



Ocorrência da infecção por *Bartonella* sp. Em mulheres inférteis e com aborto de repetição

Palavras-Chave: Bartonella, Aborto, Problemas reprodutivos, Infertilidade

Autores(as):

RAFAELA DE PAULA SILVA [FACULDADE DE ENFERMAGEM]

Dra. MARINA ROVANI DRUMMOND [FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS]

Prof. Dr. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO [FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS]

INTRODUÇÃO

As bartoneloses são doenças milenares e apesar do esforço e dos avanços nas pesquisas nas últimas duas décadas, o conhecimento sobre a sua transmissão e patologia ainda é muito limitado (1). *Bartonella* spp. são bactérias cocobacilares, gram-negativas, intracelulares facultativas, pertencentes ao subgrupo alpha-2 da classe Proteobacteria (2), conhecidas por infectarem eritrócitos e células endoteliais geralmente causando bacteremia persistente em seus hospedeiros (3,4).

Há espécies de *Bartonella* que têm distribuição universal, como a *Bartonella henselae*, que é a espécie mais associada a doenças em humanos. Há também a *Bartonella bacilliformis* e a *Bartonella quintana*, também associadas a manifestações clínicas em humanos (5). Embora a infecção por estas bactérias possa ser fatal, como no caso de endocardites, humanos infectados também podem ser assintomáticos, como observado em 500 doadores de sangue do Hemocentro de Campinas, São Paulo, dos quais mais de 20% apresentaram detecção do DNA de *B. henselae* ou o isolamento da bactéria, o que revela a alta prevalência da infecção entre assintomáticos (6). A diversidade das manifestações clínicas observada nas infecções por *Bartonella* spp. está relacionada a vários fatores, entre eles: a variedade de espécies e cepas, o que leva a diferenças na sua patogenicidade e ao desenvolvimento de quadros clínicos mais ou menos graves (7,8); diferenças na resposta imune do hospedeiro e de outros fenômenos como coinfeção, doenças não infecciosas concomitantes e desnutrição (9).

Apesar de poucos estudos publicados sobre o tema, a infecção por *Bartonella* sp. já foi relacionada a distúrbios reprodutivos em animais. Embora Maillard *et al.* não tenham observado relação entre a infecção por *Bartonella bovis* e *Bartonella chomelii* em rebanho de gado leiteiro e sua prole (10), diferentes espécies de *Bartonella* já foram associadas a dificuldades reprodutivas em mamíferos. Distúrbios reprodutivos como aborto e reabsorção fetal foram descritos em gatas experimentalmente infectadas por *B. henselae* (11). Guptill *et al.* demonstraram experimentalmente que a *B. henselae* causa falha reprodutiva em gatas, mas não foi evidenciado a transmissão transplacentária (12). Um estudo recente, que avaliou o potencial de transmissão vertical de várias espécies de patógenos zoonóticos, demonstrou que gatos de rua eram frequentemente positivos para *B. henselae* em tecidos reprodutivos provenientes de amostras de feto e placenta desses animais (13).

Um outro estudo relacionou a presença de *B. henselae* à provável causa do aborto de um potro, sendo essa a primeira documentação da espécie causando aborto em equinos (14). Kosoy *et al.* Isolaram espécies de *Bartonella* em embriões e neonatos de roedores naturalmente infectados (15). Posteriormente, o efeito patogênico nas funções reprodutivas de camundongos BALB/c experimentalmente infectados por *Bartonella birtlesii* foi descrito por Boulouis *et al.* que demonstraram maior porcentagem de morte fetal e menor peso dos fetos quando comparados aos fetos de animais não infectados experimentalmente. A transmissão transplacentária foi documentada pelo isolamento da bactéria de fetos (16).

Siewert *et al.* citam a transmissão vertical de *Bartonella* sp. em pequenos roedores (17).

Também há relato em humanos Breitschwerdt *et al.* (16). Neste relato foi constatada a possível transmissão de *Bartonella henselae* e *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* de uma mulher para seus filhos gêmeos, concebidos após fertilização *in vitro*. Um dos recém-nascidos morreu nove dias após o nascimento, devido a síndrome do coração esquerdo hipoplásico. O DNA de *Bartonella* sp. foi detectado do sangue e/ou de tecido parafinado dos quatro membros da desta família (da mulher, de seu esposo e dos gêmeos). Os autores ressaltam que, como houve dificuldades da mulher em engravidar naturalmente e também após consecutivas fertilizações *in vitro*, o caso evidencia a possibilidade da infecção por *Bartonella* sp. influenciar negativamente o desempenho reprodutivo humano. O caso relatado por Velho *et al.* também reforça a hipótese de transmissão vertical de *Bartonella* sp. em humanos e descreve uma criança de três anos, nascida de uma mulher assintomática, para quem se aventou a possibilidade de infecção por *B. henselae* transmitida verticalmente por apresentar anemia, icterícia e hepatoesplenomegalia desde o nascimento. Esta suspeita foi reforçada a partir de achados de microscopia eletrônica de transmissão de fragmento hepático da paciente de biópsia realizada com 12 dias de vida e da detecção molecular por reação espécie-específica de DNA de *B. henselae* diretamente de três amostras sanguíneas da criança e uma amostra sanguínea da mãe. Os amplificadores foram sequenciados e 100% homólogos a *B. henselae*.(18)

A possibilidade de transmissão vertical de *Bartonella bacilliformis* também já foi relatada em um recém-nascido com manifestação aguda da bartonelose de Carrión cuja mãe apresentava lesões cutâneas da fase crônica da doença (19).

Bilavisky *et al.* descreveram oito gestantes com diagnóstico de doença da arranhadura de gato (DAG) durante 19 anos de estudo de vigilância de casos desta doença em Israel. Uma delas apresentou um aborto espontâneo sem relação documentada com a bartonelose e as demais não apresentaram complicações obstétricas nem seus recém-nascidos manifestaram expressões clínicas de bartonelose (20). Agarwal *et al.*, por outro lado, reportou um caso de rotura hepática com diagnóstico de infecção por *B. henselae* causada pela doença da arranhadura do gato, em uma gestante de 24 anos de idade (21).

Tendo em vista os estudos acima citados sobre a relação da *Bartonella* sp. com o status reprodutivos, pôde-se perceber que houve uma recorrência de distúrbios reprodutivos em animais infectados com a bactéria em comparação com o grupo controle, por isso sugeriu-se investigar a prevalência da infecção por *Bartonella* spp. em mulheres com dificuldades para engravidar e com abortos de repetição.

METODOLOGIA

Trata-se de uma pesquisa bibliográfica que foram utilizadas as bases de dados online LILACS, SciELO,

PubMed. Inicialmente foi realizada uma busca sobre a infecção por *Bartonella* sp. correlacionada com problemas de reprodução e fertilidade, tendo como objetivo identificar estudos que demonstram que a bactéria pode estar relacionada com infertilidade e abortos de repetição, através da revisão de literatura sobre o tema. Na busca inicial foram considerados os títulos e os resumos dos artigos para a seleção ampla de prováveis trabalhos de interesse, utilizando-se como palavras-chave os termos *bartonella*, aborto, problemas reprodutivos, infertilidade. Foram utilizados como critérios de inclusão os textos que abordavam a *Bartonella* sp. como possível causa de problemas reprodutivos, textos em português e inglês, publicados entre 1998 até 2022. Foi realizada uma pesquisa ampla que abrange artigos mais antigos pela lacuna existente de pesquisas sobre o tema estudado.

Além disso, fez-se uma pesquisa preliminar em sangue de três pacientes doadores, foi coletado de forma asséptica um volume total de 8 mL de sangue em tubo com EDTA de três mulheres com queixas de infertilidade e/ou de aborto de repetição acompanhadas na clínica especializada em de Campinas, SP. Dessas amostras foram realizados:

- **Cultura**

Foram realizadas culturas líquidas das amostras de sangue total. Cerca de 1 mL do sangue total foi inoculado em 4mL de meio líquido (22). As culturas foram mantidas em agitação constante em estufa a 35°C com 5% de CO₂ durante 14 dias.

- **Extração e Amplificação do DNA**

Foram extraídos o DNA do sangue total, da cultura líquida de enriquecimento de *Bartonella* spp.. Foi utilizado o *kit* comercial E.Z.N.A. Tissue DNA (Omega), conforme as instruções do fabricante.

- **Análises moleculares**

Em todas as reações foram adicionados dois controles:

“Controle negativo de PCR”: tubo com apenas os reagentes de cada reação.

“Controle positivo de PCR”: diluições seriadas de DNA de *B. henselae* de modo a determinar a sensibilidade e o limite de detecção de cada reação.

Para as reações de PCR convencional e dupla amplificação foi utilizada a enzima da Promega (GoTaq® Flexi).

- **PCR convencional controle (*GAPDH*)**

Todas as amostras foram testadas com PCR para amplificação de um gene constitutivo. A região escolhida é um fragmento do gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) (23), o qual codifica uma enzima relacionada com a glicólise e expressa por todas as células de mamíferos. Esta reação tem como objetivo a verificação da qualidade do DNA extraído, além da certificação da inexistência de inibidores de amplificação.

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

Todas as amostras foram testadas por PCR *nested* espécie-específica para a região alvo que codifica a proteína FtsZ que atua na divisão celular da *B. henselae* (24). O tamanho de amplificado esperado para a primeira reação do *nested* é de 354 pares de base e já na segunda reação é de 218 pares de base.

- **PCR convencional (*gltA*)**

Todas as amostras foram testadas por PCR convencional para *Bartonella henselae* baseado na região *gltA* do gene da citrato sintase (CS), também espécie-específica (25).

RESULTADOS

Foram encontrados 52 artigos referentes às bartoneloses, sendo excluídos aqueles que não atendiam aos critérios estabelecidos. Ao final, foram selecionados 23 artigos, dentre eles: três publicados no ano de 1998, dois em 2001, dois em 2004, dois em 2006, um em 2007, um em 2008, um em 2009, dois em 2010, um em 2011, dois em 2012, um em 2015, um em 2016, um em 2018, um em 2021 e um em 2022.

Das amostras:

- **PCR controle – Sangue total**

Todas as amostras foram testadas com PCR para amplificação do gene constitutivo. O tamanho esperado do amplificado é de 350pb. Todas as amostras foram validadas.

- **PCR de dupla amplificação (*nested*) – Sangue Total e Cultura Líquida**

Todas as amostras foram submetidas a PCR de dupla amplificação espécie-específica para a região alvo *ftsZ* da *B. henselae* e dentre elas no sangue total, duas amostras amplificaram o DNA da *B. henselae* e na cultura líquida não houve amplificação do gene. O tamanho esperado do amplificado é de 218pb.

- **PCR convencional (*gltA*) – Sangue Total e Cultura líquida**

Todas as amostras foram testadas por PCR convencional para *B. henselae* baseado na região *gltA*, do gene da citrato sintase (CS), espécie-específica. Dentre elas, duas amostras amplificaram o gene nas amostras de sangue total e uma amostra amplificou o gene na cultura líquida. O tamanho esperado do amplificado é de 191pb.

Nas três pacientes com infertilidade ou abortos de repetição foi possível detectar o DNA de *B. henselae*.

DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A revisão de literatura, apresentada na introdução, destaca a necessidade de avaliar o papel da infecção por *Bartonella* spp. em mulheres com abortos de repetição e o papel da transmissão transplacentária destas bactérias em humanos, da mesma forma que em camundongos, gatos e cavalos. A distribuição dos artigos ao longo dos anos aponta que apesar de encontrado poucos artigos sobre o tema, o assunto é uma lacuna que vem se arrastando sem que ainda tenha sido respondida a questão sobre a influência da infecção por *B. henselae* na condição reprodutiva de mulheres.

Além disso, o resultado encontrado com as análises moleculares das três amostras sanguíneas das pacientes reforça ainda mais a necessidade de se aventar a possibilidade de infecção por *Bartonella* spp. em mulheres inférteis ou com abortos de repetição, visto que todas as amostras amplificaram o DNA de *B. henselae* em pelo menos uma das reações.

Vale destacar que esses resultados são dados preliminares de um trabalho que está em andamento, no qual será feito a análise molecular de um número maior de mulheres com problemas reprodutivos, utilizando também um grupo controle para possibilitar a comparação.

BIBLIOGRAFIA:

1. KAISER, P. O. *et al.* Bartonella spp.: throwing light on uncommon human infections. International

- journal of medical microbiology: IJMM. 2011 Jan;301(1):7-15.
2. ROLAIN, J.M. *et al.* Recommendations for treatment of human infections caused by Bartonella species. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Jun;48(6):1921-33
 3. PULLIAINEN, A.T. *et al.* Persistence of Bartonella spp. stealth pathogens: from subclinical infections to vasoproliferative tumor formation. FEMS microbiology reviews. 2012 Jan 9
 4. BILLETER, S.A. *et al.* Vector transmission of Bartonella species with emphasis on the potential for tick transmission. Medical and veterinary entomology. 2008 Mar;22(1):1- 15.
 5. DEHIO, C. *et al.* Molecular and cellular basis of bartonella pathogenesis. Annual review of microbiology. 2004;58:365-90.
 6. DRUMMOND, R. M. *et al.* Comparison of molecular methods for Bartonella henselae detection in blood donors. v. 17, n. 6, p. e0011336–e0011336, 1 jun. 2023.
 7. BERGHOFF, J. *et al.* Bartonella henselae exists as a mosaic of different genetic variants in the infected host. Microbiology. 2007 Jul;153(Pt 7):2045-51.
 8. BREITSCHWERDT, E. B. *et al.* Bartonellosis, One Health and all creatures great and small. Vet Dermatol. 2017 Feb;28(1):96-e21.
 9. Mogollon-Pasapera E, Otvos L, Jr., Giordano A, Cassone M. Bartonella: emerging pathogen or emerging awareness? International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases. 2009;13(1):3-8.
 10. MAILLARD, R. *et al.* Effects of Cow Age and Pregnancy on Bartonella Infection in a Herd of Dairy Cattle. Journal of Clinical Microbiology, v. 44, n. 1, p. 42–46, 1 jan. 2006.
 11. BOULOUIS, H. J. *et al.* Kinetics of Bartonella birtlesii infection in experimentally infected mice and pathogenic effect on reproductive functions. Infect Immun 69: 5313–5317, 2001
 12. GUPTILL, L. *et al.* Evidence of reproductive failure and lack of perinatal transmission of Bartonella henselae in experimentally infected cats. Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 65, n. 2-4, p. 177–189, out. 1998.
 13. MANVELL, C. *et al.* Prevalence of Vector-Borne Pathogens in Reproductive and Non-Reproductive Tissue Samples from Free-Roaming Domestic Cats in the South Atlantic USA. Pathogens, v. 10, n. 9, p. 1221, 21 set. 2021.
 14. JOHNSON, R. J. *et al.* Identification of Bartonella henselae in an Aborted Equine Fetus. Sage journals Vol 46, Issue 2, 2009.
 15. KOSOY, M. Y. *et al.* Isolation of Bartonella spp. from embryos and neonates of naturally infected rodents. J Wildl Dis. 1998;34: 305–309. pmid:9577777
 16. BREITSCHWERDT, E. B. *et al.* Molecular evidence of perinatal transmission of Bartonella vinsonii subsp. erkhoffii and Bartonella henselae to a child. J Clin Microbiol. 2010;48: 2289– 2293. pmid:20392912
 17. SIEWERT, L. K. *et al.* Adaptive immune defense prevents Bartonella persistence upon transplacental transmission. PLOS Pathogens, v. 18, n. 5, p. e1010489, 17 maio 2022.
 18. VELHO, P. E. N. F. *et al.* Bartonella henselae AS A PUTATIVE CAUSE OF CONGENITAL CHOLESTASIS. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 58, 11 jul. 2016.
 19. TUYA, X. L. *et al.* Possible Vertical Transmission of Bartonella bacilliformis in Peru. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 92, n. 1, p. 126–128, 7 jan. 2015.
 20. BILAVSKY, E. M. D. *et al.* Cat Scratch Disease During Pregnancy. Obstetrics & Gynecology: March 2012 – Volume 119 - Issue 3- p 640-64 4.
 21. MAGGI, R. G. *et al.* Novel chemically modified liquid medium that will support the growth of seven Bartonella species. Journal of Clinical Microbiology, v. 43, n. 6, 2005. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15956379> >.
 22. BIRKENHEUER, A. J. *et al.* Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of Babesia gibsoni (Asian Genotype) and B. canis DNA in Canine Blood Samples. Journal of Clinical Microbiology, v. 41, n. 9, p. 4172–4177, set. 2003
 23. KAWASATO, K.H. *et al.* 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 2013 Jan-Feb;55(1):1-6.
 24. DRUMMOND, M. R. *et al.* Cryptogenic hepatitis patients have a higher Bartonella sp.-DNA detection in blood and skin samples than patients with non-viral hepatitis of known cause. PLoS Negl Trop Dis, v. 16, n. 7, p. e0010603, 2022. ISSN 1935-2727.