



# Prevalência de *Bartonella* sp. em válvulas cardíacas parafinadas de pacientes com endocardite infecciosa

**Palavras-Chave:** Bartonella, Cirurgia Cardíaca, Endocardite

**Autores(as):**

**SAYROS AKYRO SOARES MARTINS [FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS]**

**Dra. MARINA ROVANI DRUMMOND [FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS]**

**Profa. Dra. MARIA LETÍCIA CINTRA [FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS]**

**Prof. Dr. LINDEMBERG DA MOTA SILVEIRA FILHO [FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS]**

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

---

## INTRODUÇÃO

*Bartonella* spp. são bactérias Gram negativas, de natureza altamente fastidiosa e intracelulares facultativas, que infectam naturalmente eritrócitos e células endoteliais (1,2). O gênero compreende 47 espécies (3), das quais três são os principais agentes causadores de doenças em humanos: *Bartonella bacilliformis*, *Bartonella quintana* e *Bartonella henselae* (1). Algumas espécies de *Bartonella* podem causar doenças fatais em humanos, incluindo endocardite infecciosa (EI). A EI é um processo infeccioso da superfície valvar cardíaca, principalmente em indivíduos com lesões pré-existentes (2). Naturalmente, a superfície endocárdica é resistente à colonização por microrganismos. No entanto, traumas resultantes de turbulência, fluxo de alta pressão e estados de hipercoagulação ou inflamação podem levar à formação de fibrina e trombos de plaquetas no local da válvula cardíaca. Durante bacteremias, pode ocorrer adesão bacteriana na válvula, levando à colonização e formação de vegetações, caracterizando a EI (4). A EI é uma condição grave e potencialmente fatal com altas taxas de morbidade e mortalidade. Os principais agentes etiológicos são os estreptococos e estafilococos, destacando-se o *Staphylococcus aureus*, que pode causar infecção aguda e rápida progressão da doença (5).

A endocardite com cultura negativa (ECN) representa cerca de 16% a 23% dos casos de endocardite infecciosa, e a principal dificuldade na definição do agente é o uso prévio de antibióticos (6,7). Em geral, considera-se que a CNE é causada principalmente pela *Coxiella burnetii*, responsável pela febre Q, uma zoonose que afeta acidentalmente o ser humano. A *C. burnetii* é responsável por 10% dos casos de CNE (8). As *Bartonella* spp. são o segundo grupo de agentes mais associados à CNE (9). Entre as espécies de *Bartonella* causadoras de endocardite infecciosa em humanos, *B. quintana* e *B. henselae* representam cerca de 95% dos casos (7). A endocardite causada por essas bactérias geralmente requer cirurgias valvares (2).

Em estudo realizado no Instituto do Coração (Incor), São Paulo, contudo, as *Bartonella* spp. foram diagnosticadas duas vezes mais que a *C. burnetii*. A *B. henselae*, que é a principal espécie a infectar o homem, foi sequenciada em quatro dos seis casos em que foi possível o sequenciamento. Dos 10 pacientes com EI por *Bartonella* spp. identificados, seis precisaram de cirurgia cardíaca (7). A *B. henselae* pode causar também infecção assintomática e formação de biofilme. O biofilme poderia predispor a proliferação de outros agentes na superfície da vegetação, levando a EI com apenas uma das etiologias definidas, como sugere o estudo de Lamas et al., 2012, onde a biologia molecular permitiu a detecção de uma coinfeção de *Bartonella* sp. com uma bactéria do grupo *Streptococcus oralis* em um dos casos entre 51 amostras parafinadas de válvulas cardíacas de pacientes com EI (10). O primo isolamento das *Bartonella* spp. mesmo em condições especiais exigidas por essas bactérias é raro, e, por isto, métodos moleculares para detecção como PCR convencional, *nested* PCR e PCR em tempo real podem ser utilizadas para o diagnóstico (7). Drummond et al., 2023, demonstraram a necessidade da combinação de diferentes métodos moleculares para diminuir as chances de resultados falso-negativos em amostras de doadores de sangue (11). No Hospital das Clínicas da Unicamp não houve diagnóstico de EI por *Bartonella* spp. em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca no período do estudo.

O objetivo do estudo foi avaliar a prevalência da detecção do DNA de *Bartonella* sp. em válvulas cardíacas parafinadas de pacientes com EI submetidos à cirurgia cardíaca ou autopsiados no Hospital das Clínicas da Unicamp.

## **METODOLOGIA**

Foram recuperados os blocos de valvas cardíacas de pacientes com endocardite bacteriana enviadas ao Departamento de Anatomia Patológica pela equipe da cirurgia cardíaca após cirurgia para substituição valvar realizadas no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual (HC–Unicamp) de Campinas ou com diagnóstico de endocardite à autópsia no período de 2009 a 2020.

O projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp.

### **Coleta e processamento de amostras valvares**

Foi obtida uma lista dos pacientes com lesões valvares no Departamento de Anatomia Patológica do HC da Unicamp. Desta lista selecionou-se aqueles com diagnóstico de endocardite e/ou que apresentavam vegetações valvares.

Foram incluídos pacientes que passaram por substituição de válvulas cardíacas decorrente de endocardite e pacientes autopsiados com o diagnóstico de EI cujas amostras valvares removidas cirurgicamente ou coletadas na autópsia estavam armazenadas no blocário do departamento de Anatomia Patologia da Unicamp. Não foram incluídos aqueles submetidos à mesma cirurgia por outros motivos ou pacientes autopsiados sem o diagnóstico de EI.

Conforme se vê no fluxograma da figura 1, foram selecionadas amostras de lâminas histológicas coradas por Hematoxilina e Eosina de fragmentos das valvas cardíacas provindas de biópsias e autópticas. Através da análise microscópica de tais amostras foram destacadas regiões específicas de

interesse das amostras com maior probabilidade de encontrar DNA da *B. henselae*, tais como locais com maior concentração de infiltrado inflamatório e presença de vegetações.

Em seguida foram selecionados e obtidos os blocos de parafina das amostras valvares correspondentes as lâminas selecionadas. De forma manual e com o auxílio de lâminas de bisturi individuais para cada bloco, foram extraídos fragmentos das regiões de interesse. As amostras foram identificadas, seguindo a ordem cronológica da mais antiga para a mais recente.

Após extração, os fragmentos valvares passaram por protocolo de desparafinização. Foram armazenados individualmente 25 miligramas das amostras em tubos estéreis de 1,5 ml, adicionando em cada um 480 microlitros de PBS (em pH de 7,4) e 20 microlitros de Tween20 a 20%. Após breve mistura no vórtex, os tubos devem ser incubados em banho-maria a 90°C por 10 minutos e, após isso, centrifugados a 10000 xg por 15 minutos.

### Extração e amplificação do DNA a partir do tecido valvar desparafinado

Após a desparafinização dos tecidos foi realizada a extração do DNA a partir dos fragmentos das amostras do tecido valvar com o *kit* comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen®) de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do DNA extraído foi feita por meio de equipamento Nanodrop.

Todas amostras foram testadas, então, submetidas a PCR convencional para um gene constitutivo de mamíferos (*GAPDH*) (10) a fim de verificar a qualidade do DNA extraído e certificar a inexistência de inibidores de amplificação.

Em seguida foram realizadas PCR convencional gênero-específica cujo gene alvo foi a região ITS e duas PCRs específica para *B. henselae*, para amplificação do gene da citrato sintase (*gltA*), convencional e em tempo real qualitativo pelo sistema Sybr® Green (3). Em todas as reações foram utilizados amostras controle, brancos de mix e de PCR. Para a reação em tempo real foi utilizada a enzima Fast SYBR™ Green Master Mix (ThermoFisher Scientific)

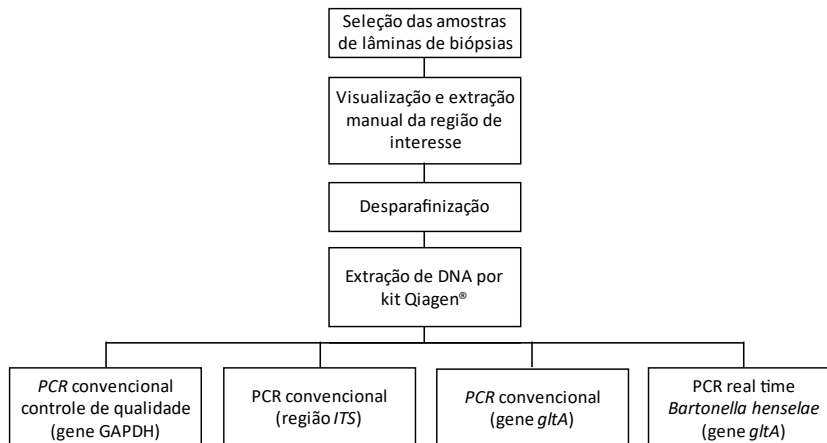


Figura 1 – Protocolo de processamento das amostras

## RESULTADOS

Dos 30 pacientes com diagnóstico de EI com tecido valvar parafinado, seja por terem sido submetidos à substituição valvar por EI ou autopsiados, foi possível recuperar amostras parafinadas de 22 deles. Duas destas eram amostras valvares de pacientes submetidos à autópsia.

O DNA de *B. henselae* foi detectado em 10 reações, uma na PCR convencional para a região ITS, quatro na PCR convencional para gene *gltA* e cinco na PCR *real time* cujo alvo era também o gene *gltA*. Sete dos 22 pacientes (31,8%) apresentaram detecção do DNA bacteriano, sendo seis deles (27,2%) positivos em reações específicas para *B. henselae* (a metade destes nas duas reações) e outro (4,5%) para o gênero *Bartonella*, conforme observado na tabela 1. Seis eram pacientes submetidos à cirurgia cardíaca para substituição valvar e um paciente autopsiado.

Amostra/PCR	Convencional para ITS	Convencional para <i>gltA</i>	Real Time para <i>gltA</i>
P5			+
P6		+	+
P11		+	+
P13		+	
P16			+
P19		+	+
P21	+		

Tabela 1 – Amostras positivas nas reações de PCR Convencional e Real Time

## DISCUSSÃO

O diagnóstico da infecção por *Bartonella* sp. representa um grande desafio médico. Há consenso que há a necessidade de combinação de diferentes técnicas de PCR é essencial para estabelecer diagnóstico correto, pois há resultados falsos negativos na cultura, sorologia e mesmo nas reações moleculares. Diferentes técnicas e diferentes genes alvos apresentam diferentes sensibilidade, valores preditivos positivos e valores preditivos negativos em função da amostra que está sendo estudada. (11)

Assim, a utilização de múltiplos alvos em uma análise de PCR torna-se fundamental para melhorar a acurácia diagnóstica e permitir um diagnóstico mais preciso da EI por *Bartonella* sp. ainda que nem sempre haja concordância dos resultados em todas as reações. Spach e Hanson afirmaram, em uma revisão recente sobre as bartoneloses em humanos, que uma PCR que detecte o DNA de *Bartonella* sp. já seria o suficiente para o diagnóstico de infecção por esse agente, considerando a natureza fastidiosa dessas bactérias. (12)

No Brasil, segundo trabalho de Siciliano et al, as *Bartonella* spp. são os principais agentes de ECN e a *B. henselae* a principal espécie a causar a endocardite nos pacientes com ECN avaliados (9). Dos sete pacientes do presente estudo com DNA de *Bartonella* sp. detectado nas amostras valvares parafinadas, seis foram positivos em reações espécie-específicas. O único paciente com positividade na reação convencional para a região ITS, gênero-específica, pode ter DNA de *B. henselae* ou outra espécie de *Bartonella*. O sequenciamento do amplificado poderá esclarecer a espécie da *Bartonella* detectada neste sétimo paciente. Contudo, chama a atenção a alta prevalência de *B. henselae* já confirmada entre os pacientes submetidos à substituição valvar, seis de vinte pacientes.

A correlação com os dados clínicos permitirá contribuir para a resposta da questão sobre a coinfeção observada por Lamas et al (10): seria necessário investigar a infecção por *Bartonella* sp. mesmo em pacientes com agente causador definido por cultura ou sorologia? A capacidade da *B. henselae*

produzir um biofilme e outro agente poder crescer sobre este material precisa ser melhor investigada em estudos prospectivos. (10)

A importância da investigação da coinfeção por *Bartonella* sp. e outro agente pode ser evidenciada também em casos de pacientes com recorrência de EI (13), como também observado em pacientes deste estudo (informação não publicada). Os casos de EIs recorrentes não foram associados, até onde os autores puderam encontrar, à coinfeção de agentes que não sendo tratados adequadamente, favorecem a reinfecção por agente distinto do anteriormente diagnosticado ou recorrência como é considerado no caso do mesmo agente anterior ser isolado novamente.

Estudos prospectivos e multicêntricos utilizando amostras sanguíneas de pacientes com EI com ou sem diagnóstico etiológico e amostras valvares não parafinadas serão importantes para elucidar o papel das *Bartonella* spp. como causadoras ou facilitadoras de EI.

## CONCLUSÃO

Um em cada três pacientes com EI que foram submetidos à substituição valvar ou foram autopsiados apresentaram DNA de *Bartonella* sp. em suas amostras parafinadas. Um em cada quatro pacientes operados apresentou detecção de *B. henselae*. Nenhum destes casos teve diagnóstico prévio da infecção por *Bartonella* spp.. Estudos prospectivos com pacientes diagnosticados com EI são necessários para avaliar a possível coinfeção destas bactérias com outros agentes.

## BIBLIOGRAFIA

1. Rolain, JM; Brouqui P, Koehler JE, Maguina C, Dolan MJ, Raoult D. Recommendations for treatment of human infections caused by Bartonella species. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2004, vol. 48(6): 1921-33.
2. Breitschwerdt EB. Bartonellosis: one health perspectives for an emerging infectious disease. ILAR J. 2014, vol. 55(1):46-58.
3. Okaro U, Addisu A, Casanas B, Anderson B. Bartonella species, an emerging cause of blood-culture-negative endocarditis. Clin Microbiol Rev. 2017, vol. 30(3):709-46.
4. Pierce D, Calkins BC, Thornton K. Infectious endocarditis: diagnosis and treatment. Am Fam Physician. 2012, vol. 85(10):981-86.
5. Tattevin P, Watt G, Revest M, Arvieux C, Fournier PE. Update on blood culture-negative endocarditis. Med Mal Infect. 2015, vol. 45(1-2):1-8
6. Eldin C, Mélenotte C, Mediannikov Oleg, Chigo E, Million M, Edouard S, et al. From Q fever to Coxiella burnetii infection: a paradigm change. Clin Microbiol Rev. 2017, vol. 30(1):115-90.
7. Siciliano RF, Castelli JB, Mansur AJ, Santos FP, Colombo S, Nascimento EM, et al. Bartonella spp. and Coxiella burnetii associated with community-acquired, culture-negative endocarditis, Brazil. Emerg Infect Dis. 2015, vol. 21(8):1429-32.
8. Spach DH. Endocarditis caused by Bartonella. Post TW, ed. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Inc. Atualizada em 2019; acesso em 12 de maio de 2020. Disponível em: <https://www.uptodate.com>.
9. Edouard S, Nabet C, Lepidi H, Fournier PE, Raoult D. Bartonella, a common cause of endocarditis: a report on 106 cases and review. J Clin Microbiol. 2015, vol. 53(3):824-29.
10. Okaro U, George S, Valdes S, Macaluso K, Anderson B. A non-coding RNA controls transcription of a gene encoding a DNA binding protein that modulates biofilm development in Bartonella henselae. Microb Pathog. 2020;147:104272.
11. Drummond MR, dos Santos LS, de Almeida AR, Lins KdA, Barjas-Castro ML, Diniz PPvDP, et al. (2023) Comparison of molecular methods for Bartonella henselae detection in blood donors. PLoS Negl Trop Dis 17(6): e0011336.
12. Spach, DH. et al. Microbiologic diagnosis of Bartonella infections. IN: GULICK, R. M.;M.D., et al. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/microbiologic-diagnosis-of-bartonella-infections>. Acessado em: julho de 2022;
13. Calderón-Parra, J., Kestler, M., Ramos-Martínez, A., Bouza, E., Valerio, M., de Alarcón, A., Luque, R., Goenaga, M. Á., Echeverría, T., Fariñas, M. C., Pericàs, J. M., Ojeda-Burgos, G., Fernández-Cruz, A., Plata, A., Vinuesa, D., Muñoz, P., & On Behalf Of The Games Investigators (2021). Clinical Factors Associated with Reinfection versus Relapse in Infective Endocarditis: Prospective Cohort Study. Journal of clinical medicine, 10(4), 748.