

# Prevalência de *Bartonella* spp. em carrapatos coletados na Universidade Estadual de Campinas

Palavras-Chave: *Bartonella*, Carrapatos, *Doenças Negligenciadas*

Autoras/es:

Allisson Daniel de Carvalho Gusmão, Instituto de Biologia  
Ma. Luciene Silva Dos Santos, Faculdade de Ciências Médicas  
Dra. Marina Rovani Drummond, Faculdade de Ciências Médicas  
Rafaela de Paula Silva, Faculdade de Enfermagem  
Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho (orientador), Faculdade de Ciências Médicas

## INTRODUÇÃO:

### *Bartonella* sp. e bartoneloses

*Bartonella* é um gênero de bactérias gram-negativas, bacilares curvadas, 0,6 µm de comprimento, pleomórficas e microaerófilas. São intracelulares facultativas e infectam eritrócitos e células endoteliais. Possuem distribuição global e as infecções por elas causadas são consideradas negligenciadas, reemergentes, costumam ser crônicas e podem ser fatais (1).

Já foram identificadas quarenta e cinco espécies e subespécies do gênero *Bartonella*, sendo 17 delas patogênicas aos seres humanos. Três espécies são responsáveis pela maior parte das enfermidades humanas: *Bartonella bacilliformis*, *Bartonella quintana* e *Bartonella henselae* (1).

As principais formas de transmissão das *Bartonella* spp. são por vetores artrópodes hematófagos de hospedeiros animais ou humanos infectados para novos hospedeiros.

A infecção pode causar bacteremia assintomática, como demonstrado em estudo com 500 doadores de sangue do Hemocentro da Unicamp (2). Entre as causas de risco para a infecção nestes doadores encontrou-se picadas por carrapatos (3). As bartoneloses são doenças na maioria das vezes zoonóticas e podem apresentar-se com quadros auto-limitados como a doença da arranhadura do gato (DAG), mas podem também ter manifestações graves, incluindo condições potencialmente fatais como a endocardite. A DAG é a doença mais conhecida em humanos (1). É causada pela *B. henselae*, cujo reservatório principal é o gato doméstico e a pulga (*Ctenocephalides felis*) seu principal vetor. A doença é caracterizada por linfadenite autolimitada associada à febre, além de manifestações hepáticas, ósseas e oculares, entre outras (4).

Outra manifestação clínica é a doença de Carrión, causada pela *B. bacilliformis*. Ela é transmitida pela fêmea do flebótomo

*Lutzomyia verrucarum* e endêmica das regiões de altitudes elevadas dos Andes peruanos e regiões do Equador e Colômbia (5). É uma doença bifásica: a fase aguda, denominada de febre de Oroya, que cursa com febre, anemia hemolítica e imunodeficiência transitória, e a fase crônica, a verruga peruana, caracterizada por lesões cutâneas vasoproliferativas (6). Já a *B. quintana* é transmitida pelo piolho de corpo *Pediculus humanus humanus*, responsável pela febre das trincheiras, doença caracterizada por quadros febris recorrentes. A angiomatose bacilar é uma doença causada pela *B. henselae* e pela *B. quintana* e apresenta proliferação neovascular nos órgãos, predominantemente na pele e no fígado (7).

A infecção por *Bartonella* spp. pode causar comumente febre, exantemas e vasculites que são expressões clínicas da febre maculosa, uma riquetsiose potencialmente fatal e endêmica na região de Campinas (7).

#### **Vetores, entre eles os carrapatos**

Sendo as *Bartonella* spp. amplamente distribuídas na natureza, sabe-se que não só os gatos, mas os cachorros são reservatórios das bactérias. Animais hematófagos como como pulgas, piolhos do corpo, mosquitos e morcegos são responsáveis pela transmissão, através do repasto sanguíneo.

Além dos vetores citados, o carrapato tem sido considerado um transmissor de *Bartonella* spp. (8). Ele também é responsável por transmitir outras doenças como a febre

maculosa, a doença de Lyme, a doença de Powassan e outras enfermidades afetando não apenas felinos e canídeos, mas também humanos (9,10).

Apesar de algumas espécies de carrapatos terem sido encontradas naturalmente infectadas pela *Bartonella* spp., sua transmissão transovariana, transestadial e para o ser humano ainda é pouco estudada. Não foram encontradas *Bartonella* spp. em carrapatos da espécie *Amblyomma sculptum* coletados em campo. (11)

Esta espécie, popularmente conhecida como carrapato estrela, é o principal vetor da *Rickettsia rickettsii*, causadora da febre maculosa, na região de Campinas como em todo estado de São Paulo (12). São de extrema importância para a saúde pública e são encontrados em locais de mata rasteira, possuem baixa especificidade parasitária, com isso podem ser encontrados em diversos hospedeiros, o que justifica a sua alta dispersão (13).

#### **OBJETIVOS:**

1. Avaliar a presença de *Bartonella* sp. nos carrapatos presentes em ambiente do campus de Campinas da Unicamp.
2. Padronizar as técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) para o diagnóstico de infecção por *Bartonella* sp. em carrapatos coletados em campo.

#### **METODOLOGIA:**

##### **Coleta de Vetores**

A coleta foi realizada em uma área de preservação permanente dentro do campus de Campinas da Unicamp. Foi utilizada como técnica o arrasto de flanela e a inspeção visual. Para a realização das técnicas moleculares eram esperadas coletar um número amostral de no mínimo 50 indivíduos. Os vetores foram coletados, sendo posteriormente acondicionados em tubos cônicos 50ml e armazenados em -20°C.

### **Identificação Taxonômica dos Carrapatos**

Para a identificação taxonômica dos espécimes coletados foram utilizadas chaves dicotômicas, contando com o auxílio da Profa. Dra. Patrícia Jacqueline Thyssen, do Instituto de Biologia (14,15).

### **Preparo dos carrapatos**

Os carrapatos foram descontaminados em lavagem de imersão por cinco minutos em etanol 70°, seguidos de três imersões por cinco minutos em PBS estéril. Cada carrapato foi colocado em nitrogênio líquido e em seguida macerado.

### **Extração de DNA dos carrapatos**

A extração dos carrapatos foi realizada usando *Kit E.Z.N.A.® – Tissue DNA Kit, Omega Bio-Tek*, conforme o protocolo.

### **Detecção Molecular**

O diagnóstico das infecções foi feito por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional, *nested* e em tempo real.

### **PCR controle**

Para garantir a qualidade da extração de DNA dos carrapatos foram feitas reações específicas para um gene de eucariotos (16).

### **PCR convencional**

Todas as amostras de DNA extraídas dos carrapatos foram submetidas à PCR convencional para *Bartonella* sp. baseado na região ITS, a região intergênica 16S-23S do rRNA (17).

### **PCR de dupla amplificação (*nested*)**

Todas as amostras dos carrapatos foram testadas por PCR *nested* espécie-específica para a região alvo que codifica a proteína *FtsZ* que atua na divisão celular da *B. henselae* (18). Foi utilizada a enzima da Promega (GoTaq® Flexi).

### **PCR em tempo real para *B. henselae***

Todas as amostras dos carrapatos foram submetidas a PCR em tempo real utilizando *primers* para amplificação da região do gene do citrato sintase (*gltA*) no sistema *Sybr® Green* utilizando a enzima *Fast SYBR™ Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) (19).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

### **Local de coleta**

A coleta foi a área de preservação ambiental localizada em frente ao futuro Instituto de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, ao lado do Banco do Brasil e atrás do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório, conforme imagem da

figura 1. Neste local são encontrados animais silvestres, principalmente capivaras. Foram coletados (figura 2) 29 carrapatos machos adultos (figuras 3 e 4), 29 fêmeas adultas.



**Figura 1.** Área de preservação ambiental, Unicamp, Campinas, SP. Disponível em: Google Maps.



**Figura 2.** Carrapato adulto coletado através da flanela de arrasto.

### Identificação taxonômica

Todos os carrapatos coletados foram da espécie *Amblyomma sculptum*, que compõem uma das seis espécies que pertencem ao complexo específico denominado *Amblyomma cajennense*. É uma das espécies mais importantes na área médico-veterinária no Brasil. Costumam parasitar capivaras e cavalos, porém também parasitam répteis,

aves e pequenos e grandes mamíferos, incluindo humanos.

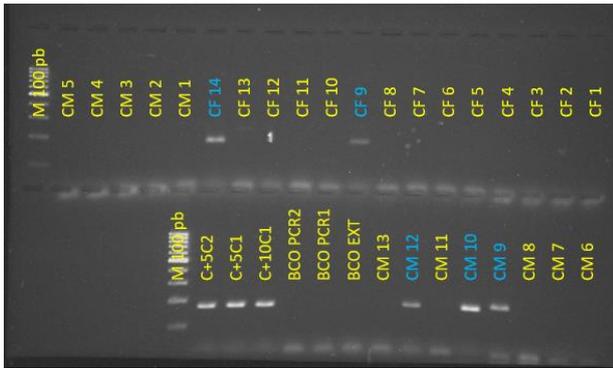


**Figura 3.** Vista dorsal do macho de *Amblyomma sculptum*.

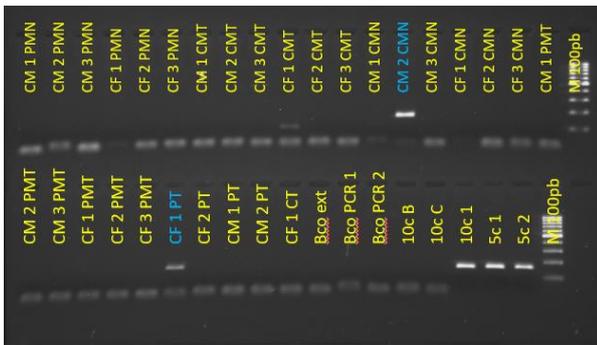


**Figura 4.** Vista ventral do macho de *Amblyomma sculptum*.

Os resultados documentaram a presença de *B. henselae* em 19,6% dos carrapatos coletados em um único local dentro do campus de Campinas da Universidade Estadual de Campinas. Das 56 amostras, sete (12,5%) foram positivas na PCR *nested* espécie-específica para a região alvo que codifica a proteína *FtsZ* de *B. henselae* e quatro das 56 amostras (7,14%) foram positivas para *B. henselae* utilizando a PCR em tempo real.



**Figura 5.** Reação em Cadeira da Polimerase (PCR) *nested* 2ª reação. Amostras CF14, CF9, CM12, CM10 e CM9 apresentam bandas na altura esperada para *B. henselae*. Sendo CF = carrapato fêmea e CM = carrapato macho



**Figura 6.** PCR *nested* 2ª reação. Amostras CM 2 CMN e CF 1 PT apresentam bandas na altura esperada para *B. henselae*. Sendo CMN = cortado e macerado em nitrogênio líquido e PT = picotado em tampão.

## CONCLUSÕES:

Todos os carrapatos coletados no campus de Campinas da Unicamp foram da espécie *A. sculptum* e em um de cada cinco indivíduos foi possível demonstrar a presença de *B. henselae*. A potencial coinfeção destes carrapatos com *R. rickettsii* e a relevância clínica destes achados ainda precisam ser estudadas.

## BIBLIOGRAFIA

1. Angelakis E, Raoult D. Pathogenicity and treatment of *Bartonella* infections. Int J Antimicrob Agents [Internet]. 2014;44:16–25.
2. Pitassi LH, de Paiva Diniz PP, Scorpio DG, Drummond MR, Lania BG, BarjasCastro ML, et al. Bartonella spp. bacteremia in blood donors from Campinas, Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2015.
3. Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB, Kasten RW, Vayssier-Taussat M, et al. (2009) Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. Vet Res 40: 29.
4. Maguina, C.; Guerra, H.; Ventosilla, P. Bartonellosis. Clin Dermatol, v. 27, n. 3, p. 271- 80, 2009.
5. Dehio, C. Molecular and cellular basis of *Bartonella* pathogenesis. Annu Rev Microbiol, v. 58, p. 365-90, 2004.
6. Pachas-Chávez, P. Enfermedad de Carrión (bartonellosis) en el Perú. Oficina General de Epidemiología 2001.
7. Lins KA, Drummond MR, Velho PE. Cutaneous manifestations of bartonellosis. An Bras. Dermatol. 2019;
8. Angelakis, E., Billeter, S. A., Breitschwerdt, E. B., Chomel, B. B., & Raoult. Potential for tick-borne bartonellosis. Emerging Infectious Diseases, 2010 16(3), 385-391.
9. Gonçalves LR, Harrus S, Gutiérrez R, et al. Molecular detection and genetic diversity of *Bartonella* species in large ruminants and associated ectoparasites from the Brazilian Cerrado. Transbound Emerg Dis. 2020;00:1–10.
10. Lafri I, El Hamzaoui B, et al. Detection of relapsing fever *Borrelia* spp., *Bartonella* spp. and Anaplasmataceae bacteria in argasid ticks in Algeria, (2017).
11. Camargo, Jaqueline Valéria; Barros-Battesti, Darci Moraes. *Bartonella* spp.: curva de crescimento em meio Tryptic Soy Broth (TSB) suplementado e avaliação de transmissão transovariana e perpetuação transestadial através de infecção *in vitro* em *Amblyomma sculptum* (acari: ixodidae). 2021. 84 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2021
12. Horta, M.C.; Labruna, M.B.; et al. Prevalence of antibodies to spotted fever group *rickettsiae* in humans and domestic animals in a Brazilian Spotted fever- endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group *Rickettsia*. Am J trop Med and Hyg, v.71, n.1, p.93-97, 2004.
13. Labruna, M.B.; Kerber, et al. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. Vet Parasitology., v.97.p.1-14, 2001.
14. Barros-Battesti, D. M.; Arzua, M; Bechara, G. H. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006. 223 p.
15. Koller, W.W.; matias, J. Coleta, preservação e identificação de carrapatos. In: ANDREOTTI, R.; KOLLER, W.W.; GARCIA, M.V. (Orgs.). Carrapatos: protocolos e técnicas para estudo. Brasília: EMBRAPA, 2016. p.1-34.
16. Kim MJ, Yoo I, Yang SM, Suh SM, Kim HY. Development and validation of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of chicken, turkey and duck in processed meat products. International Journal of Food Science & Technology. 2018;53:2673-9.
17. Diniz PP, Maggi RG, Schwartz DS., et al. Canine bartonellosis: serological and molecular prevalence in Brazil and evidence of co-infection with *Bartonella henselae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*. Vet Res. 2007;
18. Kawasato KH, de Oliveira LC, Velho PE, Yamamoto L, Del Negro GM, Okay TS. Detection of *Bartonella henselae* DNA in clinical samples including peripheral blood of immune competent and immune compromised patients by three nested amplifications. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2013;55(1):1-6.
19. Staggemeier R, Pilger DA, Spilki FR, Cantarelli VV. Multiplex *sybr®* green-real time PCR (qPCR) assay for the detection and differentiation of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2014;56(2):93-5.