue e de isolamento bacteriano, tem se mostrado com um alto grau de sensibilidade e especificidade entre as espécies de *Bartonellas* e seus hospedeiros (BREITSHWERDT; KORDICK, 2000; LIN et al., 2010; ANGELAKIS; RAOULT, 2014).

O método de polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (RFLP) dos genes que codificam citrato-sintase das regiões RNAr 16S ou RNAr 16S-23S das sequências palindrômicas extragênicas repetitivas e randômicas para distinguir cepas e espécies de Bartonellaceae, é uma técnica que tem sido muito utilizada em pacientes com angiomatose bacilar (BREITSCHWERDT, 2017). A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido muito empregada em colônias de *Bartonella* spp., com sensibilidade de 72% e especificidade de 98%, e em amostra de soro, respectivamente, 58% de sensibilidade e 100% de especificidade (OKARO et al., 2017).

A citrato-sintase (gltA) participa do ciclo do ácido tricarbóxico regulando a produção de adenosina tri-fosfato (ATP) nas células procarióticas e eucariotas, embora esta enzima exista em duas formas multiméricas, os monômeros das duas formas são semelhantes em tamanho e homologia de sequência de exibição (BIRTLES; RAOULT, 1996).

A sequência de ácido nucleico do gene gltA, que codifica a enzima, foi determinada para uma série de bactérias, incluindo *B. henselae* (BROOK et al., 2015). O uso de comparações de gltA para estimar a divergência entre espécies estreitamente relacionadas foi proposto pela Regnery et al. (1991), que demonstraram relações genótípicas entre as espécies de Rickettsia, comparando vários padrões de digestão de endonucleases de restrição de amplicões de PCR de gltA parcial (BIRTLES; RAOULT, 1996), sendo posteriormente utilizados para espécies de *Bartonella*. Verifica-se que sequências de nucleotídeos de 345 pb desses amplicons de gltA foi identificado para cinco espécies de *Bartonella*, e uma comparação dessas sequências revelou níveis de similaridade entre aproximadamente 80 e 90%, tal gene tem a capacidade de agrupar um grande número de espécies de proteobactérias (HARMS; DEHIO, 2012).

## 2.7 Aspectos da biologia e ecologia dos quirópteros brasileiros

A ordem Chiroptera é composta por duas subordens a Megachiroptera e a Microchiroptera, sendo que esta última é constituída por 18 famílias, 202 gêneros e 1120 espécies de ocorrência no Novo Mundo e, no Brasil, há registro de nove famílias com 168 espécies (SIMMONS, 2005; REIS, 2010). As famílias Phyllostomidae, Noctilionidae, Emballonuridae, Furipteridae, Thyropteridae, Vespertilionidae, Molossidae, Natalidae, Vespertilionidae e Mormoopidae ocorrem em todos os biomas brasileiros (PERACCHI et al., 2006).

Esses mamíferos forrageiam em sua maioria de noite, voltando ao amanhecer aos seus abrigos, e são importantes polinizadores e dispersores de sementes nas regiões neotropicais e tropicais (AGUIAR; TADDEI, 1995; REIS et al., 2007; REIS, 2010), e usam a ecolocalização para se orientar (NEUWEILLER, 2000).

Os morcegos apresentam nichos variados e com isso há o reflexo de uma alimentação diversificada, podendo ser nectarívoras, frugívoras, hematófagos e até carnívoras (ALONSO-MEJÍA; MEDELLIN, 1991). Como habitat, podem utilizar cavernas, casca de árvores, fendas de rochas e construções humanas, formando populações de numerosos espécimes, além de estabelecer relações interespecies (REIS, 2010).

Neste contexto, verifica-se que no território brasileiro há uma expansão urbana e agrícola de forma indiscriminadamente, o qual contribui para a diminuição do habitat natural desses mamíferos, ocasionando extinção de espécies menos adaptadas, e possibilitando a presença de outras em áreas peri-domiciliares e domiciliares (PACHECO et al., 2010).

Deste modo, é possível observar o estabelecimento de uma relação sinantrópica entre morcegos-humanos-animais domésticos, aumentando a possibilidade de zoonoses, zooantroponoses e a manutenção de um ciclo enzoótico (JEFFERIES, 2009).

Diante desse cenário de transmissão de possíveis doenças, devido a esta íntima relação, vale ressaltar que os quirópteros são hospedeiros e vetores em potenciais para enfermidade de caráter zoonótico (REIS et al., 2007; PACHECO et al., 2010), e podem albergar bactérias, protozoários, vírus e fungos (BARROS et al., 2008).

Ademais, os poucos estudos realizados na área de parasitologia mostraram que estes animais podem ser parasitados por numerosas populações de ectoparasitas hematófagos (REIS et al., 2007), que também podem veicular patógenos intra e inter-espécies.

Segundo o Ministério da Saúde (1998), os morcegos brasileiros estão relacionados à ocorrência de algumas zoonoses tanto nas áreas rurais e urbanas, já que são reservatórios

naturais e dispersores de agentes etiológicos (FAO, 2011). Assim, promover estudos que elucidem quais possíveis microorganismos que possivelmente possam albergar vem a contribuir com novos dados epidemiológicos e para a saúde humana.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar por meio de análise molecular a ocorrência de infecção por *Bartonella* spp. no fígado de quirópteros neotropicais capturados no Estado de São Paulo, Brasil.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Determinar a prevalência molecular de infecção por bactérias do gênero *Bartonella* no tecido hepático por reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação parcial do gene citrato sintase (gltA);

Desenvolver o sequenciamento nucleotídico do gene gltA e análise filogenética do gene gltA para caracterizar as espécies de *Bartonella* detectadas nas amostras positivas;

Descrever as características ecoepidemiológicas e distribuição geográfica das espécies de quirópteros positivos para infecção por *Bartonella* spp, segundo a região de estudo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais utilizados

As amostras utilizadas pertenciam ao banco de espécimes da Seção de Hepatologia do Instituto Evandro Chagas (SAHEP/IEC) e correspondem a morcegos do bioma de mata atlântica, do Estado de São Paulo, encaminhadas por demanda ao Instituto Pasteur (Secretaria de Estado da Saúde, Governo de São Paulo) para o diagnóstico de raiva. Os animais foram encaminhados resfriados ou congelados ao Instituto Pasteur, até serem submetidos à necropsia para coleta de fragmentos de fígado. E posteriormente encaminhados à SAHEP/IEC, onde permaneceram armazenadas à -80 °C até uso.

Foram avaliadas amostras de fígado de 341 espécimes de quirópteros correspondentes a três famílias (Molossidae, Phyllostomidae e Vespertilionidae) e 21 espécies (Tabela 2). A identificação destes mamíferos foi realizada com o auxílio de chaves taxonômicas específicas como a de Reis et al. (2007) e Reis (2010). Além do que, estes tecidos hepáticos foram provenientes de 90 municípios do Estado de São Paulo, recebidos nos anos de 2012, 2014 e 2015 (ANEXO 02).

**Tabela 2** - Morcegos neotropicais distribuídos em famílias, espécies e sexo.

Família dos quirópteros	Espécies de morcegos	Número de espécimes por sexo	
		Fêmeas	Machos
Phyllostomidae	<i>Desmodus rotundus</i>	9	7
	<i>Glossophaga soricina</i>	28	25
	<i>Anoura caudifer</i>	-	1
	<i>Carollia perspicillata</i>	-	1
	<i>Artibeus fimbriatus</i>	-	1
	<i>Platyrrhinus spp.</i>	-	1
	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	3	5
	<i>Sturnira lilium</i>	6	5
	<i>Artibeus lituratus</i>	28	23
	Molossidae	<i>Cynomops greenhalli</i>	1
<i>Cynomops planirostris</i>		3	6
<i>Eumops auripendulus</i>		2	1
<i>Eumops glaucinus</i>		23	14
<i>Eumops perotis</i>		3	6
<i>Molossus molossus</i>		24	62
<i>Molossus rufus</i>		2	19
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>		1	2
<i>Tadarida brasiliensis</i>		1	1
Vespertilionidae	<i>Lasiurus egra</i>	2	-
	<i>Histiotus spp.</i>	-	1
	<i>Histiotus velatus</i>	-	1
	<i>Myotis nigricans</i>	8	6
	<i>Eptesicus furinalis</i>	2	7
<b>TOTAL</b>		<b>146</b>	<b>195</b>



## 4.2 Testes moleculares

### 4.2.1 Extração do DNA

A extração de DNA total das amostras de fígado foi executada com a utilização do kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN) de acordo com as orientações do fabricante no Laboratório de Hepatologia do IEC. Assim, todos os tecidos hepáticos foram fragmentados incubados em 180 µl de tampão ATL acrescidos de 20 µl de proteinase K, homogêinizados em vortex, e incubados *overnight* no termobloco na temperatura de 56 °C para digestão enzimática.

Posteriormente, 200 µl de tampão AL e 200 µl de etanol puro foram acrescidos ao lisado, homogêinzado em vortex e o volume total do lisado foi acrescido em colunas com membrana de sílica, seguida por centrifugações *spin* e lavagens com 500 µl do tampão AW1 (1 minuto a 8000 rpm) e 500 µl de tampão AW2 (3 minutos a 14000 rpm), sendo retirada p excesso de álcool em centrifugação a velocidade máxima por 1 minuto. O DNA total de cada amostra foi eluído em 200 µl do Buffer AE (8000 rpm). O DNA extraído foi armazenado no ultrafreezer a -80 °C para posterior análise molecular.

### 4.2.2 Amplificação da *gltA*

Os ensaios de PCR foram desenvolvidos segundo condições previamente descritas (BIRTLES; RAOULT, 1996) para amplificação parcial do gene *gltA* do gênero *Bartonella* spp. (350 bp). Ressalta-se que a caracterização molecular parcial do gene *gltA* é viável e recomendada para identificação molecular de isolados de *Bartonella* (BIRTLES; RAOULT, 1996; GUTIÉRREZ et al., 2017).

O mix de reação de PCR, por amostra, continha 5µl de tampão (5x Colorless GoTaq® Buffer), 1µl dNTPs (10Mm), 1 µl MgCl<sub>2</sub> (25 Mm), 1 µl dos primers (20pmol/ul) CSH1f (5'-GCGAATGAAGCGTGCCTAAA- 3') (BIRTLES; RAOULT, 1996) e o BhCS.1137n (5' – AATGCAAAAAGAACAGTAAACA – 3') (NORMAN, et al., 1995), 0,3 µl de GoTaq® Hot Start Polymerase (5U/µl), acrescido de 3µL de DNA total de cada amostra, ajustando-se o volume final a 25 µl com água ultrapura.

O programa de termociclagem de amplificação consistiu em 35 ciclos, sendo cada ciclo constituído por ciclo inicial de desnaturação a 95 °C durante 5 minutos, seguido por ciclos de desnaturação a 95° C durante 30 segundos, anelamento à 30 °C durante 50 segundos e

extensão 72° C durante 30 segundos, e extensão final à 72 °C por 10 minutos, utilizando o termociclador SimpliAmp Thermal Cycler (ThermoFisher).

#### 4.2.3 Análise dos produtos amplificados

A detecção dos produtos de amplificação foi desenvolvida por eletroforese em gel de agarose 1% corados com SYBR<sup>®</sup> safe DNA gel stain (ThermoFisher Scientific). Dez microlitros de cada reação acrescidos de 2 µl de Bluejuice gel loading buffer (ThermoFisher Scientific) foram aplicados no gel de agarose, submetidos à eletroforese e posteriormente visualizados sob luz ultra-violeta em transiluminador UV. Amostras com produtos de amplificação com tamanho aproximado a 250 pb foram consideradas como positivas. O tamanho dos fragmentos amplificados foram estimados comparando-se com os marcadores de peso molecular com escala de 50 pb (50 bp DNA ladder, ThermoFisher Scientific)

Como controle positivo foi utilizado em cada reação uma amostra previamente identificada como positiva para o agente etiológico, e como controle negativo foi utilizado água bidestilada estéril.

#### 4.2.4 Sequenciamento nucleotídico e análise filogenética

Os amplicons das amostras positivas foram purificados enzimaticamente (ExoSAP-It, GE Healthcare) e sequenciados nos sentidos *sense* e *consenso* em sequenciador automático AB3500 Genetic analyzer (ThermoFisher Scientific) com o uso dos kits BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific) e BigDye XTerminator<sup>®</sup> Purification Kit (ThermoFisher Scientific), utilizados segundo as orientações dos fabricantes (Água de 1 µl, BigDye Termination Reaction Mix 2 µl, BigDye Sequencing Buffer 1µl, Primer 1,6 pmol/ul e DNA 3µl).

As seqüências *sense* e *antisense* foram alinhadas no *software* Geneious v8.1.3. para obtenção de seqüências *consenso*, posteriormente submetidas à BLASTn ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi)) para confirmação de positividade. As seqüências *consenso* das amostras positivas foram depositadas na plataforma Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) e alinhadas com um banco de dados contendo 167 seqüências nucleotídicas representativas do gênero *Bartonella* disponíveis no banco de dados do Genbank para análise filogenética pelo método de *Maximum-Likelihood* (GTR+G+I) no

software MEGA v7.0 (*bootstrap*, 1000 replicatas) e identificação taxonômica dos isolados. A distância nucleotídica foi calculada utilizando-se o software Geneious v8.1.3.

### **4.3 Análise estatística**

Os resultados de prevalência foram apresentados no formato de estatística descritiva, descritos em valores absolutos e relativos.

### **4.4 Considerações bioéticas**

A presente pesquisa foi apreciada e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Evandro Chagas (IEC), obedecendo aos preceitos da lei Federal 11.794 de 8 de outubro de 2008 que estabelece os procedimentos para uso científico de animais, assim como os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo aprovado com o número de protocolo: n° 033/2017 (ANEXO 02), além do parecer do IBAMA com o número: 39285-2.

## 5 RESULTADOS:

O estudo verificou que entre as 341 amostras de tecido hepático de morcegos, obteve-se positividade para o gênero *Bartonella* spp. em duas amostras (0,6%), provenientes de morcegos da espécie *Glossophaga soricina* do município de São Roque, São Paulo.

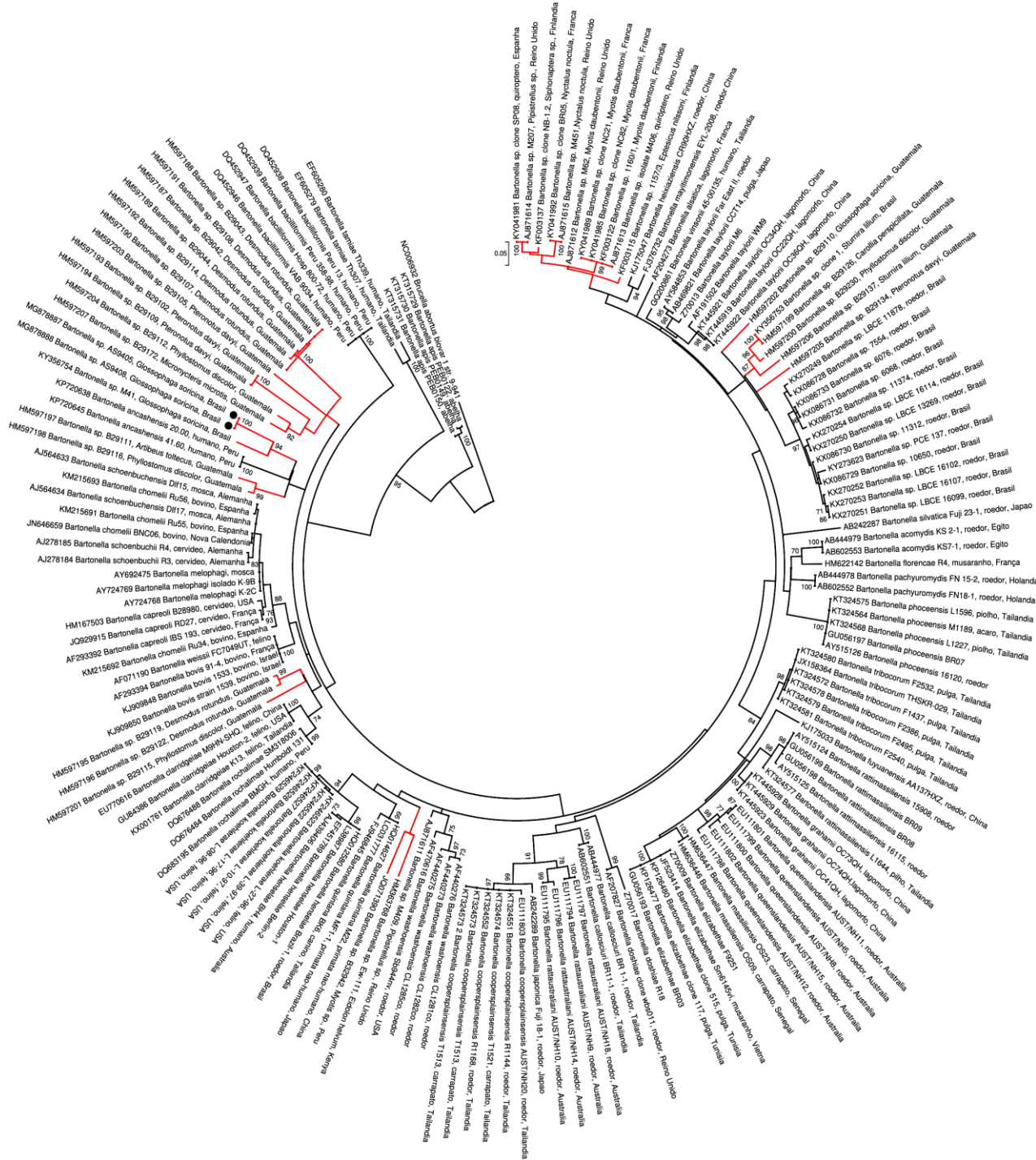
Após o sequenciamento, a análise BLASTn das duas amostras (código de acesso Genbank MG878887 e MG878888) indicou que ambas apresentaram identidade com o gênero *Bartonella*, resultado confirmado após análise filogenética por máxima verossimilhança que indicou que as amostras agruparam em um clado próximo a uma sequência de *Bartonella* sp. obtida de morcego *G. soricina* do Estado de Tocantins, Brasil (Figura 8).

O cálculo de identidade indicou que as sequências obtidas dos dois morcegos *G. soricina* no município de São Roque apresentaram 100% de identidade nucleotídica entre si e quando comparadas a outras sequências parciais do gene *gltA* obtidas em quirópteros no velho e novo mundo (Anexo 3), a identidade nucleotídica variou de 82,1-89,8%.

A sequência de *Bartonella* sp. HM597203, detectada em morcego *Pteronotus davyi* na Guatemala apresentou identidade de 82,1% com as duas sequências obtidas de morcegos *G. soricina* no presente estudo, enquanto as mesmas apresentaram 82,5% de identidade com a sequência de *Bartonella* sp. obtidas de morcegos da mesma espécie no Estado do Tocantins (KY356754) e na Guatemala (HM597202), respectivamente. A identidade nucleotídica com outro isolado de *Bartonella* sp. obtida de morcego *Stunira lilium* no Estado do Paraná (KY356753) foi de 83,2%.

Comparando-se com outras espécies do gênero, o percentual de identidade nucleotídica das amostras positivas foi de 86% com *B. ancashensis*, 84,6% com *B. henselae* (EF451789), 81,4% com *B. bacilliformis* (DQ452946) e 82,9% com *B. mayitimonensis* (FJ376732) (Anexo 3).

**Figura 8** - Árvore filogenética do gênero *Bartonella* inferida pelo método de Máxima verossimilhança, baseada em sequências nucleotídicas parciais (243 pb) do gene *gltA*. As sequências estão identificadas pelo código de acesso Genbank, identificação das espécies/isolados, hospedeiros e procedência geográficas. As Amostras positivas do presente estudo estão destacadas (●) e os ramos que contém sequências obtidas outros de quirópteros estão marcados em vermelho. Uma sequência de *Brucella abortus* (NC006932) foi utilizada como grupo externo. Valores de *bootstrap* > 70 estão expressos nos nós. Barra representa substituições nucleotídicas por sítio.



## 6. DISCUSSÃO

Dados sobre a ocorrência de *Bartonella* spp. em mamíferos domésticos e silvestres no território brasileiro ainda são escassos, e a avaliação de possíveis hospedeiros do agente é de extrema importância para a saúde pública, já que muitas espécies da bactéria apresentam um caráter zoonótico (IKEDA et al., 2017). Soma-se ao fato que quirópteros podem albergar várias espécies de ectoparasitas, que pode vir a contribuir na manutenção de um ciclo enzoótico desta bactéria, além desses animais apresentarem uma característica sinantrópica que poderiam facilitar na dispersão desse agente em seres humanos (PACHECO et al., 2010; OKARO et al., 2017).

Então, sabendo que a bartonelose constitui o grupo de doenças infecciosas emergentes (GOLÇALVES et al., 2016), e que estas enfermidades são em sua maioria provenientes de animais selvagens de vida livre, incluindo os morcegos (SMITH; WANG, 2013), controlar estas infecções se torna um grande desafio, pois é difícil determinar onde se originou a cadeia de transmissão na grande diversidade que constitui a mastofauna silvestre, que possuem possíveis hospedeiros (ANTHONY et al., 2013).

Situação que se agrava quando se tem os quirópteros como reservatórios, já que são mamíferos que apresentam uma grande área de distribuição geográfica com comportamentos singulares, no que diz respeito à exploração de seu nicho, e que pode acabar estabelecendo uma relação íntima com os humanos (CALISHER et al., 2006).

Nesse contexto de serem possíveis hospedeiros, observou que houve casos positivos no presente estudo, porém se verificou que houve uma baixa frequência de positividade que foi de aproximadamente de 0,6% (2/341), tal resultado se assemelha ao do Ikeda et al. (2017), realizado em alguns estados brasileiros, que encontrou 5,2% morcegos positivos distribuídos entre as espécies de *G. soricina*, *Sturnira lilium* e *Carollia perspicillata*. Acrescenta-se que dos resultados da presente pesquisa os dois espécimes quirópteros *G. soricina* (Phyllostomidae) constituíram os primeiros registros de infecção em áreas próximas a fragmentos da Mata Atlântica no Estado de São Paulo.

Outro aspecto importante, são os resultados negativos, obtidos por Ikeda et al. (2017) em *Molossus molossus* no Brasil, por Reeves et al. (2016) em Galápos e, por Bai et al. (2012) no Peru, corroborando com os achados do presente estudo, que também se apresentaram negativos para todos os indivíduos dessa espécie que foram capturados. Diante de tais relatos, pode-se inferir que *M. molossus* pode não apresentar fatores biológicos propícios para ser hospedeiro em potencial de *Bartonella* spp.

Estudos também relataram a presença de *Bartonella* spp. em outros representantes da família Phyllostomidae neotropicais, como *Artibeus jamaicensis*, *Ardops nichollsi* e *Brachyphylla cavernarum* na Ilha de São Cristovão em Galápagos (REEVES et al., 2016), na Amazônia peruana em *Carollia perspicillata*, *Artibeus planirostris*, *Desmodus rotundus*, *Artibeus obscurus*, *Carolia brevia cauda*, *Glossophaga soricina*, *Phyllostomus discolor*, *Phyllostomus hastatus*, *Sturnira lilium* e *Vampyriscus bidens* com 24,1% de casos positivos e com estirpes de bactérias semelhantes ou igual as encontradas na Guatemala (BAI et al., 2012).

Dentro desse contexto, em morcegos do Velho Mundo também foi registrado a presença da bactéria, porém em uma maior prevalência, por exemplo, na Nigéria em *Eidolon helvum*, *Epomophorus* spp., *Chaerephon nigeriae*, *Rhinolophus* spp., *Micropteris* spp. e *Chaerephon nigeriae* apresentaram 51,4% (76/148) (KAMANI et al., 2014); Quênia com 30,2% entre *Eidolon helvum*, *Rousettus aegyptiacus*, *Coleura afra*, *Triaenops persicus*, *Hipposideros commersoni* e *Miniopterus* spp. (KOSOY et al., 2010).

Convém relatar o comportamento ecológico da espécie *Glossophaga soricina*, identificada por albergar as espécies de *Bartonella* spp. no presente estudo, já que pode influenciar na sua susceptibilidade em ser infectado, ou, de estabelecer um ciclo enzoótico. Então, esses mamíferos apresentam hábitos peculiares na exploração do seu nicho, como os seus refúgios podem incluir desde abrigos naturais a obras construídas por seres humanos, além de compartilharem seu habitat com outras espécies de mamíferos, como roedores (REIS et al., 2010). Tais comportamentos facilitam no estabelecimento de uma antropozoonose entre os hospedeiros (JEFFERIES, 2009; PACHECO et al., 2010).

Além do que, são animais insetívoros, polímeros, nectarívoros e frugívoros, que quando há perda de seu habitat natural, vão procurar alimento no ambiente urbano e acabam sendo encontrados em edificações urbanas, demonstrando uma boa adaptação (GOODWIN; GREENHALL, 1961), o que pode explicar a presença das duas espécies de *G. soricina* serem encontradas em áreas peri-domiciliares, e que foram encaminhadas ainda vivas para a realização de necropsia, onde foram obtidas as amostras do presente estudo.

O *G. soricina* esta inserido dentro da subfamília Glossophaginae, que são morcegos que apresentam ampla distribuição geográfica nas Américas como: México, Panamá, Peru, Costa Rica, Bolívia, Costa Rica e Brasil (SIMMONS, 2005) e, no Brasil, já foi registrado em diferentes estados incluindo de São Paulo (REIS et al., 2010), conforme o registro dessa espécie na presente pesquisa, procedente do município de São Roque, SP.

Dentro de um contexto filogenético, McKee et al. (2016) sugerem que a diversidade das espécies de *Bartonella* em morcegos pode estar intimamente relacionada as particularidades das subordens, superfamílias e famílias de morcegos. Sendo influenciada por três fatores: filogeografia, adaptação divergente de espécies de *Bartonella* spp. em relação aos seus hospedeiros e vetores invertebrados, e a evolução convergente entre os envolvidos no ciclo.

No estudo encontraram-se espécies de *Bartonella* spp. que ocorrem em morcegos tropicais, assim como, registrados por Bai et al. (2012), evidenciando um aspecto geográfico. Os primeiros isolados de *Bartonella* spp. foram identificados recentemente no Brasil, em um estudo que também detectou 5 espécimes de *G. soricina*, positivos para *Bartonella* spp. em Tocantins, sendo um destes isolados filogeneticamente próximo aos isolados descritos no presente estudo (IKEDA et al., 2017).

McKee et al. (2016), evidenciaram que há uma relação de especiação simpátrica no ciclo da bartonelose, tanto que a filogenia da *Bartonella* é determinada pela filogenia dos quirópteros, sugerindo que a especiação genética para determinar as espécies de quirópteros pode influenciar nas espécies de *Bartonella* que podem ser infectantes.

Outro fator, que também pode influenciar nas espécies de *Bartonella* spp. encontradas nesses hospedeiros, pode ser a íntima relação que estes mamíferos podem ter com os ectoparasitas que os infectam (BREITSHWERDT; KORDICK, 2000). McKee et al. (2016) notificaram que as espécies de *Bartonella*. em morcegos estão bastante relacionadas com a abundância e a diversidade de ectoparasitas que podem ocorrer nesses animais, que são determinados pelo comportamento, densidade população e fatores climáticos em que os quirópteros vivem.

Porém, tal relação ainda deve ser explorada, já que há poucas informações sobre a epidemiologia da maioria das doenças transmitidas por ectoparasitas entre morcegos e seres humanos (LOFTIS et al., 2005; REEVES et al., 2016). Sabendo-se que a bartonelose necessita de vetores invertebrados para manutenção do ciclo de transmissão, um dos poucos estudos realizados registrou a presença de *Bartonella* spp. em *Trichobius major* (Diptera, Strebilidae) na Flórida, que parasita morcegos (REEVES et al., 2005).

Os dois *G. soricina* positivos no momento de coleta não apresentaram ectoparasitas e, Olival et al. (2015), relacionam a diversidade de espécies de *Bartonella* em morcegos porto riquenhos e sua variação da taxa de infecção, a quantidade de carga parasitária que estes animais apresentaram. Assim, verifica-se que um estudo futuro mais minucioso deve ser



realizado para poder estabelecer uma associação parasita-hospedeiro e seus efeitos no ciclo da bartonelose entre quirópteros e outros mamíferos no Brasil.

Dentro da temática deve ser analisado o padrão da constituição das colônias de morcegos, já que se observam diferenças entre as subfamílias, tanto que Willig (1983) observou que os espécimes de *G. soricina*, que estão na família Phyllostomidae, apresentam um comportamento de composição populacional constituído por aproximadamente 15 indivíduos, formados pela presença de apenas um macho e o restante de fêmeas. Esta distribuição comportamental pode ter influenciado nos dois casos positivos do trabalho, pois ambos eram fêmeas.

Atualmente para a detecção da infecção por *Bartonella* spp., tem-se empregado em larga escala os testes moleculares, que podem ser realizados tanto em tecidos vísceras (GONÇALVEZ et al., 2016), sangue (MATTHEW et al., 2017) e culturas celulares (BILLETER et al., 2012).

No presente estudo não se sabe se haveria diferença de positividade encontrada quanto ao tipo de material biológico que foi submetido para a análise molecular, já que Reeves et al. (2016) utilizando sangue e cultura bacteriana, observaram maior positividade nas amostras sanguíneas quanto comparado com o cultivo bacteriano, com 53% (18/34) casos positivos no sangue de *Artibeus jamaicensis*, quando comparado com a cultura bacteriana das amostras do mesmo animal, que acabou notando apenas um caso positivo (3%), tais resultados foram semelhantes às demais espécies de morcegos testadas, como: *Ardops nichollsi* com 20% (5/25) e nenhum caso positivo para a cultura, e *Brachyphylla cavernarum* com 72% (18/25) positividade para amostras de sangue. Tais achados sugerem que tal diferença entre os resultados podem estar atribuído ao crescimento excessivo de outras bactérias, e por competição impediriam o crescimento de *Bartonella* spp..

Gutiérrez et al. (2016), verifica que o isolamento de *Bartonella* spp. é laborioso, já que se emprega métodos bacteriológicos clássicos, além de requerer condições específicas e períodos prolongados de incubação, porém métodos moleculares podem ser considerados mais práticos e sensíveis.

Os trabalhos, assim como o desenvolvido pela presente pesquisa, vêm utilizando o gene *gltA* para a detecção de estirpes de *Bartonella* spp. em morcegos, assim como Kosoy et al. (2010) no Quênia, Dietrich et al. (2016) no Sul da África e Suazilândia e Brook et al. (2015) em Madagascar.

Kamani et al. (2014), observaram que a qPCR (PCR em tempo real) apresentou maior sensibilidade demonstrando positividade em 51,4% (76/148) amostras sanguíneas de

morcegos, quando comparado com a PCR convencional que teve como resultado 9,5% (14/148) de ocorrência, demonstrando diferença na sensibilidade da detecção, mas o que não invalida o teste de PCR convencional. Assim, verifica-se que em estudos futuros pode ser testados a qPCR nessas amostras de São Paulo.

Ikeda et al. (2017), utilizando o mesmo gene, e notaram que o genótipo de *Bartonella* em *G. soricina* no Estado de Tocantins se aproximou do genótipo observado em morcegos da Costa Rica, distanciado dos genótipos detectados no Paraná. Reforçando a hipótese de que a *Bartonella* apresenta relação hospedeiro-específica, além de demonstrar que no território brasileiro há a ocorrência de variadas espécies de *Bartonella*. Os isolados de *Bartonella* spp. nos dois espécimes de *G. soricina* estudados apresentaram identidade nucleotídica de 82,5% com os genótipos encontrados nos morcegos do Tocantins.

Mckee et al. (2016), fizeram uma abordagem diferente de gene, os quais verificaram a relação filogenética entre hospedeiros e espécies de *Bartonella* spp. Assim como, Norman et al. (1995) que ao utilizarem o citrato sintase para comparar a divergência genética entre as bactérias da classe Proteobacteria, além de desenvolver reagentes genotípicos para identificação de *B. hensale*, promovendo, assim, informações que visam aperfeiçoar a especificidade e sensibilidade de amplificação de sequências de *Bartonella*.

Neste sentido, pesquisas relacionadas ao levantamento do estado sanitário de morcegos neotropicais devem ser estimuladas (IKEDA et al., 2017), sobretudo em animais provenientes de fragmentos florestais da Mata Atlântica, já que nessas áreas se observa uma ação antrópica mais intensa com perda do habitat natural dessa mastofauna aumentando assim as possibilidade do ser humano entrar em contato em um ciclo enzoótico silvestre como o da bartonelose.

Estudos relacionados à avaliação de microbiotas em organismos animais têm apresentado crescente importância dentro da ciência médica e, em consonância com conceito “one health”, pesquisas para identificação de novos agentes virais, bacterianos e parasitários em animais apresentam contribuições para o monitoramento epidemiológico e vigilância de agentes zoonóticos emergentes ou reemergentes.

## 7. CONCLUSÃO

Conclui-se que há a possibilidade de identificação por métodos moleculares de proteobactérias do gênero *Bartonella* spp. em morcegos neotropicais oriundos de biomas degradados da Mata Atlântica. Assim, inferir-se que tal bactéria circula no ambiente do município de São Roque, sendo o primeiro registro no Estado de São Paulo.

Nota-se a necessidade da ampliação da detecção da infecção nos demais hospedeiros silvestres que compartilham o mesmo habitat desses animais. Além de se sugerir que há agentes que contribuem para a manutenção de um ciclo enzoótico de caráter silvestre dessa bactéria. E, deste modo, se estimula estudos futuros para uma melhor caracterização do impacto desta doença para a saúde pública.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, L.M.S.; TADDEI, V.A. Workshop sobre a Conservação dos Morcegos Brasileiros. **Chiropt. Neotrop.**, v. 1, n.2, p. 24 – 29, 1995.
- ALONSO-MEIJÁ, A.; MEDELLÍN, R.A. *Micronycteris megalotis*. **Mam. Spec.**, n. 376. p. 1-6, 1991.
- ANDERSSON, S.G.E.; DEHIO, C. Rickettsia prowazekki and *Bartonella hensalae*: Differences in the intracellular life styles revisited. **J. Med. Microb.**, v. 290, p.135 – 141, 2000.
- ANGELAKIS, E.; RAOULT, D. Pathogenicity and treatment of *Bartonella* infections. **I. J. of Antimic. Ag.**, v. 44, n. 1, p. 16-25, 2014.
- ANSTEAD; G.M. The centenary of the discovery of trench fever, an emerging infectious disease of World War 1. **Lacent. Infect. Dis.**, v. 30, p. 1-9, 2016.
- ANTHONY, S.J.; EPSTEIN, J.H.; MURRAY, K.A.; NAVARRETE-MACIAS, I.; ZAMBRANA-TORRELIO, C.M.; SOLOVYOV, A.; OJEDA-FLORES, R.; ARRIGO, N.C.; ISLAM, A.; KHAN, S.A.; HOSSEINE, P.; BOGICH, T.L.; OLIVAL, K.J.; SANCHEZ-LEON, M.D.; KARESH, W.B.; GOLDSTEIN, T.; LUBY, S.P.; MORSE, .S.; AZER, J.A.K.; DASZAK, P.; LIPKIN, W.I. A strategy to estimate unknown viral diversity in mammals. **MBio**, v. 4, p. 598 – 613, 2013.
- BAI, Y.; KOSOY, M.; RECUENCO, S.; ALVAREZ, D.; MORAN, D.; TURMELLE, A.; JAMES ELLISON J.; GARCIA, D.L.; ESTEVEZ, A.; LINDBLADE, K.; RUPPRECHT, C. *Bartonella* spp. in bats, Guatemala. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 17, n. 7, p. 1269-1272, 2011.
- BAI, Y.; RECUENCO, S.; GILBERT, A.T.; OSIKOWICZ, L.M.; GÓMEZ, J.; RUPPRECHT, C.; KOSOY, M.Y. Prevalence and diversity of *Bartonella* spp. in bats in Peru. **The Americ. J. of Trop. Med. and Hyg.**, v. 87, n. 3, p. 518-523, 2012.
- BARROS, J.H.S.; ROMIJN, P.C.; BAPTISTA, C.; PINTO, A.G.S.; MADEIRA, M.F. Relato de infecção natural de morcegos por flagelados tripanosomatídeos em diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro. **Ver. da Soc. Bras. De Med. Trop.**, v. 24, n. 6, p. 638-685, 2008.
- BATTERMAN, H.J.; PEEK, J.A.; LOUTIT, J.S. *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* adherence to and entry into cultured human epithelial cells. **Infec. Immun**, n. 63, p. 4553, 1995.
- BENSON, L.A.; SIDDHARTHA, K.A.R.; McLAUGHLIN, G.; IHLER, G.M. Entry of *Bartonella bacilliformis* into Rruthrocytes. **Infec. nnd Immaun**, p. 347-353, 1986.
- BILLETER, S.A.; HAYMAN, D.T.S.; PEEL, A.J.; BAKER, K. *Bartonella* species in bat flies (Diptera: Nycteribiidae) from western Africa. **Parasit.**, v. 139, n. 3, p. 324-329, 2012.
- BIRTLES, R.J.; HARRISON, T.G.; SAUNDERS, N.A.; MOLYNEUX, D.H. Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov.,

*Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 45, p. 1–8, 1995.

BIRTLES, R.J.; RAOULT, D. Comparison of partial citrate synthase gene (*gltA*) sequences for phylogenetic analysis of *Bartonella* species. **Int. J. of Syst. and Evol. Microb.**, v. 46, n. 4, p. 891-897, 1996.

BRENNER, D.J.S.P.; O'CONNOR, H.H.; WINKLER, A.G.; STEIGERWAL, T. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella hensela* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from the order *Rickettsiales*. **Int. J. Syst. Microb.**, v. 43, p. 777–786, 1993.

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

BREITSCHWERDT, E.B. Bartonellosis, One Health and all creatures great and small. **Vet. Dermat.**, v. 28, n. 1, p. 96, 2017.

BROOK, C.E.; CARA, E.; BROOK, Y.B.; ANDREW, P.; DOBSON, L.Y.N.N.; OSIKOWICZ, M.; HAFALIANA, C.; RANAIVOSON, Q.I.; YUN ZHU; MICHAEL, Y.; KOSOY, K.D. *Bartonella* spp. in Fruit Bats and Blood-Feeding Ectoparasites in Madagascar. **PLOS Neglec. Trop. Dis.**, v. 10, n. 2, 2015.

BYAM, W.; LLOYD, L.I. Trench fever: its epidemiology and endemiology. **Proc. R. Soc. Med.**, v. 13, p. 1–27, 1920.

CALISHER, C.H.; CHILDS, J.E.; FIELD, H.E.; HOLMES, K.V.; SCHOUNTZ, T. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. **Clin Microb. Rev.**, v. 19, p. 531–545, 2006.

CHANG, C.C.; CHOMEL, B.B.; KASTEN, R. W.; HELLER, R.; KOCAN, K.M.; UENO, H.; YAMAMOTO, K.; BLEICH, V. C.; GONZALES, B. J.; SWIFT, P. K.; BOYCE, W. M.; JANG, S. S.; BOULOUIS, H.J.; PIEMONT, Y. Isolation of *Bartonella* spp. From wild cervids, bovids and domestic cattle in North America. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 2000.

CAPONETTI, G.C.; PANTANOWITZ, L.; MARCONI, S.; HAVENS, J.M.; LAMPS, L.W. Evaluation of immunohistochemistry in identifying *Bartonella henselae* in cat-scratch disease. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 131, p.250 –256, 2009.

CARLOS, R.S.; ABENES, M.V.; PAJARES, C.M. *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* infection in domestic cats from The Philippines. **Am. J. Trop. Med Hyg.**; v. 60, p. 593-599, 1999.

CICUTTIN, G.L.; DEALVO, M.N.; LA ROSA, I.; DOHMEN, F.E.G. *Neorickettsia risticii*, *Rickettsia* sp. and *Bartonella* sp. in *Tadarida brasiliensis* bats from Buenos Aires, Argentina. **Comp. Immun., Microb. and Infec. Dis.**, v. 52, p. 1 – 5, 2017.

CHENG, T.C. *Symbiosis. Organisms living together*. New York, Pegasus, 1970.

CHOMEL, P.H.; ABBOTT, R.C.; KASTEN, R.W.; FLOYD-HAWKINS, K.A.; KASS, C.A.; GLASER, C.A.; PEDERSON, N.C.; KOEHLER, J.E. *Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. **J. Clin. Microb.**, v. 33, p. 2445–2450, 1995.

CHOMEL, B.; KASTEN, R.W.; FLOYD-HAWKINS, K.; CHI, B.; YAMAMOTO, K.; ROBERTS-WILSON, J.; GURFIELD, A.N.; ABBOTT, R.C.; PEDERSEN, N.C. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. **J. Clin. Microb.** v. 34, p.1952–1956, 1996.

CHOMEL, B.B.; CARLOS, E.T.; KASTEN, R.W.; YAMAMOTO, K.; CHANG, C.C.; CHOMEL BB, BOULOUIS HJ, MARUYAMA S, BREITSCHWERDT EB. *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, p. 389-394. 2006.

CONCANNON, R.; WYNN-OWEN, K.; SIMPSON, V.R.; BIRTLES, R.J. Molecular characterization of haemoparasites infecting bats (Microchiroptera) in Cornwall, UK. **Paras.**, v. 131, p. 489–496, 2005.

COSTA, P.S; BRIGATTE, M.E.; GRECO, D.B. Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Osw. Cr.**, v. 100, v. 8, p. 853-859, 2005.

COSTA, F.; PORTER, F.H.; RODRIGUES, G.; FARIAS, H.; DE FARIA, M.T.; WUNDER, E.A.; OSIKOWICZ, L.M.; KOSOY, M.Y.; REIS, M.G. KO, A.I.; CHILDS, J.E. Infections by *Leptospira interrogans*, *Seoul Virus*, and *Bartonella* spp. among norway rats (*Rattus norvegicus*) from the urban slum environment in Brazil. **Vector Borne. Zoon. Dis.**, v. 14, p. 33-40, 2014.

CRISSIUMA, A.; FAVACHO, A.; GERSHONY, L.; MENDES-DE-ALMEIDA, F.; GOMES, R.; MARES-GUIA, A. Prevalence of *Bartonella* species DNA and antibodies in cats (*Felis catus*) submitted to a spay/neuter program in Rio de Janeiro, Brazil. **J Felin. Med. Surg.**, v. 13, n. 2, p. 149-51, 2011.

CUBAS, Z.S. Special challenges of maintaining wild animals in captivity in South America. **Off. Int. Epiz. Scientific and Technical Review**, v. 15, n. 1, p. 267-287, 1996.

DAVOUST B, et al. Evidence of *Bartonella* spp. in blood and ticks (*Ornithodoros hasei*) of Bats, in French Guiana. **Vect.-Bor. and Zoon. Dis.**, v.16, p.516–519, 2016.

DEHIO, C.; SANDER, A. Emerging bartonellosis. **Microb. Tod.**, v. 30, p. 168-169, 2003.

DIETRICH, M.; DIETRICH, M.; TJALE, M.A.; WEYER, J.; KEARNEY, T.; SEAMARK, E.C.J.; NEL, L.H.; MONADJEM, A.; MARKOTTER, W. Diversity of *Bartonella* and *Rickettsia* spp. in bats and their blood-feeding ectoparasites from South Africa and Swaziland. **P. On.**, v. 11, n. 3, 2016.

DROZ, A.; CHI, B.; HORN, E.; STEIGERWALT, A.G.; WHITNEY, A.M.; BRENNER, D. *Bartonella koehlerae* sp. nov., isolated from cats. **J. Clin. Microb.** v. 37, p.1117–1122, 1999.

FAVACHO, A.R.; ANDRADE, M.N.; DE OLIVEIRA, R.C.; BONVICINO, C.R.; D'ANDREA, P.S.; DE LEMOS, E.R. Zoonotic *Bartonella* species in wild rodents in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Microb. Infect.** v. 17, p. 889-892, 2015.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2011. **Investigating the role of bats in emerging zoonoses: Balancing ecology, conservation and public health interests.** In: Newman SH, HE Field, CE de Jong, JH Epstein (Eds.), FAO Animal Production and Health Manual. 12. Rome.

FLEISCHMAN, D.A.; CHOMEL, B.B.; KASTEN, R.W.; ANDRE, M.R.; GONCALVES, L.R.; MACHADO, R.Z. *Bartonella clarridgeiae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* exposure in captive wild canids in Brazil. **Epid. Infect.** v. 143, n. 3, p. 573-537, 2015.

FOURNIER, P.E.; THUNY, F.; RICHET H LEPIDI, H. CASALTA, J.P.; ARZOUNI J.P. Comprehensive diagnostic strategy for blood culture-negative endocarditis: a prospective study of 819 new cases. **Clin. Infect. Dis.** v. 51, p. 131–140, 2010.

FOURNIER, P.E.; DRANCOURT, M.; ABOUDHARAM, G.; RAOULT, D. Paleomicrobiology of *Bartonella* infections. **Microb. Infect.**, v. 17, p. 879–883, 2015.

GOLÇAVEZ, L.R.; FAVACHO, A.R.M.; ROQUE, A.L.R.; MANEDES, N.S.; JUNIOR FIDELIS, O.L.; BENEVENUTE, J.L.; HERRERA, H.M.; D'ANDREA, P.S.; LEMOS, E.R.S.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R. *Bartonella* species are associated with and synanthropic rodents in different Brazilian biomes. **App. and Env. Microbiol.**, p.1-38, 2016.

GOODWIN, G.G.; GREENHALL, A.M. A review of the bats of Trinidad and Tobago. **Bul. of the Mus. of Nat. Hist.**, v. 122, n.3. New York, 1961, p. 187-302.

GURFIELD, A.N.; BOULOUIS, J.J.; CHOMEL, B.B.; HELLER, R.; KASTEN, R.W.; YAMAMOTO, K.; PIEMONT, Y. Coinfection with *Bartonella clarridgeiae* and *Bartonella henselae* and with different *Bartonella henselae* strains in domestic cats. **J. Clin. Microb.**, v. 35, p. 120–2123, 1997.

GUTIÉRREZ, R.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; BUFFET, J.P.; HARRUS, S. Guidelines for the Isolation, Molecular Detection, and Characterization of *Bartonella* Species. **Vect.-Bor. and Zoon. Dis.**, v. 17, n. 1, p. 42-50, 2017.

HARMS, A.; DEHIO, C. Intruders below the Radar: Molecular Pathogenesis of *Bartonella* spp. **Clin. Microb. Rev.** v. 25, n. 5, p. 42 – 78, 2012.

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

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

HENSEL, D.M.; SLATER, L. N. The genus *Bartonella*. **Clin. Infect. Newslett**, p. 17-19, 1995.

HIGGINS, J.A.; RADULOVIC, S.; JAWORSKI, D.C.; AZAD, A. F. Acquisition of the cat scratch disease agent *Bartonella henselae* by cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae). **J. Med. Entomol.** v. 33, p. 490–495, 1996.

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia veterinária**. Ed. 2º, ROCCA, p.291-285, 2012.  
**Holmes F. Trench fever in the First World War.**

IKEDA, P.; SEKI, M.C.; CARRASCO, A.O.T.; RUDIAK, L.V.; MIRANDA, J.M.D.; GONÇALVES, S.M.M.; HOPPE, E.G.L.; ALBUQUERQUE, A.C.A.; TEIXEIRA, M.M.G.; PASSOS, C.E.; WERTHER, K.; MACHADO, R.Z.; WERTHER, K. Evidence and molecular characterization of *Bartonella* spp. and hemoplasmas in neotropical bats in Brazil. **Epid. Infect.**, v. 145, n. 10, p. 2038 – 2052, 2017.

ISMAIL, N; BLOCH, K.C.; MCBRIDE, J.W. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. **Clin. Lab. Med.**, v. 30, n. 1, p. 261-292, 2010.

JEFFERIES, D.J. Organochlorine insecticide residues in British bats and their significance. **J. of Zool.**, v. 166, n. 2, p. 245-263, 2009.

JUDSON, S.D.; FRANK, H.K.; HADLY, E.A. Bartonellae are prevalent and diverse in Costa Rican bats and bat flies. **Zoon. Pub. Heal.**, v. 62, p. 609–617, 2015.

KAMANI, J.; BANETH, G.; MITCHELL, M.; MUMCUOGLU, K.Y.; GUTIÉRREZ, R.; HARRUS, S. Bartonella species in bat (Chiroptera) and bat flies (Nycteribiidae) from Nigeria, West Africa. **Vec. Bor. and Zoon. Dis.**, v. 14, n. 9, p. 625 – 632, 2014.

KAISER, P.O.; RIESS, T.; O'ROURKE, F.; LINKE, D.; KEMPF, V.A. *Bartonella* spp.: throwing light on uncommon human infections. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 301, n.1, p. 7-15, 2011.

KAMANI, J.; BANETH, G.; MUMCUOGLU, K.Y.; GUTIÉRREZ, R.; HARRUS, S. *Bartonella* Species in Bats (Chiroptera) and Bat Flies (Nycteribiidae) from Nigeria, West Africa. **Vec. - Bour. and Zoon. Dis.**, v. 14, n. 9, p. 625-632, 2014.

KEMPF, V.A.; VOLKMANN, B.; SCHALLER, M.; SANDER, CA, ALITALO K, RIESS T, AUTENRIETH IB. Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations. **Cel. Microbiol.**, v. 3, p. 623– 632, 2001.

KEVIN J.O.; DITTMAR, K.; BAI, Y.; ROSTAL, M.K.; LEI, B.R.; DASZAK, P.; KOSOY, M. *Bartonella* spp. in a Puerto Rican Bat Community. **J. of Wild. Dis.**, v. 51, n. 1, p. 274-278, 2015.

KITCHELL, B.E.; FAN, T.M.; WALENBERG, G.; KORDICK, D.L.; BREITSCHWERDT, E.B. Peliosis hepatis in a dog associated with *Bartonella henselae*. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 216, p. 519–523, 2000.



KORDICK, D.L.; BREITSCHWERDT, E.B. Relapsing bacteremia after blood transmission of *Bartonella henselae* to cats. **Am. J. Vet. Res.**, v. 58, p. 492–497, 1997.

KOSOY, M.Y.; REGNER, R.L.; KOSAYA, O.L.; JONES, D.C.; MARSTON, E.L.; CHILDS, J.E. Isolation of *Bartonella* spp. from embryos and neonates of naturally infected rodents. **J. Wildl. Dis.**, v. 34, p. 305–309, 1998.

KOSOY, M.; BAI, Y.; TYNCH, L.; KUZMIN, I.V.; NIEZGODA, M.; FRANKA, R.; AGWANDA, B.; BREIMAN, R.F.; RUPPRECHT, C.E. *Bartonella* spp. in Bats, Kenya. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 16, n. 12, p. 1875–1881, 2010.

KRIEG A. **Grundlagen der Insektenpathologie**. 1961. Viren, Rickettsien, und Bakterien Infektionen. Darmstadt, Steinkopff.

LAMAS, C.C.; MARES-GUIA, M.A.; ROZENTAL, T.; MOREIRA, N.; FAVACHO, A.R.; BARREIRA, J. *Bartonella* spp. infection in HIV positive individuals, their pets and ectoparasites in Rio de Janeiro, Brazil: serological and molecular study. **Acta Trop.**, v.115, n. 1-2, p.137-141, 2010.

LAMAS, C.C.; RAMOS, R.G.; LOPES, G.Q.; SANTOS, M.S.; GOLEBIOVSKI, W.F.; WEKSLER, C.; FERRAIUOLI, G.D.A. *Bartonella* and *Coxiella* infective endocarditis in Brazil: molecular evidence from excised valves from a cardiac surgery referral center in Rio de Janeiro, Brazil, 1998 to 2009. **Int. Jour. of Infec. Diseases**, v. 17, p. 65-66, 2013.

LEULMI, H.; AOUADI, A.; BITAM, I.; BESSAS, A.; BENAKHLA, A.; RAOULT, D.; PAROLA, P. Detection of *Bartonella tamiae*, *Coxiella burnetii* and rickettsiae in arthropods and tissues from wild and domestic animals in northeastern Algeria. **Parasit. Vect.**, v. 9, p. 27. 2016.

LEPIDI, H.; FOURNIER, P.E.; RAOULT, D. Quantitative analysis of valvular lesions during *Bartonella* endocarditis. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 114, p. 880–889, 2000.

LILLEY, T.M.; VEIKKOLAINEN, V.; PULLIAINEN, A.T. Molecular detection of ‘Candidatus *Bartonella hemsundetiensis*’ in bats. **Vect.-Bor. and Zoon. Dis.**, v. 15, p. 706–708, 2015.

LIN, E.Y.; TSIGRELIS, C.; BADDOUR, L.M.; LEPIDI, H.; ROLAIN, J.M.; PATEL, R.; RAOULT, D. Candidatus *Bartonella mayotimonensis* and endocarditis. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 16, n. 3, p. 500-503, 2010.

LOFTIS, A.D., J. S. GILL, M. E. SCHRIEFER, M.L.; LEVIN, M.E.; EREMEEVA, M.J.; GILCHRIST, G. A. DASCH. Detection of Rickettsia, Borrelia, and Bartonella in *Carios kelleyi* (Acari: Argasidae). **J. Med. Entomol.**, v. 42, p. 473–480, 2005.

LIN, J.W.; HSU, Y.M.; CHOMEL, B.B.; LIN, L.K.; PEI, J.C.; WU, S.H.; CHANG, C.C. Identification of novel *Bartonella* spp. in bats and evidence of Asian gray shrew as a new potential reservoir of Bartonella. **Vet. Microbiology**, v. 156, n. 1-2, p. 119-126, 2012.

MAGUINA, C.; GOTUZZO, E. Bartonellosis. New and old. **Infect Dis Clin North Am**, v. 14, v. 1, p. 1-22, 2000.

- MANNERINGS, A.O.; MANNERINGS, A.O.; OSIKOWICZ, L.M.; RESTIF, O.; NYARKO, E.; SUU-IRE, R.; CUNNINGHAM, A.A.; WOOD, J.L.N.; KOSOY, M.Y. Exposure to bat-associated *Bartonella* spp. among humans and other animals, Ghana. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 22, p. 922–924, 2016.
- MAURIN, M.; EB, F.; ETIENNE, J.; RAOULT, D. Serological crossreactions between *Bartonella* and *Chlamydia* species: implication for diagnosis. **J. Clin. Microb.**, v. 35, p. 2283–2287, 1997.
- MATTHEW, J.; STUCKEY, B.B.; GALVEZ-ROMERO, C.; OLAVE-LEYVA, J.I.; OBREGÓN-MORALES, C.; MORENO-SANDOVAL, H.; ARÉCHIGA- CEBALLOS, N.; SALAS-ROJAS; M. AGUILAR-SETIÉN, A. Bartonella Infection in Hematophagous, Insectivorous, and Phytophagous Bat Populations of Central Mexico and the Yucatan Peninsula. **T. Amer. J. of Trop. Med. and Hyg.**, v. 97, n. 2, p. 413 – 422, 2017.
- McKEE, C.D.; HAYMAN, D.T.S.; KOSOY, M.Y.; WEBB, C.T. Phylogenetic and geographic patterns of bartonella host shifts among bat species. **Infect. Genet. Evo.**, v. 44, p. 382 – 394, 2016.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Morcegos em áreas Urbanas e Rurais: Manual de Manejo e Controle, Brasília.** Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_manejo\\_morcegos.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_manejo_morcegos.pdf). 117p. 1998. Acessado em: 12/02/2018.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças Infecciosas e Parasitárias – Guia de Bolso.** 8° Ed. Brasília. 2010.
- MUHLDORFER, K. Bats and Bacterial Pathogens: A Review. **Zoon. and Pub. Heal.**, v. 60, p. 93-103, 2012.
- NEUWEILER, G. **The biology of bats.** New York: Oxford University Press. 2000, 310p.
- NOGUCHI, H.; BATTISTINI, T.S. Etiology of Oroya fever: I. Cultivation of *Bartonella bacilliformis*. **J Exp Med.**, v. 43, p. 851– 864, 1926.
- NORMAN, A.F.; REGNERY, R.; JAMENSON, P.; GREENE, C.; KRAUSE, D.C. Differentiation of Bartonella-like isolates at the species level by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism in the citrate synthase gene. **J. Clin. Microb.**, v. 33, p. 797-1803, 1995.
- OKARO, U.; ADDISU, A.; CASANAS, B.; ANDERSON, B. *Bartonella* Species, an Emerging Cause of Blood-Culture-Negative Endocarditis. **Clin. Microb. Rev.**, v. 30, n. 3, p. 709-746, 2017.
- OLIVAL, K.J.; DITTMAR, K.; BAI, Y.; ROSTAL, M.K.; LEI, B.R.; DASZAK, P.; KOSOY, M. *Bartonella* spp. in a Puerto Rican bat community. **J. Wild. Dis.**, v. 51, p. 274–278, 2015.
- PACHECO, S.S.; SOFRÉ, M.; GAMA, A.R.; BREDIT, A.; CAVALLINI, E.M.; MARQUES, S.R.V.; GUIMARÃES, M.M.; BIANCONI, G. Morcegos Urbanos: Status do conhecimento e plano de ação para a conservação no Brasil. **Chirop. Neot.**, v. 16, n. 1, p. 629-647.2010.

PERACCHI, A.L.; LIMA, I.P.; REIS, N.R.; NOGUEIRA, M.R.; ORTÊNCIOFILHO, H. Ordem Chiroptera. In: REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. (Eds.). **Mamíferos do Brasil**. Londrina: 2006, p.153- 230.

PITASSI, L.H.; DE PAIVA DINIZ P.P.; SCORPIO, D.G.; DRUMMOND, M.R.; LANIA, B.G.; BARJAS- CASTRO, M.L. *Bartonella* spp. bacteremia in blood donors from Campinas, Brazil. **P. Negl .Trop. Dis.**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2015.

RAOULT D, BIRTLES RJ, MONTOYA M, PEREZ, E.; TISSOT–DUPONT, H.; ROUX, V.; GUERRA, H. Survey of three bacterial louse-associated diseases among rural Andean communities in Peru: prevalence of epidemic typhus, trench fever, and relapsing fever. **Clin. Infect. Dis.**, v. 29, p. 434–436, 1999.

REIS N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. **Morcegos do Brasil**. Londrina, 2007.

REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; FREGONEZI, M.N.; ROSSANEIS, B.K. **Mamíferos do Brasil**, Technical Books, 2010, p. 293-462.

REEVES, W.K. Molecular genetic evidence for a novel bacterial endosymbiont of *Icosta americana* (Diptera: Hippoboscidae). **Entomol. New.**, v. 116, p. 263–265. 2005.

REEVES, W.K.; BECK, J.; ORLOVA, M.V.; DALY, J.L.; PIPPIN, K.; REVAN, F.; LOFTIS, A.D. Ecology of Bats, Their Ectoparasites, and Associated Pathogens on Saint Kitts Island. **J. of Med. Entomol.**, v. 53, n. 5, p. 1218-1225. 2016.

REGNERY, R.; TAPPERO. J. Unraveling mysteries associated with cat-scratch disease, bacillary angiomatosis, and related syndromes. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 1, p. 16-21, 1995.

REGNERY, R.L.; SPRUILL, C.L.; PLIKAYTIS, B.D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 1576 – 1589, 1991.

RIESS, T.; DIETRICH, F.; SCHMIDT, K.V.; KAISER, P.O.; SCHWARZ, H.; SCHAFFER, A.; KEMPF, V.A. Analysis of a novel insect cell culture medium-based growth medium for *Bartonella* species. **Appl. Env. Microbiol.**, v. 74, p. 5224 –5227. 2008.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, v. 386, p. 671-674, 1997.

ROUX, V.; RAOULT, D. Body lice as tools for diagnosis and surveillance of reemerging disease. **J. Clin. Microb.**, v. 37, p. 596–599, 1999.

SAIOSONGKORH, W.; ROLAIN, T.M.; SUPUTTAMONGKOL, Y.; RAOULT, D. Emerging *Bartonella* in humans and animals in Asia and Australia. **J. Med. Assoc. Thai.**, v. 92, n. 5, p. 707 – 731, 2009.

SIMMONS, N.B.A. Ordem Chiroptera. In: WILSON, D.E.; REEDER, D.M. **Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference**. 3 ed. v.1. Baltimore: Jons Hopkins University Press, 2005, p. 312-529.

SMITH, I.; WANG, L.F. Bats and their virome: an important source of emerging viruses capable of infecting humans. **Curr. Opin. Virol.**, v. 3, p. 84–91, 2013.

SCHULTZ, M.G. A history of bartonellosis (Carrion's disease). **Am J Trop Med Hyg**, v. 17, p. 503–515, 1968.

VERMEULEN, M.J.; VERBAKEL, H.; NOTERMANS, D.W.; REIMERINK, J.H.; PEETERS, M.F. Evaluation of sensitivity, specificity and cross-reactivity in *Bartonella henselae* serology. **J. Med. Microb.**, v. 59, p. 743–745, 2010.

VENNING, J.A. The etiology of disordered action of the heart: a report on 7,803 cases. **Br. Med. J.**, v. 2, p. 337–339, 1919.

VINSON, J.W. In vitro cultivation of the rickettsial agent of trench fever. **B. W. Heal. Org.**, v. 35, p. 155–164, 1966.

VINSON, J.W.; VARELA, G.; MOLINA-PASQUEL, C. Trench fever. III. Induction of clinical disease in volunteers inoculated with R Quintana propagated on blood agar. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 18, p.713–722, 1969.

WRAY, A.K.; WRAY, A.K.; OLIVAL, K.J.; MORÁN, D.; LOPEZ, M. R.; NAVARRETE-MACIAS, D.A.I.; LIANG, E.; SIMMONS, N.B.; LIPKIN, W.I.; DASZAK, P.; SIMON J. A. Viral diversity, Prey Preference, and *Bartonella* Prevalence in *Desmodus rotundus* in Guatemala. **EcoHealth**, v. 13, p. 761–774, 2016.

WESSLEN, L.; EHRENBORG, C.; HOLMBERG, M.; MCGILL, S.; HJELM, E.; LINDQUIST, O.; HENRIKSEN, E.; ROLF, C.; LARSSON, E.; FRIMAN, G. Subacute bartonella infection in Swedish orienteers succumbing to sudden unexpected cardiac death or having malignant arrhythmias. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 33, n. 6, p. 429-38, 2001.

WILLIG, M.R. Composition, microgeographic variation and sexual dimorphism in caatingas and cerrado bat communities from northeastern Brazil. **Bull. Oakland. Carn. Mis. of Nat. Hist.**, v. 23, p. 1-131. 1983.

[www.cdc.gov](http://www.cdc.gov), acessado em: 27/01/2018.

ZHRINGER, U.; LINDNER, B.; KNIREL, Y.A.; VAN DEN AKKER, W.M.; HIESTAND, R.; HEINE, H.; DEHIO, C. Structure and biological activity of the short-chain lipopolysaccharide from *Bartonella henselae* ATCC 49882T. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 21046–21054, 2004.

ZDRODOVSKII, P.F.; GOLINEVICH, H.M. **The rickettsial diseases**. London: Pergamon, 1960.

RAO, H.X.; YU, J.; GUO, P.; MA, Y.C.; LIU, Q.Y.; JIAO, M.; MA, Z.W.; GE, H.; WANG, C.X.; SONG, X.P.; SHI, Y.; LI, D.M. *Bartonella* species detected in the plateau pikas (*Ochotona curzoniae*) from Qinghai plateau in China. **Biom. Env. Sci.**, v.28, n.9, p.64-678, 2015

## ANEXOS

## ANEXO 01 – LISTA DE CIDADES DO ESTADO DE SÃO PAULO

**Anexo 1** - Procedência geográfica de morcegos neotropicais do Estado de São Paulo utilizados para pesquisa molecular de *Bartonella* spp., segundo o número de espécies por municípios.

Cidade	Número de morcegos
Espirito Santo do Pinal	5
Araragua	40
Ribeirão Preto	65
Penápolis	1
Paulinha	5
Tietê	1
Marília	4
São Bernado do Campo	4
Andradina	1
São José do Rio Pardo	2
Itapira	3
São João da Boa Vista	5
Cosmópolis	11
Franca	8
Araras	1
Atibaia	2
Jardinópolis	2
Descalvado	1
Indaiatuba	1
Mariporã	2
Louveira	1
Santo André	1
Mogi Guaçu	1
Charqueada	1
Sertãozinho	23
São Paulo	4
Campinas	58
Serrana	1
Monte Mor	2
Caconde	1
São Sebastião	1
Santa Fé do Sul	3
Cerquilha	1
Monguaguá	2
Arujá	1
Jacarei	2
Nova Odessa	2
Bauru	1
CONTINUA	
Itapeva	2

Caçapava	1
Tupã	1
Cabreuva	1
Americana	1
Urupés	1
Guarujá	1
Jaguaruina	2
Borborema	1
Mococa	2
Santa Barbara d'Oeste	4
Guarujá	1
Jaboticabal	5
Valinhos	12
Sumaré	6
Itatiba	1
Mauá	3
Caraguatatuba	3
Rio Claro	5
Mogi Mirim	2
Pereira Barreto	1
Limeira	2
São Vicente	1
São José dos Campos	3
Catanduva	2
Vinhedo	1
Cravinho	1
Olimpia	1
Garça	1
Tabaëui	1
São Roque	2
<b>TOTAL</b>	<b>341</b>

## ANEXO 02 - PARECER DA CEUA IEC

CEUA



Certificado nº 32/2017

## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 33/2017, intitulado “**Pesquisa molecular de *Bartonella* spp. no tecido hepático de quirópteros neotropicais**” sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Alex Junior Souza de Souza**, está de acordo com os PRINCÍPIOS ÉTICOS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Evandro Chagas CEUA/IEC, observando que o referido projeto utilizará 574 amostras de fígado de quirópteros armazenadas no banco de espécimes da Seção de Hepatologia do Instituto Evandro Chagas.

Recomendamos que a coordenação mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Deverá ser encaminhado relatório incluindo os resultados finais da pesquisa, no prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.

Ananindeua-PA, 04 de agosto de 2017.

  
 Ana Cláudia Magalhães de Oliveira  
 CEUA/SEAC/IEC/SVS/MS  
 Secretária de Apoio aos Conselhos-SEAC  
 Instituto Evandro Chagas-IEC/SVS/MS

  
 Livia Medeiros Neves Cassel  
 Coordenadora da CEUA/IEC/SVS/MS  
 IEC/CENP/SVS/MS

