

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA

TESE

**Infecção por *Bartonella* spp. em gatos de abrigo
da Região Metropolitana do Rio de Janeiro:
Implicações clínicas, hematológicas e fatores
associados**

Juliana Macedo Raimundo

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA (PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**Infecção por *Bartonella* spp. em gatos de abrigo
da Região Metropolitana do Rio de Janeiro:
Implicações clínicas, hematológicas e fatores
associados**

JULIANA MACEDO RAIMUNDO

Sob a Orientação da Professora
Cristiane Divan Baldani

e Coorientação da Professora
Alexsandra Rodrigues de Mendonça Favacho

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Animal.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R153i Raimundo, Juliana Macedo, 1988-
Infecção por Bartonella spp. em gatos de abrigo da
Região Metropolitana do Rio de Janeiro: Implicações
clínicas, hematológicas e fatores associados / Juliana
Macedo Raimundo. - 2018.
68 f.: il.

Orientador: Cristiane Divan Baldani.
Coorientadora: Alexsandra Rodrigues de Mendonça
Favacho.

Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Pós-graduação em Medicina Veterinária
(Patologia e Ciências Clínicas), 2018.

1. Bartonella ssp. 2. Gatos domésticos. 3.
Abrigos. 4. Pulgas. 5. Zoonose. I. Baldani, Cristiane
Divan, 1978-, orient. II. Favacho, Alexsandra
Rodrigues de Mendonça, -, coorient. III Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Pós-graduação em
Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas).
IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JULIANA MACEDO RAIMUNDO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Ciências Clínicas.

TESE APROVADA EM 27/02/2018



Cristiane Divan Baldani (Ph. D) UFRRJ
(orientador)



Aline Moreira de Souza (Ph. D) UFF



Renata Fernandes Ferreira (Ph. D) USS



Heloisa Justen Moreira de Souza (Ph. D) UFRRJ



Carlos Henrique Machado (Ph. D) UFRRJ

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

Primeiramente a Deus, àquele que nos governa e nos guia sempre;

Aos meus pais, Albertina e Julio por todo amor, conselhos, força, energia e incentivo na vida;

Ao Felipe por todos os momentos juntos, pelo amor e companheirismo nesta caminhada;

A todos os meus familiares e amigos pela amizade, carinho e apoio em todos os momentos.

A vocês dedico toda e qualquer conquista!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

(Madre Teresa de Calcutá)

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante”

(Antoine de Saint-Exupéry)

AGRADECIMENTOS

À Deus, que, sobretudo me proporcionou a vida, direcionamento pelos bons caminhos e por me reerguer nos momentos mais difíceis.

Aos meus amados pais, Albertina Macedo Raimundo e Julio João Raimundo, por todo amor, essência da vida, educação, sonhos compartilhados e pela presença incondicional em cada etapa da minha vida pessoal e profissional. A vocês, devo tudo que sou hoje.

À minha família, pela união nos momentos de felicidade e tristeza que me fazem entender a cada dia o que e como é a vida, agradeço pelos incentivos, ensinamentos e aprendizados constantes. Amo todos vocês.

Ao Felipe Ribeiro, pelo amor, companheirismo, paciência, por estar presente nos melhores momentos da minha vida, por ser meu porto seguro nos momentos de desmotivação e cansaço. E, principalmente, por compreender meus momentos de ausência.

Icaro e Nicholas, por me fazer relembrar a inocência de uma criança e pelos inúmeros momentos de diversão e aprendizado.

À professora Cristiane Divan Baldani, minha orientadora, pelos ensinamentos, contribuição na vida acadêmica. Pelas palavras de incentivo, por me auxiliar nos momentos pessoais difíceis, pelo exemplo de dedicação profissional e acima de tudo por acreditar no meu potencial.

À minha co-orientadora, Alessandra Rodrigues de Mendonça Favacho, pela confiança e acolhida no Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses do Instituto Oswaldo Cruz. Muito obrigada por toda a ajuda na realização deste trabalho e por todos os ensinamentos.

Aos professores Carlos Luiz Massard e Hurrisson Azevedo Santos por disponibilizar o Laboratório de Hemoparasitos e Vetores/UFRRJ para execução de parte dos ensaios moleculares.

À equipe do laboratório de patologia clínica da UFRRJ, Gleice Marques Amaro, Ágatha Ferreira Xavier de Oliveira, Andresa Guimarães e Aline Tonussi da Silva, pelo apoio e pela ajuda nas etapas de execução deste trabalho.

Aos médicos veterinários Caio Junior Balduino Rodrigues Coutinho, Camila Flávia Botelho, Maria Lopes, e Raisal Brául Rodrigues pela ajuda fundamental nos momentos de coleta.

Aos amigos da UFRRJ, Jôsie Albuquerque, Larissa Moraes, Gleice Marques e Fernanda Kohn pela amizade e pelos bons momentos ao meu lado. Em especial a Caio Rodrigues, Jéssica Ferreira pelos inúmeros momentos de conselhos, diversão e confidências. Verdadeiros laços de amizade criados na nossa amada UFRRJ são para toda vida!

Às amigas, Patrícia Ferreira e Thais Serpa, pela verdadeira amizade, carinho e apoio que a distância não separa. Obrigada pelos anos compartilhados!

À biomédica Adriana Ribeiro da Silva por toda ajuda nas análises moleculares, pelas risadas compartilhadas e companheirismo no dia a dia inconstante da biologia molecular. Grata por ter conhecido seu jeito simples e leve de viver a vida!

Aos meus queridos animais, daqueles que todos os dias me faltam o singelo olhar e os mais simples gestos de gratidão, aqueles que viveram a reciprocidade de um sentimento puro e que mesmo em momentos difíceis me proporcionaram conhecimento de vida. Ao Thor, com sua doce brutalidade, por todo amor, companheirismo e energia sem fim.

Ao professor Carlos Henrique Machado por estar sempre disposto a nos ajudar e pelos ensinamentos.

À pesquisadora Elba Regina Sampaio de Lemos por disponibilizar o Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses do Instituto Oswaldo Cruz para execução das análises moleculares.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária/UFRRJ e aos colegas de doutorado pelos bons momentos de convivência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo auxílio financeiro deste projeto.

Aos professores doutores Renata Fernandes Ferreira, Aline Moreira de Souza, Carlos Henrique Machado e Heloisa Justen Moreira de Souza, componentes da banca examinadora, agradeço pela correção e adequação do presente trabalho.

Aos animais de abrigo, todo o meu respeito e agradecimento. Que consigam tutores com quem possam compartilhar esse imenso amor e carinho!

Por fim, muitíssimo obrigada a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização e conclusão deste trabalho.

RESUMO

RAIMUNDO, Juliana Macedo. **Infecção por *Bartonella* spp. em gatos de abrigo da Região Metropolitana do Rio de Janeiro: implicações clínicas, hematológicas e fatores associados.** 2018. 68f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Patologia Clínica). Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Os gatos são os principais reservatórios de *Bartonella henselae* (Bh), *B. clarridgeiae* (Bc) e *B. koehlerae* (Bk), as quais podem ser transmitidas ao homem por meio de arranhões ou mordidas e causar doenças. No Brasil os estudos são escassos, principalmente aqueles que abordam a detecção molecular destas bactérias, bem como seus impactos na rotina clínica veterinária e saúde pública. O objetivo deste estudo foi detectar DNA de espécies de *Bartonella* em gatos de abrigos na Região Metropolitana do Rio de Janeiro e seus ectoparasitas e, adicionalmente, avaliar sinais clínicos, alterações hematológicas e fatores associados à infecção. Duzentos e oito gatos de abrigos foram subdivididos em dois grupos: G1, município do Rio de Janeiro (n=68) e G2, incluindo os municípios de Belford Roxo, Duque de Caxias, Guapimirim, Itaguaí, Mesquita, Nova Iguaçu, São Gonçalo e Seropédica (n=140). Os gatos foram avaliados clinicamente e inspecionados quanto à presença de ectoparasitos. Mediante contenção apropriada, amostras de sangue foram colhidas por venopunção cefálica e transferidas para tubos contendo o anticoagulante EDTA. A triagem para detecção de DNA de *Bartonella* spp. em amostras de sangue e ectoparasitos foi baseada nos genes *gltA* e ITS (16S-23S). A associação entre a infecção bacteriana, dados hematológicos, sinais clínicos e fatores de risco foi avaliada pelo teste exato de Fisher ou Qui-quadrado. No presente estudo, oitenta e três gatos (39,9%) foram positivos para *Bartonella* spp., dos quais 22,1% e 48,6% pertenciam ao grupo 1 e grupo 2, respectivamente. Tal discrepância pode ser atribuída às medidas de higiene e controle de pulgas aplicadas nos locais. DNA bacteriano foi detectado em pulgas e sangue de gatos infestados por pulgas positivas, os quais apresentaram duas vezes mais chances de se infectarem ($p > 0,05$). Tal achado ressalta a importância destes ectoparasitos na transmissão dos patógenos entre os gatos. Bh e Bc foram detectadas em pulgas, enquanto que, Bh, Bc e Bk, em sangue de gatos bacterêmicos. Houve maior frequência de infecção em gatos amostrados nos meses de Março à Junho ($p < 0,05$). É provável que os tutores, por acreditarem não se tratar de período de atividade de ectoparasitos, reduzam os programas de controle de pulgas. No entanto, outono ainda é uma estação ativa para pulgas, especialmente, no Rio de Janeiro onde as temperaturas permanecem moderadamente elevadas durante todo o ano. Gatos não castrados, com acesso à rua, histórico de briga, sem uso de ectoparasiticidas e infestados por pulgas demonstram-se mais propensos à infecção ($p < 0,05$). Os dados reforçam a associação entre bacteremia e contato prévio com pulgas, e enfatiza *C. felis* como principal vetor. Com relação às alterações hematológicas, eosinofilia foi associada à infecção ($p < 0,05$), sendo observada em 62,2% dos gatos infectados. A ocorrência *Bartonella* spp. em pulgas e gatos de abrigos na Região Metropolitana do Rio de Janeiro enfatiza a necessidade de alertar a comunidade veterinária local, proprietários e autoridades de saúde pública para o risco desta zoonose. Medidas de controle devem ser implementadas para prevenir a infecção em gatos, hospedeiros vertebrados e pessoas.

Palavras-chave: *Bartonella* spp., gatos de abrigo, pulgas, fatores associados, hematologia

ABSTRACT

RAIMUNDO, Juliana Macedo. ***Bartonella* spp. in shelter cats in the Metropolitan Area of Rio de Janeiro: clinical, hematological and associated factors.** 2018. 68f. Thesis (Doctorate Degree in Veterinary Medicine, Pathology). Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.]

Cats are the main reservoirs of *Bartonella henselae* (Bh), *B. clarridgeiae* (Bc) and *B. koehlerae* (Bk), which can be transmitted to humans through scratches or bites and cause disease. In Brazil there are very few studies, especially focusing on molecular detection of *Bartonella* species, as well as their impact in veterinary clinical practice and public health. The aims of this study were to detect *Bartonella* DNA in blood of shelter cats from metropolitan area of Rio de Janeiro State and their ectoparasites, and, in addition, to evaluate associated risk factors, clinical signs, and hematological abnormalities. Two-hundred and eight cats were sampled and divided into groups: G1, those in the Rio de Janeiro municipality (n=68) and G2, those in the Belford Roxo, Duque de Caxias, Guapimirim, Itaguaí, Mesquita, Nova Iguaçu, São Gonçalo, and Seropédica municipalities (n=140). Cats were physically examined and inspected for ectoparasites presence. By appropriate restraintment, blood samples were aseptically obtained by cephalic phlebotomy, transferred into sterile tubes containing EDTA anticoagulant. *Bartonella* DNA screening in EDTA-blood samples and ectoparasites was based on the genes *gltA* and ITS (16S-23S). The association between bacterial infection, hematological data, clinical signs, and risk factors was assessed by Fisher's exact test or chi-square test. In the present study, eighty-three cats (39.9%) were positive for *Bartonella* species, of which 22.1% and 48.6% were from G1 and G2, respectively. Such discrepancy may be explained by differences in local hygiene conditions and preventive flea control. Bacterial DNA was detected in fleas and in the blood of cats infested by positive fleas, which were twice as likely to become infected ($p > 0.05$). This finding highlights the importance of these ectoparasites in the transmission of pathogens among cats. Bh and Bc DNA were detected in cat fleas, while Bh, Bc and Bk in blood from bacteremic cats. Cats with blood collected between March and June months were significantly more frequently infected ($p < 0.05$). A possible explanation is that owners, thinking that cat flea season is over, reduce measures to control flea infestation in their pets. Indeed, autumn months represent an active period for fleas, especially in Rio de Janeiro, where temperatures remain moderate year round. Non-sterilized cats, with outdoor access, fight histories, without an ectoparasiticide prophylactic management and infested by fleas were more prone to be infected ($p < 0.05$). The data reinforce the association between bacteremia and previous contact with fleas, and emphasizes *C. felis* as the main vector. Regarding hematological findings, eosinophilia was associated with infection ($p < 0.05$), being present in 64% of bacteremic cats. The occurrence of *Bartonella* spp. in cats from shelters in the Metropolitan Region of Rio de Janeiro and their fleas emphasizes the need to alert the local veterinary community, owners and public health authorities to the risk of this zoonosis. Ectoparasites control measures, especially those designed to prevent flea infestation should be implemented to minimize the risk of infection by cats, other vertebrate hosts, and humans.

Keywords: *Bartonella* spp., shelter cats, fleas, risk factors, hematology.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição da sequência de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e das condições de amplificação para detecção de *Bartonella* spp.....17

Capítulo I: “Molecular survey of *Bartonella* species in shelter cats in a metropolitan area, Brazil: clinical, hematological and risk factors”

Table 1: Distribution of *Bartonella* species bacteremia in shelters cats located in municipalities at metropolitan region of Rio de Janeiro, Brazil..... 25

Table 2: Statistical analysis of factors associated with *Bartonella* species bacteremia in cats from shelters located in the Metropolitan Region of Rio de Janeiro State, Brazil 26

Table 3: Association between *Bartonella* species bacteremia in asymptomatic and symptomatic cats, clinical signs and diseases reported in 208 shelter cats from Metropolitan Region of Rio de Janeiro State, Brazil 28

Table 4: Hematological results from 208 shelter cats screened for *Bartonella* species infection 29

Table 5: Hematological results for *Bartonella* infection in cats from shelters located in the Metropolitan Region of Rio de Janeiro State, Brazil 30

Capítulo II: “Prevalence of *Bartonella* species in shelter cats and their ectoparasites in Southeastern Brazil”

Table 1: Prevalence of *Bartonella* DNA in cats and their ectoparasites in shelters located in the Metropolitan Region of Rio de Janeiro State, Brazil.....37

Table 2: *Bartonella* species in cats and their fleas by shelter and sequencing (identities varied from 95 to 100%) in Rio de Janeiro State, Brazil.....38

Table 3: Statistical analysis of the *Bartonella* infection status of host cats and fleas in Rio de Janeiro State, Brazil..... 39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo do ciclo de infecção de espécies de *Bartonella* (Adaptado de Dehio, 2005)9

Figura 2: Municípios da Região Metropolitana do Rio de Janeiro dos quais foram obtidas as amostras de sangue de felinos domésticos15

Capítulo I: “Molecular survey of *Bartonella* species in shelter cats in a metropolitan area, Brazil: clinical, hematological and risk factors”

Figure 1: Distribution of *Bartonella* species in shelter cats by period (months)..... 28

LISTA DE ABREVIACÕES

ACVIM	Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária
BLAST	Ferramenta Básica de Localização de Alinhamento Local
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CHGM	Concentração de hemoglobina globular média
DAG	Doença da Arranhadura do Gato
dATP	Deoxiadenosina trifosfato
dCTP	Deoxicitosina trifosfato
dGTP	Deoxiguanosina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNNE	Desvio nuclear de neutrófilos à esquerda
DP	Desvio Padrão
dTTP	Deoxitimidina trifosfato
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EP	Erro Padrão
EUA	Estados Unidos da América
FeLV	Vírus da Leucemia Viral Felina
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina
gltA	Citrate synthase-encoding <i>gene</i>
h	Hora
He	Hemácias
Hg	Hemoglobina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
Ht	Hematócrito
IC	Intervalo de Confiança
ITS	16S-23S rRNA gene intergenic transcribed spacer
Máx.	Limite máximo
Mín.	Limite mínimo
N	Número de gatos
ONG	Organizações não governamentais
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PM	Peso molecular
PPT	Proteína Plasmática Total
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
spp.	Espécies
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
VGM	Volume globular médio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1.	Bartoneloses	3
2.2.	<i>Bartonella</i> spp. em Felinos.....	5
2.2.1.	Prevalência	5
2.2.2.	Fatores de risco.....	7
2.2.3.	Transmissão.....	7
2.2.4.	Patogenia e sinais clínicos.....	9
2.2.5.	Diagnóstico.....	11
2.2.6.	Tratamento.....	12
2.2.7.	Prevenção	13
2.2.8.	Importância na Saúde Pública	13
3	MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1.	Animais	14
3.2.	Exame Clínico dos Gatos	15
3.3.	Coleta de Sangue	15
3.4.	Análises Hematológicas	16
3.5.	Testes Sorológicos <i>Bartonella henselae</i>	16
3.6.	Identificação Taxonômica dos Ectoparasitos	16
3.7.	Detecção Molecular de <i>Bartonella</i> spp.	16
3.7.1.	Extração de material genômico	16
3.7.1.1.	Ectoparasitos	16
3.7.1.2.	Sangue dos gatos	16
3.7.2.	Reações em cadeia da polimerase	17
3.8.	Sequenciamento de Nucleotídeos.....	17
3.9.	Análise Estatística	18
4	CAPÍTULOS	19
4.1.	CAPÍTULO I – “Molecular survey of <i>Bartonella</i> species in shelter cats in a metropolitan area, Brazil: clinical, hematological and risk factors”	19
4.2.	CAPÍTULO II – “Prevalence of <i>Bartonella</i> species in shelter cats and their ectoparasites in Southeastern Brazil”	33
5	CONCLUSÕES GERAIS	42
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
7	ANEXOS	55
7.1.	Anexo I - Termo de consentimento livre e esclarecido:.....	55
7.2.	Anexo II - Aprovação CEUA/IV:	56

1 INTRODUÇÃO

A bartonelose é causada por bactérias intracelulares pertencentes ao gênero *Bartonella*. Estes micro-organismos são bem adaptados à persistência intracelular em uma ampla variedade de animais domésticos e selvagens, incluindo bovinos, caninos, felinos e o homem. O gênero compreende bactérias gram-negativas, de crescimento lento, que parasitam em sua maioria eritrócitos e células endoteliais de mamíferos e causam bacteremia prolongada. Em felinos, os estudos são recentes e ganham importância pelo fato da enfermidade ser uma zoonose emergente, em que estes animais constituem os principais reservatórios.

Locais de clima quente e úmido como o Brasil favorecem o desenvolvimento e proliferação do principal artrópode vetor entre os felídeos, a pulga *Ctenocephalides felis*. Tal fato quando associado à ausência de métodos totalmente eficazes de controle deste ectoparasito tornam importantes os estudos abordando bartonelose felina. Populações de gatos errantes, de abrigos e semi-domiciliados apresentam maior risco de infecção por *Bartonella* spp., especialmente devido a maior exposição destes animais aos artrópodes vetores, bem como a brigas quando comparados aos gatos domiciliados.

Estudos baseados na identificação das espécies de *Bartonella* que afetam os animais e a investigação do caráter zoonótico das mesmas tornam-se relevantes em função da estreita relação entre o homem e os animais domésticos, em especial os gatos. Tal fato pode estar relacionado à maior facilidade de criação e manejo destes animais associado ao acentuado crescimento da população felina no Brasil.

Os sinais clínicos da infecção por *Bartonella* spp. em felinos domésticos são variáveis e a gravidade da doença depende de fatores ainda não totalmente esclarecidos, sendo um destes a patogenicidade de diferentes cepas de *Bartonella*. Supõe-se que infecções concomitantes, situações de estresse e doenças imunossupressoras tornem a enfermidade evidente clinicamente. De modo geral, a infecção é assintomática com resolução espontânea, tornando os animais portadores e potenciais reservatórios. Investigações têm sido direcionadas acerca da relação causal entre infecção por *Bartonella* spp. e algumas condições clínicas como estomatite, linfadenopatia, bem como uveíte, febre de causa desconhecida e endocardite. E dentre os achados laboratoriais, apesar dos estudos serem restritos, são relatados anemia discreta a moderada, eosinofilia persistente, neutrofilia madura e linfocitose, bem como hiperglobulinemia.

No Brasil, o diagnóstico de *Bartonella* é comumente realizado por métodos sorológicos, no entanto, há limitações devido ao suprimento de antígeno, possibilidade de reatividade cruzada, bem como do fato deste método não indicar infecção ativa, mas sim contato prévio com o agente etiológico. Neste contexto, as técnicas de biologia molecular, como a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) ganham destaque por permitir a identificação de *Bartonella* spp. com elevada sensibilidade e especificidade. A identificação molecular de agentes infecciosos, seguida por sequenciamento de vários genes específicos constitui alternativa para o diagnóstico das espécies de *Bartonella*, auxiliando dessa forma na compreensão da patogenia da doença e na identificação de reservatórios para espécies com potencial mórbido para seres humanos e animais domésticos.

A bartonelose felina apresenta ampla distribuição mundial, no entanto, no Brasil os estudos são bastante escassos, principalmente os que abordam a detecção e caracterização molecular de *Bartonella*, bem como seus impactos na rotina clínica veterinária e saúde pública. O projeto objetivou investigar a infecção por *Bartonella* spp. em gatos de abrigos

da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, por meio de métodos sorológicos e moleculares, bem como detectar a presença do DNA bacteriano em ectoparasitos coletados destes. E, adicionalmente, determinar as alterações clínicas, hematológicas e os fatores associados à infecção natural a fim de orientar médicos veterinários no diagnóstico da bartonelose felina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

No Brasil, a população de gatos tem apresentando crescimento anual acelerado, sendo superior ao crescimento da população de cães (ABINPET, 2016). Em face à verticalização urbana das grandes cidades, tem-se optado pela criação de gatos devido às facilidades de manejo, baixo custo e reduzido espaço requerido. Estudos abordando agentes infecciosos e parasitários em animais de companhia têm sido intensificados em decorrência das doenças que promovem nos animais e no homem. Tais micro-organismos podem ser carreados silenciosamente e transmitidos a outros animais por transfusão sanguínea, brigas e artrópodes vetores, tais como pulgas e carrapatos, disseminando os agentes.

One Health é um conceito que visa unir a saúde humana, animal e ambiental, desempenhando um papel significativo na prevenção e controle de zoonoses (BIDAISEE e MACPHERSON, 2014). Estudos que abordam as espécies de *Bartonella* ganham importância, pois estes agentes infectam uma variedade de animais, estão ligados à ocorrência de doenças em humanos e são transmitidos por artrópodes vetores (REGIER et al., 2016). No Brasil, poucos estudos abordam a ocorrência da *Bartonella* spp. em gatos. A determinação de características clínicas, hematológicas e fatores associados à ocorrência da bartonelose felina auxiliarão no diagnóstico desta enfermidade e, conseqüentemente, contribuirão na profilaxia e controle, visando à sanidade do animal e do homem.

2.1. Bartoneloses

O termo bartonelose pode ser designado coletivamente a qualquer doença ocasionada por bactérias do gênero *Bartonella*. Correspondem a infecções causadas por bactérias intracelulares pertencentes ao gênero *Bartonella*, micro-organismos bem adaptados à persistência intracelular em uma ampla variedade de animais domésticos e selvagens, incluindo bovinos, caninos, felinos, homem e espécies de roedores que funcionam como reservatórios para diversas espécies de *Bartonella* (KORDICK e BREITSCHWERDT, 1998). Este gênero compreende pequenas bactérias Gram-negativas, bacilares curvadas, intracelulares facultativas, flageladas ou não, aeróbicas e de crescimento lento que parasitam em sua maioria eritrócitos e células endoteliais de mamíferos e causam bacteremia prolongada. Bioquimicamente, apresentam atividade negativa de catalase, oxidase, urease e nitrato redutase (CHOMEL, et al., 2004; BOULOUIS et al., 2005). As espécies de *Bartonella* estão fortemente relacionadas entre si, partilhando mais de 95% de homologia nas sequências dos genes 16S rRNA (JACOMO et al., 2002; KEŠNEROVÁ et al., 2016).

Atualmente, a família Bartonellaceae, que contém apenas bactérias do gênero *Bartonella*, pertence ao filo Proteobacteria, classe Alphaproteobacteria e à ordem Rhizobiales (BIRTLES et al., 1995). De acordo com a Lista de nomes procarióticos com base na nomenclatura (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature – LPSN), o gênero *Bartonella* compreende 33 espécies e 3 subespécies.

Até início da década de 90, o gênero *Bartonella* compreendia apenas a espécie *Bartonella bacilliformis*, identificada em 1905 por Alberto Barton em esfregaços sanguíneos de pacientes com a doença de Carrión (Febre de Oroya). Com o advento dos ensaios moleculares, sequências do gene 16S rRNA foram analisadas e a família Bartonellaceae reorganizada taxonomicamente, de forma que, os gêneros *Bartonella*,

Grahamella e *Rochalimaea* foram unificados no gênero *Bartonella* e a família Bartonellaceae, removida da ordem Rickettsiales (BRENNER et al., 1993; BIRTLES et al., 1995). Como resultado destas reclassificações iniciais, compunham o gênero: *Bartonella bacilliformis*, *B. quintana*, *B. vinsonii*, *B. henselae*, *B. elizabethae*, *B. talpae*, *B. peromysci*, *B. grahamii*, *B. taylorii* e *B. doshiae*.

Desde então, espécies e subespécies foram renomeadas ou descritas. Em 1996, *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* foi isolada de cão com endocardite, *Bartonella clarridgeiae*, isolada de gato doméstico de tutor portador do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e *B. vinsonii*, renomeada como *Bartonella vinsonii* subsp. *vinsonii* (KORDICK et al., 1996; LAWSON e COLLINS, 1996). Em seguida, *Bartonella tribocorum* e *Bartonella alsatica* foram isoladas em ratos e coelhos de vida livre (HELLER et al., 1998; HELLER et al., 1999). Nos anos 2000, *Bartonella koehlerae*, *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis*, *Bartonella birtlessi*, *Bartonella schoenbuchensis*, *Bartonella bovis*, *Bartonella capreoli* e *Bartonella chomelii* foram isoladas e adicionadas à crescente lista de espécies e subespécies de *Bartonella* (BERMOND et al., 2000; DROZ et al., 2000; WELCH et al., 2000; DEHIO et al., 2001; BERMOND et al., 2002; MAILLARD et al., 2004). Diversas espécies foram isoladas em roedores, a seguir *Bartonella rattaustaliani*, *Bartonella queenslandensis* e *Bartonella coopersplainsensi* em ratos na Austrália (GUNDI et al., 2009), *Bartonella japonica* e *Bartonella silvatica* em roedores no Japão (INOUE et al., 2010).

Nos últimos cinco anos, novas espécies foram isoladas nos mais diversos hospedeiros. *B. rochalimae* foi isolada em humanos e caracterizada, experimentalmente, como agente causador de febre (EREMEEVA et al., 2012). *Bartonella jaculi*, *Bartonella callosciuri*, *Bartonella pachyuromydis*, e *Bartonella acomydis* foram isoladas de roedores (SATO et al., 2013). *Bartonella florenciae* foi isolada de baço de musaranho (*Crocidura russula*) (MEDIANNIKOV et al., 2013a), *Bartonella senegalensis* isolada em carrapatos *Ornithodoros sonrai* colhidos em tocas de roedores (MEDIANNIKOV et al., 2013b) e, mais recentemente, *Bartonella ancashensis* foi isolada de humanos previamente diagnosticados com verruga peruana (MULLINS et al., 2015) e *Bartonella apis* isolada do intestino de abelhas (*Apis mellifera*) (KEŠNEROVÁ et al., 2016).

Diversas espécies ou subespécies são conhecidas ou suspeitas de serem patogênicas para seres humanos, incluindo *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. koehlerae*, *B. quintana*, *B. bacilliformis*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, *B. grahamii*, *B. elizabethae*, *B. tamiae*, *B. alsatica*, *B. washoensis*, *B. tribocorum*, *B. doshiae*, *B. schoenbuchensis*, *B. rochalimae* (GUPTILL, 2015; VAYSSIER-TAUSSAT et al., 2016; CHOMEL et al., 2009).

Em gatos, observa-se com maior frequência infecções por *B. henselae*, *B. clarridgeiae* e *B. koehlerae*, espécies para as quais constitui reservatório principal (MOGOLLON-PASAPERA et al., 2009; CHOMEL e KASTEN, 2010). Infecções acidentais por *B. bovis*, *B. quintana*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* e *B. capreoli* foram descritas (REGNERY et al., 2000; LA et al., 2005; BREITSCHWERDT et al., 2007; VARANAT et al., 2009; GIL et al., 2013).

Desde o primeiro isolamento de *B. henselae* em gato doméstico no início da década de 1990, vários estudos têm sido conduzidos em todo o mundo para determinar a importância dos gatos como reservatório desta bactéria (BOULOUIS et al., 2005; CHOMEL et al., 2006a). *Bartonella henselae* divide-se em dois genótipos principais: Tipo I (Houston1), predominante na Ásia e tipo II (Marseille), no oeste dos Estados Unidos da América, Europa Ocidental e Austrália (CHOMEL e KASTEN, 2010). Em humanos, *Bartonella henselae* é o principal agente da Doença da Arranhadura do Gato (DAG) e já

foi isolada em casos de angiomatose bacilar, peliose hepática, febre persistente, bacteremia, endocardite, linfadenopatia crônica e distúrbios neurológicos (SLATER et al., 1992; SCOTT et al., 1996; CHOMEL e KASTEN, 2010; MAGGI et al., 2013)

Considerando a infecção em felinos, *Bartonella clarridgeiae* e *Bartonella koehlerae* são isoladas com menor frequência do que *B. henselae* (CHOMEL e KASTEN, 2010). *B. clarridgeiae* foi isolada pela primeira vez em gato de indivíduo portador do vírus HIV (CLARRIDGE et al., 1995) e *B. koehlerae*, em gatos saudáveis na Califórnia (DROZ et al., 1999). O envolvimento de *B. clarridgeiae* como causa de afecções em humanos (DAG) baseia-se apenas em evidências sorológicas (KORDICK et al., 1997; MARGILETH e BAEHREN, 1998; SANDER et al., 2000; CHOMEL et al., 2006b). Recentemente, Vieira-Damiani et al. (2015) detectaram DNA de *B. clarridgeiae* em indivíduo assintomático com histórico de inúmeras doações de sangue, denotando a importância da transfusão sanguínea como provável via de infecção entre os humanos. *Bartonella koehlerae*, por outro lado, foi incriminada como agente causal de endocardite humana (AVIDOR et al., 2004).

Humanos são os reservatórios naturais de *B. quintana*. Embora esta espécie já tenha sido isolada em polpa dental, sangue e pulgas de gatos (ROLAIN et al., 2003; LA et al., 2005; BREITSCHWERDT et al., 2007), e, adicionalmente, Bouhsira et al. (2013) tenham sugerido a pulga *C. felis* como possível vetor de *B. quintana*, a importância epidemiológica dos felinos na infecção humana por esta espécie ainda não está esclarecida.

Bartonella bovis foi isolada em gatos nos Estados Unidos, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* foi isolada em caso de osteomielite e, recentemente, *B. capreoli* foi detectada molecularmente em sangue de gatos de abrigo. A forma de transmissão destas espécies aos felinos domésticos ainda não está elucidada (REGNERY et al., 2000; VARANAT et al., 2009; GIL et al., 2013). No entanto, Chomel et al. (2014), baseados em infecção experimental, sugeriram que gatos não são reservatórios naturais de *B. quintana*, *B. bovis* e *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* e acreditam tratar-se de infecções acidentais.

2.2. *Bartonella* spp. em Felinos

2.2.1. Prevalência

Espécies de *Bartonella* apresentam distribuição mundial, verificando-se maior prevalência em áreas cujas condições ambientais são mais propícias ao desenvolvimento dos artrópodes vetores, isto é, em regiões com temperatura e umidade mais elevadas (BREITSCHWERDT e KORDICK, 2000; GUPTILL, 2010).

Estudos demonstram a ocorrência de *B. henselae* e *B. clarridgeiae* na população de gatos no Brasil. Na maioria destes, há predomínio de infecção por *B. henselae* (STAGGEMEIER et al., 2010; BORTOLI et al., 2012; BRAGA et al., 2012; MICELI et al., 2013; ANDRÉ et al., 2014; STAGGEMEIER et al., 2014; ANDRÉ et al., 2015). Infecção apenas por *B. clarridgeiae* foi evidenciada em gatos no Mato Grosso do Sul (BRAGA et al., 2015). Outras espécies ainda não foram detectadas na população de gatos no Brasil.

Infecções por *Bartonella* spp. em gatos diagnosticadas com base em ensaios moleculares já foram reportadas em todos os continentes. Baseados em alguns dos estudos reportados na literatura, a infecção varia de 1% a 70.6% na Europa (FABBI et al., 2004; TABAR et al., 2008; PENNISI et al., 2010; BENNETT et al., 2011; CHALONER et al., 2011; GIL et al., 2013), 2.2% a 63% nas Américas (CHOMEL et al., 1995; MESSAM et al., 2005; KELLY et al., 2010; NAMEKATA et al., 2010; MICELI et al., 2013; CICUTTIN et al., 2014), 16.2% a 35% na Oceania (BRANLEY et al., 1996; JOSEPH et

al., 1997; BARRS et al., 2010), 12.7% a 40.4% na Ásia (KIM et al., 2009; MARUYAMA et al., 2001; TSAI et al., 2011; YUAN et al., 2011; ASSARASAKORN et al., 2012; GUTIERREZ et al., 2013) e 7.8% a 23.5% na África (AZZAG et al., 2012; LOBETTI e LAPPIN, 2012; TRATARIS et al., 2012). Tais variações podem estar relacionadas à localização geográfica, tipo de população amostral (domiciliado, abrigo, errante, saudável, doente), exposição à artrópode vetor, método de diagnóstico empregado (Sorologia, hemocultivo, PCR, qPCR, nested PCR, hemocultivo + PCR), bem como os genes selecionados para diagnóstico molecular (BOULOUIS et al., 2005).

No Brasil, embora estudos acerca da ocorrência de *Bartonella* spp. em gatos sejam escassos, nos últimos 10 anos maior atenção tem sido destinada a esta importante zoonose. No final da década de 90, anticorpos anti-*B.henselae* foram detectados, através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), em 46% (47/102) dos gatos recebidos entre 1994 e 1995 pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de São Paulo (SLHESSARENKO et al., 1996).

Utilizando a mesma ferramenta de diagnóstico, outros trabalhos foram publicados na região Sudeste. Loureiro e Hagiwara (2007) observaram soroprevalência de *Bartonella henselae* de 16% (32/200) em gatos saudáveis e doentes em São Paulo. No Rio de Janeiro, anticorpos anti-*B.henselae* foram detectados em 35,7% (5/14) de gatos saudáveis pertencentes a tutores portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Neste mesmo estudo, cães contactantes e proprietários não foram reativos para *B. henselae* e o DNA bacteriano não foi amplificado de ectoparasitos coletados dos animais (LAMAS et al., 2010). Neste mesmo estado, anticorpos anti-*B.henselae* e DNA de *Bartonella* spp. foram detectados em 25% (9/36) e 97.3% (36/37) dos gatos de um abrigo em Vassouras, respectivamente (SOUZA et al., 2010). Crissiuma et al. (2011), por outro lado, observaram frequências de infecção semelhantes utilizando a técnica de RIFI (47.5%; 19/40) e PCR (42.5%; 15/40) em gatos clinicamente saudáveis submetidos a programa de castração no Rio de Janeiro.

Em gatos de abrigos municipais do Rio Grande do Sul, DNA bacteriano foi detectado em 17% (8/47) dos animais amostrados, com frequência de infecção de 10.6% (5/47) para *B. henselae* e 6.4% (3/47) para *B. clarridgeiae*. Destes, 87.5% (7/8) apresentavam estruturas intraeritrocíticas em esfregaço sanguíneo sugestivas de infecção por *Bartonella* spp. (STAGGEMEIER et al., 2010). Utilizando PCR como ferramenta diagnóstica, baixa frequência de infecção por *Bartonella* spp. foi reportada em populações de gatos saudáveis em São Paulo (4.3%; 2/46) e no Maranhão (4.5%; 9/200), as espécies *B. henselae* e *B. clarridgeiae* foram detectadas em ambos os estudos (BORTOLI et al., 2012; BRAGA et al., 2012). Níveis de infecção semelhantes foram reportados em estudos conduzidos em população de gatos de abrigo e doentes no Mato Grosso (2.2%; 4/178) e Mato Grosso do Sul (1.6%; 3/182), nestes, o DNA bacteriano só foi detectado em gatos de abrigo (MICELI et al., 2013; BRAGA et al., 2015). No Rio de Janeiro, Kitada et al. (2014) observaram sororeatividade em 56.6% (107/189) da população amostrada, destes, 64.3% (72/112) apresentavam-se coinfetados por *Sporothrix* spp. e 45.5% (35/77) sem manifestações clínicas. Neste mesmo ano, André et al. (2014) detectaram DNA bacteriano em 30% (11/37) de gatos errantes que vivem no zoológico de São Paulo.

Estudos conduzidos com a técnica de qPCR evidenciaram infecção por *B. henselae* e *B. clarridgeiae* em 25.5% (12/47) de gatos de abrigos municipais no Rio Grande do Sul, e 30.5% (46/151) dos gatos amostrados no Mato Grosso do Sul, destes, 54.4% eram domiciliados e 45.6% errantes (STAGGEMEIER et al., 2014; ANDRÉ et al., 2015). Recentemente, DNA bacteriano foi detectado em 20% (6/30) de gatos domiciliados no Rio Grande do Sul (MALHEIROS et al., 2016). No estado de Pernambuco, anticorpos anti-

Bartonella spp. foram detectados em 15% (6/40) de gatos pertencentes a áreas rurais, no entanto, nenhum destes animais apresentaram DNA bacteriano circulante. Por outro lado, DNA de *B. henselae* e *B. clarridgeiae* foi amplificado em pulgas coletadas destes mesmos felinos (FONTALVO et al., 2017). Estudos recentes, no Rio de Janeiro, demonstraram a presença do DNA de *Bartonella* spp. em 74.9% (122/163) de gatos domiciliados e 24.7% (22/89) em gatos errantes e semi-domiciliados no entorno de área de preservação ambiental (SOUZA et al., 2007; SIVA et al., 2008)

Considerando estudos em felinos selvagens, anticorpos anti-*B.henselae* foram detectados em 95% (18/21) dos felinos selvagens de vida livre capturados em distintos biomas do Brasil (FILONI et al., 2006) e 48% (71/147) em felinos selvagens de diferentes localidades no Brasil, destes, 42% (43/102) do zoológico de São Paulo e 62% (28/45) de felinos selvagens de vida livre capturados pela ONG Mata Ciliar em diversos estados no Brasil. Neste mesmo estudo, foi detectado DNA de *Bartonella* spp. em gato-maracajá (*Leopardus wiedii*) que veio a óbito. O felino foi mantido sob cuidados humanos por 15 anos e apresentava histórico de perda de peso acentuada, desidratação e anemia (FILONI et al., 2012). Baseado em técnicas moleculares, Guimarães et al. (2010) detectaram DNA de *B. henselae* em 14.9% (10/67) de felinos selvagens mantidos em cativeiro no Santuário de Bela Vista no Paraná.

2.2.2. Fatores de risco

Estudos epidemiológicos baseados em testes de diagnóstico sorológico e/ou molecular têm demonstrado maior prevalência de infecção em áreas de clima quente e úmido e em gatos infestados por pulgas e com acesso à rua (GUPTILL, 2010).

Na maioria das pesquisas, infecção por *Bartonella* spp. ocorre com maior frequência em gatos errantes ou de abrigos, jovens (<1 ano), com histórico de infestação por pulgas e que convivem com outros gatos no mesmo ambiente (CHOMEL et al., 1995; GURFIELD et al. 2001; GUPTILL et al., 2004; GIL et al., 2013). Gatos com hábito de caça foram significativamente mais propensos a ser soropositivos do que os gatos que não caçavam, tal fato pode estar associado a maior exposição a artrópodes vetores e/ou outras formas de transmissão deste agente (GUPTILL et al., 2004). Guimarães et al. (2011) observaram que felinos selvagens machos apresentaram-se mais propensos a infecção.

2.2.3. Transmissão

Atualmente, artrópodes vetores (moscas hematófagas, pulgas, piolhos e carrapatos) vêm sendo incriminados na transmissão destes agentes aos animais (BOULOUIS et al., 2005; TSAI et al., 2011).

Estudos baseados em formas de transmissão e evidências epidemiológicas apontam a presença de pulgas (*Ctenocephalides felis*) como elemento crucial na transmissão horizontal de *B. henselae*, *B. clarridgeiae* e *B. koehlerae* aos gatos (CHOMEL et al., 1996; ABBOTT et al., 1997; ROLAIN et al., 2003; TSAI et al., 2011; KAMANI et al., 2015). Tal condição está relacionada à ausência de soroconversão ou bacteremia em gatos não infectados quando em convívio com gatos infectados em ambientes livres de ectoparasitos (CHOMEL et al., 1996; ABBOTT et al., 1997).

Estudo sugere que, assim como observado experimentalmente, as pulgas possam transmitir *B. henselae* através da saliva ao se alimentarem em hospedeiro susceptível (BOUHSIRA et al., 2013). No entanto, a efetiva transmissão bacteriana pela pulga durante repasto sanguíneo ainda não foi comprovada *in vivo* e deste modo, acredita-se que a exposição do hospedeiro as fezes de pulgas contaminadas seja a principal rota de transmissão (FOIL et al., 1998).

B. henselae, *B. clarridgeiae* e *B. quintana* persistem por alguns dias em fezes eliminadas por pulgas infectadas (BOUHSIRA et al., 2013). Os gatos, por sua vez, contaminam suas garras e cavidade oral com fezes durante o processo de higienização (BOUHSIRA et al., 2013; NAMEKATA et al., 2010; OSKOUIZADEH et al., 2010; PENNISI et al., 2013). Deste modo, ao interagir com outros gatos e/ou ser humano, por meio de mordedura e/ou arranhaduras, pode ocorrer inoculação bacteriana. Corroborando a estes achados, tem-se a indução de bacteremia em gatos após a inoculação intradérmica de fezes de pulgas contaminadas (FOIL et al., 1998).

Resumidamente, acredita-se que as pulgas adquirem as bactérias durante o repasto sanguíneo em gato infectado. Nas pulgas, as bactérias se replicam no aparelho digestivo e nas glândulas salivares e são transmitidas pelo vetor através da saliva durante repasto sanguíneo ao hospedeiro susceptível ou por inoculação das fezes contaminadas durante interações entre os gatos por arranhaduras e/ou mordeduras.

Os carrapatos são considerados potenciais vetores de espécies de *Bartonella*. As observações que suportam a transmissão de *Bartonella* spp. entre gatos, cães, humanos e outros hospedeiros mamíferos incluem a detecção de DNA bacteriano em carrapatos coletados em animais e em humanos com histórico de mordida por carrapatos e improvável exposição a gatos ou pulgas (COTTÉ et al., 2008; TSAI et al., 2011; MAGGI et al., 2013). Em estudo baseado em alimentação artificial, Cotté et al. (2008) demonstraram a transmissão transtadial de *B. henselae* por carrapatos *Ixodes ricinus*, bem como migração, multiplicação bacteriana nas glândulas salivares e transmissão através da saliva dos carrapatos. Neste mesmo estudo, gatos experimentalmente infectados, apresentaram-se bacterêmicos sete dias após infecção. Deste modo, os autores sugerem a competência vetorial de *I. ricinus* para *B. henselae*. No entanto, apesar desta evidência, a questão da transmissão de *B. henselae* por carrapatos a um hospedeiro vertebrado em condições naturais e sua importância epidemiológica permanece incerta (ANGELAKIS et al., 2010; CHOMEL e KASTEN, 2010).

O Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária (ACVIM) recomenda que o sangue de gatos e cães doadores seja rastreado para algumas doenças infecciosas vetoradas ou não por artrópodes vetores, dentre estas, hemoplasmose, cytauxzoonose e bartonelose (WARDROP et al., 2005), logo, a transfusão sanguínea configura uma possível rota de transmissão de *Bartonella* spp. Aparentemente não ocorre transmissão de *B. henselae* entre gatos por via sexual, vertical (transplacentária, durante o nascimento e lactação) e, adicionalmente, por mordedura ou arranhadura em ambientes livres de pulgas (ABBOTT et al., 1997).

Dentre as espécies de *Bartonella* responsáveis por doença em humanos, *B. henselae* apresenta destaque. A transmissão de *B. henselae* ao homem ocorre mais comumente através da inoculação bacteriana em lesões cutâneas causadas, principalmente, por arranhões de gatos contaminados com fezes de pulgas (CHOMEL et al., 1996; MAGUIÑA et al., 2009). A transmissão por mordeduras de gatos também é relatada na literatura, apesar de ocorrer com menor frequência (CHOMEL et al., 2006a). O papel dos artrópodes vetores na transmissão direta de *Bartonella* spp. ao homem ainda não foi esclarecida (CHOMEL et al., 1996), entretanto, sabe-se que a presença da pulga *C. felis* é essencial na manutenção da infecção na população felina (BREITSCHWERDT e KORDICK, 2000). Tal o fato que existe uma elevada correlação entre a alta infestação por pulgas em gatos e o elevado número de casos diagnosticados em humanos (CHOMEL et al., 1996).

2.2.4. Patogenia e sinais clínicos

Acredita-se que o conceito geral do ciclo de infecção seja comum entre os membros do gênero *Bartonella*. Presumivelmente, o ciclo de infecção inicia-se pela inoculação de *Bartonella* nos hospedeiros mamíferos por ação de artrópodes hematófagos. Embora o nicho primário da colonização bacteriana ainda não esteja bem definido, acredita-se que seja o endotélio vascular, local onde residem e se replicam inicialmente. Em intervalos de dois e cinco dias, as bactérias são liberadas do nicho primário para a corrente sanguínea, de onde podem retornar ao nicho primário e iniciar outro ciclo de infecção, ou infectarem os eritrócitos numa sequência de etapas que incluem adesão/ligação aos eritrócitos, invasão, replicação em um compartimento intracelular ligado à membrana e persistência intracelular não replicativo durante várias semanas, o que viabiliza a transmissão vetorial (HARMS e DEHIO, 2012) (Figura 1).

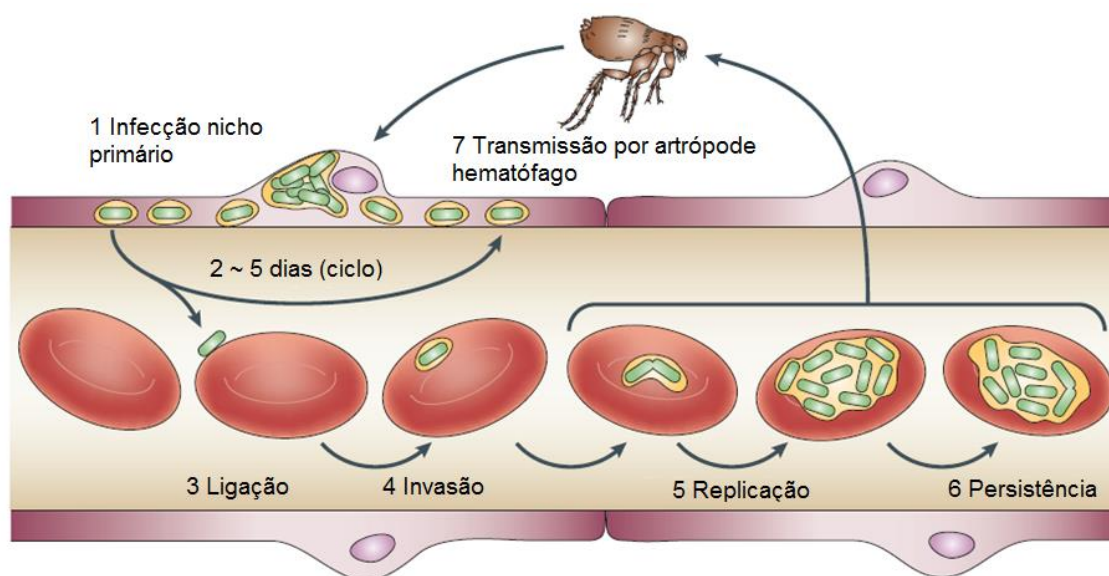


Figura 1: Modelo do ciclo de infecção de espécies de *Bartonella* (Adaptado de Dehio, 2005)

A invasão intraeritrocítica é uma estratégia de persistência bacteriana, pois permite as bactérias evadir o sistema imune do hospedeiro e conseqüentemente, promover bacteremia crônica persistente, além de diminuir consideravelmente a eficácia de antimicrobianos e permitir integridade bacteriana para eficiente transmissão pelo artrópode vetor (MEHOCK et al., 1998; ROLAIN et al., 2002; HARMS e DEHIO, 2012).

Os gatos domésticos são considerados reservatórios naturais de algumas espécies de *Bartonella* e, desta maneira, carreadores assintomáticos destas bactérias. Na dinâmica da infecção, gatos infectados com *B. henselae* ou *B. clarridgeiae* podem desenvolver bacteremia crônica que pode se estender por anos e ser recorrente com intervalos irregulares, tal cronicidade pode se estender por tempo indeterminado quando em exposição contínua às pulgas (ABBOTT et al., 1997; KORDICK et al., 1995; KORDICK et al., 1999; YAMAMOTO et al., 2003). O período para soroconversão é variável, no entanto, ocorre geralmente em duas semanas após a bacteremia e o pico de título atingido em média após 28 dias da inoculação, sucessivamente há declínio gradual e se mantém em nível estável por anos (ABBOTT et al., 1997). Estudo a cerca de reinfeção por *Bartonella* sugere que a resposta imunológica protetora seja específica a determinado genótipo e/ou a espécie infectante. Gatos previamente infectados por *B. henselae* tipo I ou tipo II foram

susceptíveis à infecção por *B. clarridgeiae*. De maneira semelhante, gatos infectados por *B. koehlerae* ou *B. clarridgeiae* demonstraram ser susceptíveis à infecção por *B. henselae* tipo I ou II. Por outro lado, gatos inicialmente infectados por *B. henselae* tipo I tornaram-se protegidos contra infecção por este mesmo genótipo e demonstraram proteção parcial ou completa contra infecção subsequente por *B. henselae* tipo II (YAMAMOTO et al., 2003).

A maioria dos gatos natural ou experimentalmente infectados não apresenta sinais clínicos (GUPTILL, 2010). Apesar de extenso estudo, a relação entre a infecção com *Bartonella* spp. e doença clínica nos gatos ainda está sob investigação e não foi comprovada até a presente data.

Muitos dos estudos baseiam-se na detecção de anticorpos por testes sorológicos. Estes, no entanto, apresentam valor limitado no estabelecimento de correlação entre infecção e achados clínicos, pois apenas evidenciam exposição ao agente e não infecção ativa (STÜTZER e HARTMANN, 2012). Deste modo, estudos baseados na detecção de DNA bacteriano são necessários para evidenciar a bartonelose felina clínica (BRUNT et al., 2006). Vale ressaltar ainda que, a elevada prevalência de *Bartonella* spp. em gatos saudáveis torna difícil demonstrar a relação causal entre alterações clínicas e patógeno (STÜTZER e HARTMANN, 2012). Esta elevada prevalência associada a um curso de infecção assintomático demonstra uma longa história de co-evolução e equilíbrio da relação entre *Bartonella* spp. e os gatos (ABOUDHARAM et al., 2005).

Em infecção experimental com *Bartonella* spp., ossinais clínicos, se presentes, geralmente são leves, transitórios e com resolução espontânea. As anormalidades já reportadas na literatura incluem abscesso nos locais de inoculação, linfadenopatia periférica, febre autolimitante, anemia discreta, letargia, anorexia e sinais neurológicos suaves (GUPTILL et al., 1997; KORDICK et al., 1999; YAMAMOTO et al., 2003).

Gatos naturalmente infectados por *B. henselae* normalmente não manifestam sinais clínicos e aparentemente toleram a bacteremia crônica sem anormalidades clínicas notórias (STÜTZER e HARTMANN, 2012). Ainda que não conclusivos, estudos têm sido direcionados na investigação da associação entre a infecção por *Bartonella* spp. e alterações clínicas diversas em gatos, tais como: endocardite (CHOMEL et al., 2003; PEREZ et al., 2010), estomatite (SYKES et al., 2010), miocardite piogranulomatosa e miosite diafragmática (VARANAT et al., 2012), febre de causa desconhecida (LAPPIN et al., 2009; BREITSCHWERDT et al., 2015), uveíte (LAPPIN et al., 2000) e desordens no sistema nervoso central (PEARCE et al., 2006; LEIBOVITZ et al., 2008). Destes, apenas os casos fatais de endocardite, miocardite piogranulomatosa e miosite diafragmática apresentaram evidências da relação causal. Sugere-se que gatos têm maior probabilidade de desenvolver doença clínica quando infectados por espécies de *Bartonella* para as quais não constitui reservatório como, por exemplo, *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*, espécie incriminada em caso de osteomielite recorrente em gato (VARANAT et al., 2009).

No tocante às enfermidades concomitantes à infecção por *Bartonella* spp. em gatos, as retrovíroses FIV (Vírus da Imunodeficiência Felina) e FeLV (Vírus da Leucemia Felina) se destacam, pois constituem as retrovíroses mais frequentes e potencialmente imunossupressoras da clínica de felinos. Segundo Breitschwerdt (2008), tais retrovíroses aparentemente aumentam a patogenicidade de *Bartonella henselae* em gatos.

As condições clínicas sugeridas como atribuíveis à bartonelose felina também podem resultar de outras etiologias, tal fato torna difícil determinar se as espécies de *Bartonella* são, de fato, responsáveis pela afecção (GUPTILL, 2010). Deste modo, faz-se necessário o diagnóstico diferencial com outras doenças crônicas como herpesvírus felino tipo I, síndromes neurológicas, vírus da imunodeficiência felina (FIV) e leucemia felina

(FeLV), toxoplasmose, doença fúngica sistêmica e linfoma (ALMEIDA e BABO-TERRA, 2013; PRESSLER, 2006).

Na maioria dos casos os achados histopatológicos são normais. Alguns gatos apresentam hiperplasia de órgãos linfóides e pequenos focos de inflamação linfocítica, piogranulomatosa ou neutrofílica em pulmão, fígado, baço, rim ou coração, outros demonstraram pequenos focos de necrose hepática ou esplênica (KORDICK et al., 1999).

2.2.5. Diagnóstico

Há diversas técnicas disponíveis para diagnóstico de agentes infecciosos na medicina felina (VEIR e LAPPIN, 2010). O diagnóstico da bartonelose em amostras clínicas ainda constitui um desafio, uma vez que *Bartonella* spp. são organismos fastidiosos, de difícil crescimento em meios de cultura (BRUNT et al., 2006).

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), infecções por *Bartonella* spp. em gatos devem ser confirmadas por meio de cultivo de sangue ou tecidos, por amplificação de sequência de DNA das bactérias presentes por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ou detecção de anticorpos anti-*Bartonella*. No entanto, o diagnóstico definitivo de *Bartonella* é difícil, uma vez que o valor diagnóstico de cada teste permanece incerto e indisponível.

Os testes sorológicos, ensaio imunoenzimático (ELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI), constituem alternativa de diagnóstico. No entanto, estes testes têm limitações quanto a diferenciação entre infecção ativa e contato prévio e pela reatividade cruzada com *Coxiella*, *Chlamydia* e outras espécies de *Bartonella*. O resultado sorológico positivo sugere exposição, mas não prova a infecção atual e é incapaz de determinar a espécie infectante e um resultado negativo não exclui a infecção (ALMEIDA e BABO-TERRA, 2013; NAKAMURA et al., 2011; WHITTEMORE et al., 2012). O teste sorológico de imunofluorescência indireta é a ferramenta diagnóstica mais sensível para confirmar a exposição bacteriana, no entanto, não é útil na identificação de quais animais podem representar um risco para a saúde dos proprietários ou identificar os animais que necessitam de tratamento. Logo, os resultados dos testes sorológicos devem ser interpretados com cautela (BRUNT et al., 2006).

As limitações dos testes sorológicos adicionadas à rapidez de execução, assim como, a especificidade e sensibilidade elevadas das técnicas de biologia molecular resultaram no uso frequente da PCR no diagnóstico de enfermidades infecciosas (VEIR e LAPPIN, 2010). Identificação molecular e sequenciamento de genes específicos tem sido uma alternativa para o diagnóstico de *Bartonella* spp., auxiliando dessa forma na identificação de reservatórios para espécies com potencial mórbido para seres humanos e animais domésticos. DNA bacteriano pode ser detectado em sangue, fluido e/ou tecido. Resultados positivos identificam a presença do DNA de *Bartonella* spp., no entanto, não indicam que o micro-organismo está vivo ou que o gato está clinicamente doente em função da infecção. Por outro lado, resultados falso-negativos podem ocorrer em função da bacteremia intermitente, uso de antibióticos, ausência ou pouco DNA microbiano na amostra testada (NAKAMURA et al., 2011).

Zanutto et al. (2001) e Varanat et al. (2009) demonstraram aumento da sensibilidade da PCR no diagnóstico de *Bartonella* spp., quando há associação da mesma ao hemocultivo prévio da amostra. De forma que esta associação constitui método mais eficiente no diagnóstico de felinos infectados e bacterêmicos. André et al. (2015) e Staggemeier et al. (2014) demonstraram maior sensibilidade de diagnóstico utilizando o PCR em tempo real quando comparado a PCR convencional.

No tocante as alterações laboratoriais hematológicas ou bioquímicas relacionadas à infecção, poucos estudos tem sido desenvolvidos. Dos poucos relatos, todos são baseados em evidências em gatos experimentalmente infectados. São relatadas desde ausentes a discretas alterações laboratoriais, como presença de anemia discreta a moderada, neutrofilia madura, linfocitose e eosinofilia persistente em gatos infectados por *B. henselae* (BREITSCHWERDT e KORDICK, 2000; BREITSCHWERDT et al., 2005; GUPTILL, 2010; SOUZA et al., 2017). Hiperglobulinemia foi associada à infecção natural por espécies de *Bartonella* (WHITTEMORE et al., 2012).

O diagnóstico de bartonelose felina envolve um conjunto de achados, como evidência clínica de síndrome associada à infecção por *Bartonella* spp., exclusão de outras possíveis causas da síndrome clínica, detecção de *Bartonella* spp. nos testes diagnósticos (cultura microbiológica, PCR e/ou sorologia) e resposta ao tratamento preconizado para bartonelose em felinos (BRUNT et al., 2006).

2.2.6. Tratamento

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças, a terapia antimicrobiana com doxiciclina, amoxicilina, enrofloxacin, rifampicina ou eritromicina instituída por período prolongado (4 a 6 semanas) pode ser efetivo na minimização da bacteremia em gatos, no entanto, nenhum protocolo terapêutico baseado em antimicrobiano único ou a combinação destes demonstrou total eficiência na eliminação dos micro-organismos da circulação sanguínea. Dado ao prolongado período requerido de tratamento e a possibilidade de desenvolvimento de resistência antimicrobiana, a instituição de tratamento é indicada apenas em circunstâncias específicas: gatos com sinais clínicos de infecção por *Bartonella* spp. ou gatos jovens de até dois anos infectados por *Bartonella* spp. com manifestação ou não de sinais clínicos e que convivam com pessoas imunocomprometidas ou crianças (STÜTZER e HARTMANN, 2012).

O tratamento de eleição em gatos infectados e assintomáticos em contato com indivíduos imunossuprimidos é a doxiciclina devido à efetividade e segurança terapêutica. A dose recomendada é de 5-10mg/Kg uma ou duas vezes ao dia administrado por via oral junto à alimentação ou com fornecimento subsequente de água devido ao risco de esofagite associada à terapia com tetraciclina em gatos (McGROTTY e KNOTTENBELT, 2002; GERMAN et al., 2005; STÜTZER e HARTMANN, 2012). O tratamento não garante a total eliminação bacteriana em todos os gatos submetidos ao protocolo terapêutico (STÜTZER e HARTMANN, 2012). Tal fato pode estar relacionado à presença de genes de resistência aos antibióticos em *B. henselae*, de forma que tratamentos alternativos podem ser necessários em alguns casos (NAKAMURA et al., 2011).

Existem alguns relatos bem sucedidos de uso de antibióticos em felinos. Mostraram-se eficazes a administração associada de azitromicina (10mg/Kg/48h durante 3 meses) e amoxicilina/clavulanato (62,5mg/12h durante 2 meses) no tratamento de osteomielite recorrente em gato infectado por *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*, bem como, associação de amoxicilina/clavulanato (22mg/Kg/24h), marbofloxacin (5mg/Kg/24h) e azitromicina (10mg/Kg/24h) durante 6 semanas em tratamento de endocardite ocasionada por *Bartonella henselae* (VARANAT et al., 2009; PEREZ et al., 2010).

O tratamento de gatos assintomáticos não é recomendado, salvo exceção acima citada. E, quando necessário o tratamento antimicrobiano, o controle contínuo dos ectoparasitos, em especial as pulgas deve ser iniciado e mantido. É digno de nota que, embora o tratamento diminua o nível de bacteremia nos gatos, não há evidências concretas de que não haverá transmissão do patógeno aos proprietários (GUPTILL, 2012).

2.2.7. Prevenção

Considerando as possibilidades de transmissão associadas aos fatores de risco, a prevenção de infecções por *Bartonella* em gatos é realizada evitando a exposição a animais infectados e suas pulgas. Recomenda-se eliminar os ectoparasitos, especialmente as pulgas, evitar acesso às ruas e gatos errantes. Outra medida profilática inclui a não administração de hemocomponentes de gatos infectados a gatos doentes, visto que, é relatada a transmissão de *Bartonella* spp. por inoculação de sangue de gato infectado (WARDROP et al., 2005; GUPTILL, 2012).

Com relação à prevenção no homem, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças recomenda evitar arranhões e mordidas, principalmente de gatos de rua/errantes ou filhotes, pois o DNA bacteriano também pode ser amplificado a partir de saliva de gatos assintomáticos e doentes, bem como de suas unhas, portanto, mordidas e arranhões devem ser evitados (QUIMBY et al., 2008; KIM et al., 2009), controle de ectoparasitas em gatos, especialmente as pulgas; manter os gatos no interior das casas e sem contato com gatos errantes. Tais medidas são especialmente importantes para indivíduos imunocomprometidos.

2.2.8. Importância na Saúde Pública

O gênero *Bartonella* compreende importantes patógenos associados a diversas manifestações clínicas em humanos. Destes, *Bartonella henselae* é a principal espécie transmitida dos gatos para humanos (STÜTZER e HARTMANN, 2012). Acredita-se que a transmissão de *B. henselae* de gatos aos seres humanos ocorra principalmente por meio de arranhões contaminados com excrementos de pulgas (CHOMEL et al., 1996)

Há uma variação considerável nas apresentações clínicas e lesões associadas à infecção por *Bartonella* spp. em pessoas. Esta variabilidade pode ser atribuída a diferenças de estirpes bacterianas, bem como a integridade e diferenças na resposta imunológica do indivíduo infectado (KORDICK et al., 1997). As espécies de *Bartonella* provocam uma variedade de síndromes clínicas em humanos, que incluem doença da arranhadura do gato (DAG), angiomatose e peliose bacilar, peliose bacilar parenquimatosa, febre recorrente com bacteremia, endocardite, neurite óptica, osteomielite e granulomas pulmonares, hepáticos e esplênicos. De maneira geral, indivíduos imunocompetentes apresentam infecções localizadas e auto-limitantes, por outro lado, em imunocomprometidos, a infecção frequentemente é sistêmica e possivelmente fatal (GUPTILL, 2015).

Indivíduos imunocompetentes normalmente não exibem sinais clínicos e estes, quando presentes, caracterizam uma infecção localizada, tipicamente DAG (STÜTZER e HARTMANN, 2012; GUPTILL, 2015). O termo DAG denota geralmente uma doença auto-limitante caracterizada por febre e linfadenopatia (NOAH et al., 1997). Estudos têm sugerido que a bartonelose não constitui doença importante apenas para indivíduos imunocomprometidos. Correa et al. (2012) demonstraram elevada associação entre infecção por *Bartonella* spp. e cardiomiopatias (endocardite, arritmias e doença de Chagas).

Por outro lado, indivíduos imunocomprometidos são mais gravemente acometidos, principalmente aqueles portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (CHOMEL et al., 2004). Tal o fato, que dentre uma população soropositiva para HIV e *Bartonella* spp., 35,7% dos gatos pertencentes a este grupo de pacientes também eram soropositivos para *Bartonella*, sugerindo a importância dos gatos domésticos na transmissão da bactéria para estes indivíduos (LAMAS et al. 2010). Curi et al. (2006) associaram a ocorrência de manifestações oculares à infecção por *B. henselae* em três pacientes HIV positivos com histórico de contato com gatos. Infecção por *B. henselae* foi reportada em paciente HIV

positivo com sinais clínicos e histórico de mordidas e arranhaduras por seus gatos, sendo estes também positivos para *Bartonella* spp. (DOS SANTOS et al., 2008). Todos estes estudos confirmam a estreita relação entre gatos e bartonelose em humanos imunocomprometidos e ressaltam a importância do diagnóstico e prevenção desta zoonose.

E, de extrema importância, o fato da soroprevalência de *Bartonella* spp., especialmente *B. henselae*, ser superior em grupos de risco específicos, nos quais veterinários e crianças destacam-se (CHOMEL e KASTEN, 2010). *Bartonella henselae* e *B. clarridgeiae* já foram detectadas em veterinários que apresentavam sintomas variáveis (febre, dor de cabeça, linfadenopatia, lesão papular, convulsões e anormalidades neurológicas) e histórico de mordidas e arranhaduras por gatos (KORDICK et al., 1997; MAGGI et al., 2013). Representam um grupo vulnerável a infecções por estes agentes em virtude das atividades inerentes à profissão, como estar em frequente contato com gatos expostos ou infestados por pulgas, gatos domiciliados e errantes, dos quais pouco se sabe sobre sua condição clínica, bem como imprudência, por parte destes profissionais, na higienização das mãos entre atendimentos clínicos ou demais procedimentos, e na higienização imediata de feridas após mordidas sofridas (BRUNT et al., 2006). Em decorrência de poucas informações disponíveis a respeito da ocorrência de bartonelose em veterinários e por representarem grupo potencial de risco, estes profissionais devem utilizar equipamentos de proteção e conterem adequadamente seus pacientes felinos antes de qualquer procedimento a fim de evitar mordidas e arranhões (MAGGI et al., 2013).

Instituições de saúde internacionais relacionadas ao tratamento de infecções oportunistas em adultos, adolescentes e crianças infectadas ou expostas ao HIV recomendam que ao adotar gatos, os mesmos tenham idade superior a um ano, estejam em bom estado de saúde e livre de pulgas, com manutenção do controle mensal das pulgas e impedimento de lambedura de feridas ou cortes pelos felinos (GUPTILL, 2010). Embora esta recomendação não esteja explicitamente relacionada à bartonelose, evidencia-se a vigilância à sanidade destes animais e conseqüentemente ao homem, principalmente àqueles em condições imunossupressoras.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Os procedimentos efetuados no estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da presente instituição sob protocolo de número 027/2014 (Anexo II).

O estudo foi conduzido com gatos pertencentes a diferentes abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, cuja amostragem abrangeu, no máximo, 30% da população total de gatos. Duzentos e oito gatos foram amostrados, por conveniência não probabilística, e subdivididos em dois grupos: a) Grupo 1, referente a abrigos localizados no município do Rio de Janeiro (68 gatos em 4 abrigos) e b) Grupo 2, àqueles localizados nos municípios de Belford Roxo, Duque de Caxias, Guapimirim, Itaguaí, Mesquita, Nova Iguaçu, São Gonçalo e Seropédica (140 gatos em 14 abrigos) (Figura 2). Previamente a coleta de sangue dos gatos, os tutores foram devidamente esclarecidos sobre os termos do projeto, objetivos e importância do estudo e posteriormente um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I) foi assinado permitindo a coleta e uso do material na pesquisa. Informações individuais dos felinos, tais quais, padrão racial, sexo, idade, histórico de ectoparasitos e doenças e ambiente foram obtidas.



Figura 2: Municípios da Região Metropolitana do Rio de Janeiro dos quais foram obtidas as amostras de sangue de felinos domésticos.

■ Grupo 1: Rio de Janeiro (n=68) e ■ Grupo 2: Demais municípios (n=140) – a) Itaguaí (n=16), b) Seropédica (n=46), c) Nova Iguaçu (n=20), d) Duque de Caxias (n=7), e) Mesquita (n=20), f) Belford Roxo (n=7), g) Guapimirim (n=9), h) São Gonçalo (n=15).

3.2. Exame Clínico dos Gatos

Os gatos amostrados foram devidamente contidos e inspecionados quanto à presença de ectoparasitos. E estes, quando presentes, coletados manualmente, acondicionados em microtubos estéreis e armazenados a -20°C até processamento.

Os dados do exame clínico foram registrados em fichas clínicas individuais, contendo além dos sinais clínicos evidenciados, dados referentes ao comportamento, condição corporal, histórico e presença de ectoparasitos. O total de gatos amostrados foi subdividido em sintomático e assintomático segundo a presença ou ausência dos seguintes sintomas: anorexia, letargia, falha reprodutiva, diarreia, alterações de pele, alterações oculares (conjuntivite, lacrimejamento excessivo, secreção), alterações orais (estomatite, gengivite, úlceras orais), desidratação, febre ($>39,2^{\circ}\text{C}$), linfadenomegalia, alterações respiratórias, alterações no trato urinário (obstrução urinária, hematúria e cálculo renal) e enfermidades (esporotricose e hipertireoidismo).

3.3. Coleta de Sangue

As amostras sanguíneas foram obtidas por venopunção cefálica, femoral ou jugular. O total de 3 mL de sangue coletado foi dividido em frascos contendo EDTA (2 mL) e sem anticoagulante (1 mL) para posterior separação do soro sanguíneo por centrifugação. As amostras coletadas foram transportadas sob refrigeração e processadas, no prazo máximo de 24h, no laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. As alíquotas de soro foram preservadas em congelamento a -20°C e utilizadas na realização do teste sorológico. As amostras nos tubos contendo EDTA foram empregadas na análise hematológica e posteriormente armazenados à -80°C para posterior processamento laboratorial (biologia molecular), conforme descrito abaixo.

3.4. Análises Hematológicas

A análise hematológica foi realizada por meio do contador hematológico automático de células (Poch 100iV/Roche), cujos parâmetros hematológicos determinados foram: contagem de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$), leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$), determinação de hemoglobina (g/dL), volume globular (%), CHCM (%), VCM (fL). Morfologia eritrocitária e leucometria específica (percentual de eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, monócitos e basófilos) foram avaliadas em esfregaços sanguíneos corados pelo método de coloração instantânea (Panótico Rápido®) com auxílio de microscópio óptico, objetiva de imersão 1000x. A concentração de proteínas totais foi determinada pela técnica de refratometria.

3.5. Testes Sorológicos *Bartonella henselae*

A detecção de anticorpos IgG anti- *B. henselae* foi realizada por *Kit* comercial de Reação de Imunofluorescência Indireta (Bion®, Illinois, USA). O título de 1:64 foi utilizado como ponto de corte (CRISSIUMA et al., 2011). Como controle positivo foi utilizado Soro de felino reconhecidamente positivo e disponível na soroteca do Laboratório de Referência Nacional para Rickettsioses (IOC/FIOCRUZ).

3.6. Identificação Taxonômica dos Ectoparasitos

Utilizando estereoscópio, todos os exemplares dos ectoparasitos coletados foram identificados morfológicamente ao nível de gênero ou espécie por critério entomológico segundo Linardi e Santos (2012) para pulgas, Urquhart et al. (1998) para piolhos e Barros-Battesti et al. (2006) para carrapatos.

3.7. Detecção Molecular de *Bartonella* spp.

3.7.1. Extração de material genômico

3.7.1.1. Ectoparasitos

Pulgas e carrapatos foram acondicionados individualmente em microtubos estéreis e os piolhos, coletados do mesmo hospedeiro, foram acondicionados em dupla. Algumas das pulgas ovipuseram no interior dos tubos, desta forma, estes ovos foram subdivididos em pools por hospedeiro e também direcionados a extração de DNA conforme protocolo descrito por Horta et al. (2007), a seguir: Cada pulga ou carrapato ou pool de piolhos ou ovos de pulgas foram macerados em microtubos estéreis e eluídos em 40 μL de tampão Tris EDTA (10 mM Tris-HCl; 0.5 mM EDTA; pH 9.0). A suspensão final foi submetida ao processo de fervura a 100°C durante 30 minutos. Para a garantia de qualidade da extração, água ultra-pura esterilizada (Invitrogen) foi processada como controle negativo em paralelo com as amostras.

3.7.1.2. Sangue dos gatos

Uma amostra de 200 μL de sangue total foi submetida ao processo de extração de DNA total utilizando o Kit Relia Prep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. Para monitoramento de DNA contaminante durante o processo de extração de DNA total, água ultra-pura esterilizada (Invitrogen) foi utilizada como controle negativo. Todas as amostras de DNA total tiveram suas concentrações determinadas pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000, separadas em alíquotas e armazenadas à -20°C até a realização dos ensaios moleculares.

3.7.2. Reações em cadeia da polimerase

As amostras foram submetidas à PCR convencional para a detecção de *Bartonella* spp. baseadas nos genes *gltA* e Região Intergênica ITS (16S-23S RNA Ribossomal), conforme descrito por Norman et al. (1995) e Maggie e Breitschwerdt (2005), respectivamente (Tabela 1). As reações de amplificação foram realizadas no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) com as seguintes especificações: volume final de 25µL, contendo uma mistura de 4µL DNA teste ou controle, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,2µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5mM de Cloreto de Magnésio, 0,5U de Platinum Taq polimerase, tampão de PCR (1x) e água ultra-pura esterilizada. Os controles positivos utilizados em todas as reações consistiam em *B. henselae* (cepa Houston) cultivadas em células HEp-2. Água ultrapura livre de DNase e RNase (Invitrogen) foi utilizada como controle negativo das reações.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1%, 90V durante 60 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen). Os resultados foram visualizados e analisados através do transiluminador de luz ultravioleta Biorad (Biorad gel doc XR) e com coloração por GelRed (Biothium).

Tabela 1: Descrição da sequência de oligonucleotídeos iniciadores ('primers') e das condições de amplificação para detecção de *Bartonella* spp.

Agente	Sequência do oligonucleotídeo (5' - 3')	Condições de amplificação
<i>Bartonella</i> spp. Maggie e Breitschwerdt (2005)	ITS 321s (AGATGATGATCCCAAGCCTTCTGG) 983as (TGTTCTYACAACAATGATGATG)	94°C/5' + 40 X [94°C/45'' + 54°C/45'' + 72°C/45''] + 72°C/7'
<i>Bartonella</i> spp. Norman et al. (1995)	gltA BhCS.781p (GGGGaCCaGCTCAtGGtGG) BhCS.1137n (AaTGCAAAAAGaACAGTaAACA)	94°C/5' + 35 X [95°C/20'' + 56°C/30'' + 72°C/1'] + 72°C/7'

3.8. Sequenciamento de Nucleotídeos

Produtos de amplificação de amostras positivas nas reações de PCR foram selecionados aleatoriamente e purificadas com o *kit* comercial Illustra GFX PCR (GE Healthcare). As sequências foram determinadas em sequenciador automático modelo ABI3730xl (Applied Biosystems), segundo seu manual de instruções. As sequências obtidas foram analisadas utilizando o programa DNA Sequence Assemble v4 e comparadas com outras sequências disponíveis no GenBank utilizando a ferramenta de pesquisa de alinhamento local básica (BLAST, National Center for Biotechnology Information, disponível em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.9. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do teste Qui-Quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de significância para verificar associação entre infecção por *Bartonella* spp. e os dados obtidos. Os parâmetros hematológicos foram primeiramente submetidos ao teste de normalidade de *Lilliefors*. Quando os dados apresentaram distribuição normal, foram avaliados por análise de variância (ANOVA) em nível de significância de 5%, em contrapartida, quando a distribuição dos dados não foi normal, foi aplicado o teste de *Mann-Whitney* em nível de significância de 5%. A frequência das alterações hematológicas no grupo de gatos infectados e não infectados foi comparada através do teste exato de Fisher ou Qui-quadrado em nível de 5% de significância. Para a realização de todos os testes estatísticos acima mencionados foi utilizado o programa de análise estatística Bioestat 4.0.

4 CAPÍTULOS

Os resultados desta tese serão apresentados na forma de artigos científicos. Cada capítulo corresponde a um dos artigos, a seguir:

4.1. CAPÍTULO I – “Molecular survey of *Bartonella* species in shelter cats in a metropolitan area, Brazil: clinical, hematological and risk factors”

Bartonella spp. in shelter cats, Brazil

Juliana Macedo Raimundo¹, Andresa Guimarães¹, Gleice Marques Amaro¹, Aline Tonussi da Silva¹, Camila Flávia Magalhães Botelho¹, Carlos Luiz Massard², Elba Regina Sampaio de Lemos³, Alexsandra Rodrigues de Mendonça Favacho⁴, Cristiane Divan Baldani^{1*}

¹ Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil

² Laboratório de Hemoparasitos e Vetores, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil

³ Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁴ Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

*Corresponding author: Cristiane Divan Baldani. Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, BR 465, Km 47, CEP 23890-000, Seropédica, RJ, Brasil. e-mail: crisbaldani@gmail.com

SUMMARY

The present study aimed to detect *Bartonella* DNA in cats belonging to shelters, and to evaluate risk factors, clinical signs, and hematological abnormalities associated with infection. Complete blood counts and screening for the presence of *Bartonella* DNA were performed on cats EDTA-blood samples. Eighty-three cats (39.9%) were positive for *Bartonella* species. *Bartonella* DNA was also detected in fleas and in the blood of cats infested by positive flea. Cats that had been sterilized, had outdoor access, had histories of fights, and had concurrent flea infestation were more likely to be infected by *Bartonella* species ($p < 0.05$). Age and sex were not associated with infection. Cats with blood collected between March and June months were significantly more frequently infected ($p < 0.05$). Fifty-one (38.6%) of symptomatic cats were positive to *Bartonella* species ($p > 0.05$). Clinical conditions most commonly observed were signs of respiratory abnormality and *Sporothrix* species coinfection ($p > 0.05$). Regarding hematological changes, eosinophilia was associated with infection ($p < 0.05$). A high frequency of *Bartonella* species infection was found in shelter cats and highlights the importance of an adequate flea control programs to prevent infection in cats and consequently in adopters and other animals.

Keywords: Feline diseases, *Bartonella* spp., Eosinophilia, Fleas, Shelter cat, Zoonoses, Brazil.

INTRODUCTION

Bartonella species are small, fastidious, gram-negative bacteria, arthropod-transmitted that have been isolated from numerous host species, including humans, rodents, rabbits, felids, canids, and ruminants [1]. Cats are likely the main mammalian reservoir hosts for the zoonotic species *Bartonella henselae*, *B. clarridgeiae* and *B. koehlerae*, agents commonly associated with human disease and transmitted between cats by *Ctenocephalides felis* fleas [2]. Human transmission occurs by means of cat bites and scratches with teeth and nail contaminated with flea feces. In humans, these bacteria are responsible for many clinical syndromes including cat scratch disease, endocarditis, bacillary angiomatosis, granulomatous hepatitis, meningitis, and glomerulonephritis. Some of these can be fatal, especially for immunocompromised patients [2,3].

Although *Bartonella* infection in cats is common, relationship details of these bacteria with the cat, including possible role of *Bartonella* species in pathogenesis of feline diseases, are far from clear [1]. Most infected cats remain asymptomatic carriers for years. However, studies have suggested a potential association between *Bartonella* DNA detection and clinical signs in cats such as endocarditis [4,5], stomatitis [6], pyogranulomatous myocarditis and diaphragmatic myositis [7], fever of unknown cause [8,9], and central nervous system diseases [10]. Regarding hematological findings, limited data are available in cats that were naturally or experimentally infected. Nevertheless, some cats have shown transient anemia, persistent eosinophilia and mature neutrophilia [11,12].

Bartonellosis in cats occurs worldwide. However, in Brazil there are very few studies, especially focusing on detection and molecular characterization of *Bartonella* species [13-16]. Considering that bartonellosis can lead to non specific signs, studies involving these agents are important, particularly to assess their actual occurrence in veterinary clinical practice.

The aims of this study were to detect *Bartonella* DNA in blood of potentially naturally infected cats by means of Polymerase Chain Reaction (PCR) diagnosis and to evaluate associated risk factors, clinical signs, and hematological abnormalities in cats from shelters located in Metropolitan Region of Rio de Janeiro, Brazil.

METHODS

Cat sample

The procedures followed in this study were previously approved by the ethics committee for the use of animals at the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (protocol number 027/2014).

The survey was carried out in shelters (autonomous and independent organizations which aims to rescue, sterilize and promote adoption of abandoned cats) located in the metropolitan region of Rio de Janeiro, Brazil. Two-hundred and eight cats were sampled and divided into groups: group 1, those in the Rio de Janeiro municipality (68 cats in 4 shelters) and group 2, those in the Belford Roxo, Duque de Caxias, Guapimirim, Itaguaí, Mesquita, Nova Iguaçu, São Gonçalo, and Seropédica municipalities (140 cats in 14 shelters). After the owners granted consent, blood samples were aseptically obtained by cephalic phlebotomy, transferred into sterile tubes containing ethylenediamine tetraacetic acid anticoagulant, and maintained at 4°C until hematological analysis.

Cats were physically examined for ectoparasites presence, which were also collected when possible. The following data were recorded for each cat: age (kitten \leq 1

year vs. adult > 1 year), sex (male vs. female), outdoor access, sterility status, evidence of fight history, ectoparasites status (previous and current infestation), ectoparasiticide use, vaccination status, worm therapy, and contact with other animal species as reported by the owners. Following clinical evaluation cats were classified as symptomatic or asymptomatic according to clinical manifestation previously reported on literature [6,17] and others clinical signs observed during feline physical examination.

Hematological analysis

Complete blood count was carried out using the fully automated analyzer Poch-100 iV (Roche), in accordance with the manufacturer's recommendations. Differential leukocyte counts were performed manually on Diff Quick stained thin blood films, using an optical microscope, with immersion objective lens magnification of 1000x and total plasma protein concentration determined by refractometry [18]. After hematological tests were completed, blood samples were stored at -80°C until molecular analyses were undertaken.

Molecular assays

DNA extraction from 200 μL of whole blood was performed using a ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System kit (Promega), in accordance with the manufacturer's instructions. Flea DNA extraction was performed individually as previously described [19]. Concentration and purity were determined using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). For monitoring contaminant DNA during the process of DNA extraction, sterilized ultrapure water was used as a negative control and processed in parallel with the samples. DNA samples were screened for the presence of the 16S-23S rRNA intergenic spacer (ITS) region and the *gltA* gene using primers previously reported [20,21]. Following amplification, PCR products were subjected to horizontal electrophoresis on 1% agarose gel and stained with GelRed® (Biothium). The positive control consisted of *B. henselae* (Houston strain) cultured in HEp-2 cells. All PCR runs were performed with nuclease-free water (Invitrogen) as negative control.

Sequence analysis

A total of fifty-one positive samples were randomly selected, purified using an Illustra GFX PCR Purification Kit (GE Healthcare), and submitted to sequencing using an automatic sequencer (ABI3730xl, Applied Biosystem). Sense and antisense sequence were analyzed using DNA Sequence Assembler v.4 software and compared with those deposited in the GenBank DNA database using the basic local alignment search tool (BLAST, National Center for Biotechnology Information, available at <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Statistical analysis

Association between *Bartonella* species infection and risk factors, months of blood collection, clinical signs and hematological abnormalities were evaluated by comparing frequencies with Chi-square and Fisher's exact test with a significance level of 5%. Hematological analyses were evaluated with the Lilliefors normality test, followed by analysis of variance (ANOVA) or the Mann-Whitney test at the 5% significance level. Additionally, frequencies of the hematological abnormalities eosinophilia (eosinophils count $>0.8 \times 10^3$ cells/ μL), thrombocytopenia (platelets count $<300 \times 10^3$ cells/ μL), lymphopenia (lymphocytes count $<1.5 \times 10^3$ cells/ μL), and hyperproteinemia (total plasma protein concentration $>7.5\text{g/dl}$) were correlated with *Bartonella* positivity. All statistical tests were performed using Bioestat 5.0 statistical software.

RESULTS

Of the 208 shelter cats sampled, eighty-three (39.9%) were positive for *Bartonella* species based on ITS (16S-23S) and *gltA* gene results. The frequency in groups 1 and 2 was 22.1% and 48.6%, respectively ($p < 0.01$) (Table 1). *Bartonella* DNA was also detected in fleas from cats infected by the bacteria. Cats were more frequently infected by *Bartonella* species during the period of March to June (52.2%) than December to March (27.7%) ($p < 0.05$) (Figure 1 and Table 2). Among the 51 positive samples selected, sequencing confirmed *Bartonella henselae* (68.6%, 35/51), *Bartonella clarridgeiae* (23.5%, 12/51), and *Bartonella koehlerae* (17.6%, 9/51) infections in cats. Three (5.9%) and two (3.9%) cats were concurrently infected with *B. henselae* plus *B. clarridgeiae* and *B. clarridgeiae* plus *B. koehlerae*, respectively. Cat fleas were found to harbor *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* DNA. No *B. koehlerae* strain was detected in fleas.

Additionally, cats that were sterilized, had outdoor access, showed evidence of fight histories, were infested with fleas at the time of collection, and did not receive ectoparasiticide prophylactic management or vaccination protocols were more likely to be infected by *Bartonella* species ($p < 0.05$). Young and adult cats of both sexes had similar chance of becoming infected ($p > 0.05$).

Cats with past or present ectoparasite infestation or prior flea infestation had greater chances of bacterial infection, although these findings were not statistically significant ($p > 0.05$). In contrast, tick or lice infestation was not linked to infection ($p > 0.05$). Cats in contact with other species, especially opossums as reported by the owners, were more likely to be infected, although the correlation was not significant ($p > 0.05$) (Table 2).

Symptomatic (38.6%) and asymptomatic (42.1%) cats had similar chances of becoming infected ($p > 0.05$). Bacterial infection was seen most commonly in cats presenting respiratory signs (42.6%) or *Sporothrix* species infection (39.3%). Less commonly, it was observed in cats with oral (28.6%) or ocular (20%) signs and chronic diarrhea (16.7%) ($p > 0.05$). Nonspecific clinical signs such as anorexia, lethargy, dehydration, fever, and lymphadenopathy were not associated with infection ($p > 0.05$) (Table 3). Eosinophilia was associated with infection ($p < 0.05$), being observed in 64% of *Bartonella* species positive cats. No other hematological abnormality was associated with infection ($p > 0.05$) (Tables 4 and 5).

DISCUSSION

Zoonosis studies have become more important in recent years because the cat population has risen noticeably and adopting domestic animals has become more common. In Brazil, few previous studies have addressed *Bartonella* infection in cats, including risk factors, and hematological and clinical abnormalities. In the present study, 39.9% of cats tested positive for *Bartonella* DNA, which is higher than those found in previous reports, including those that address cats from shelters [13,15,22-24]. Similar results were reported in California, USA [24]. Notably, it was found 97.3% of cats harbored bacterial DNA in a shelter in Vassouras municipality, Rio de Janeiro, which is attributable to local conditions [25].

Bartonella infection was significantly higher in cats from group 2 when compared to those from group 1 (Rio de Janeiro municipality), which may be explained by differences in hygiene conditions and preventive flea control applied in these shelters. Approximately 69% (97/140) of the cats from group 2 shelters were flea infested, which

represents four times the level observed in cats from group 1 (16.1%, 11/68). This finding supports us to establish a correlation between bacteremia and flea infestation. The presence of *Bartonella* DNA in *C. felis* fleas collected in bacteremic cats also suggests that these ectoparasites play an important role in the transmission of *Bartonella* species to cats. It was shown *C. felis* to be a potential vector for *Bartonella* species, including those for which cat serve as a natural reservoir, *B. henselae* and *B. clarridgeiae* [26].

Apparently, there is a seasonal trend of this bacterial infection. In the study, we observed that the number of cats infected by the bacteria (52.2%, 35/67) and infested by fleas (55.5%, 60/108) were both highest in the autumn months (20 March to 19 June), a finding also observed in previous studies [24,27]. A possible explanation is that owners, thinking that cat flea season is over, reduce measures to control flea infestation in their pets. Indeed, autumn months represent an active period for fleas, especially in Rio de Janeiro, where temperatures remain moderate year round and so fleas can proliferate.

Previous or current ectoparasite infestation showed a nonsignificant association with *Bartonella* species bacteremia in cats, with animals that had fleas at any time in their life being almost three times more likely to be bacteremic than those that had not. Cats harboring fleas at the time of blood collection had significantly increased risk of being infected by *Bartonella* species. A similar correlation to *B. henselae* bacteremia was found [28]. In addition, vector control programs were crucial to avoid *Bartonella* species infection, as cats that did not use ectoparasiticides were significantly more likely to be infected. These findings reinforce the association between *Bartonella* species bacteremia in cats and past or present flea contact and highlights *C. felis* as a primary vector for these bacterial agents. It is noteworthy that prevention of *Bartonella* infection in cats is best accomplished by preventing exposure to ectoparasites, especially fleas.

Non-sterilized cats and those with outdoor access were significantly more likely to be bacteremic than other cats. Although it was not associated with infection, a study found that non-sterilized cats were twice as likely to be bacteremic than sterilized ones [29]. These findings reinforce the importance of fleas in cat infection as non-sterilized and with outdoor access cats are greater exposed to arthropod vectors.

Interestingly, cats with histories of fight behavior had twice the chance of becoming infected. Experimental intradermal inoculation of *Bartonella* species has induced bacteremia in cats [30,31]. In addition, *Bartonella* species has been successfully isolated from saliva and nails of naturally infected cats [24,32,33]. This evidence suggests the possibility that cats have other sources of infection besides direct horizontal transmission via fleas. Previous studies have demonstrated that *Bartonella* bacteremia is higher in younger animals [22,34]. Although, our results demonstrate that young and adult cats of both sexes have similar chance of becoming infected. Such results are consistent with other studies [29,35].

Although the association was not significant, cats that lived in presence of other animals generally showed almost two times more chance of becoming infected by *Bartonella* species. Interestingly, presence of opossums in the neighborhood increased the risk of infection by three times. Opossums (*Didelphis* species) are synanthropic animals and, therefore, adapted to peridomicile environments. *Ctenocephalides felis* flea, the main ectoparasite involved in transmission of *Bartonella* species among cats has been shown to parasitize opossum species in Brazil, including Rio de Janeiro State [36,37]. Along these lines, the presence of these ectoparasites in opossums indicates their proximity to human residences and to domestic animals. This interaction highlights the imminent risk of pathogen transmission between animal species through arthropod vectors and,

consequently, to humans, thus posing a public health risk [36]. More studies are needed to understand the importance of opossums in the epidemiological chain of this disease.

Endoparasites presence or absence seems not to be related to *Bartonella* infection in cats. On the other hand, cats without adequate vaccinations were at significantly higher risk of infection. It is important to note that the shelter cats studied generally live under constantly stressful conditions including as poor nutrition, crowding, inadequate hygiene and vaccination measures, which may interfere with cats' immune status [38]. In such scenarios, inadequate or absent vaccinal support predispose the animals to such immunosuppressive diseases as retroviruses, which appear to increase the pathogenicity of *B. henselae* infection in cats [39].

No clinical signs were associated with *Bartonella* species infection since symptomatic and asymptomatic cats have similar chances of becoming infected. This finding is consistent with other authors [17], according to whom most naturally infected cats do not show clinical signs and appear to tolerate chronic bacteremia without obvious clinical abnormalities. However, previous studies have suggested *Bartonella* species are causative agents of clinical condition such as endocarditis, stomatitis, pyogranulomatous myocarditis and diaphragmatic myositis, fever of unknown cause and central nervous system diseases [4-10]. It should be mentioned that is difficult to establish causal associations between clinical conditions and such a pathogen as *Bartonella* species, which has high prevalence in the reservoir host population. This high prevalence of asymptomatic bacteremia indicates that there is a long history of co-evolution between *Bartonella* and their cat hosts [40].

Many of the symptoms exhibited by the cats of this study are nonspecific and common to other diseases affecting these animals routinely. Therefore, the likelihood that some clinical conditions have multiple causes must also be considered, particularly in cats exposed to arthropod vectors. Thus, a differential diagnosis with other diseases of common occurrence in the feline clinical routine is necessary [12].

Regarding laboratory findings, eosinophilia was highly associated with *Bartonella* species infection in cats, being present in 64% of bacteremic cats. In accordance with our results, a study has observed persistent eosinophilia in cats experimentally infected with *Bartonella* species and related this hematological finding with infection chronicity [11]. It is important to note that other clinical conditions may also cause this hematological change, such as infection by intestinal parasites and skin or respiratory abnormalities found in cats from this study. And so, further studies are needed to verify if there is a real correlation between eosinophilia and *Bartonella* infection in cats.

The high occurrence of *Bartonella* species in cats from shelters at Metropolitan Area of Rio de Janeiro emphasize the need for local veterinary community, owners, and public health authorities to be alert to the risk of infection. Ectoparasites control measures, especially those designed to prevent flea infestation should be implemented to minimize the risk of infection by cats, other vertebrate hosts, and humans.

Table 1: Distribution of *Bartonella* species bacteremia in shelters cats located in municipalities at metropolitan region of Rio de Janeiro, Brazil

<i>Bartonella</i> species infection						
Group	Municipality	N° of cats	Positive	Negative	%	p-value
1	Rio de Janeiro	68	15	53	22.1	0.0004
2	Others	140	68	72	48.6	
	Duque de Caxias	7	4	3	57.1	
	Itaguaí	16	9	7	56.3	
	Mesquita	20	9	11	45.0	
	Nova Iguaçu	20	11	9	55.0	
	Seropédica	46	24	22	52.2	
	Belford Roxo	7	4	3	57.1	
	São Gonçalo	15	6	9	40.0	
	Guapimirim	9	1	8	11.1	

Table 2: Statistical analysis of factors associated with *Bartonella* species bacteremia in cats from shelters located in the Metropolitan Region of Rio de Janeiro State, Brazil (to be continued)

Variable	Cats (n)	Positive (%)	p (X ²)	Odds Ratio	IC (95%)
Age					
Young (≤1 yr)	68	28 (41.2) ^a		1	
Adult (>1yr)	140	55 (39.3) ^a	0.9122	1.08	0.60-1.95
Sex					
Female	110	41 (37.3) ^a		1	
Male	98	42 (42.9) ^a	0.4971	1.26	0.72-2.20
Outdoor access					
No	135	46 (34.1) ^a		1	
Yes	73	37 (50.7) ^b	0.0288	1.99	1.11-3.55
Sterilized					
No	101	49 (48.5) ^b		2.02	
Yes	107	34 (31.8) ^a	0.0202	1	1.15-3.56
Historic of fights					
No	151	52 (34.4) ^a		1	
Yes	57	31 (54.4) ^b	0.0138	2.27	1.22-4.22
Present ectoparasite infestation					
No	27	6 (22.2) ^a		1	
Yes	181	77 (42.5) ^a	0.0718	2.59	1.00-6.73
Past ectoparasites infestation					
No	84	27 (32.1) ^a		1	
Yes	124	56 (45.2) ^a	0.0824	1.74	0.97-3.10
Present tick infestation					
No	196	78 (39.8) ^a		1	
Yes	12	5 (41.7) ^a	0.9998	1.08	0.33-3.53
Present lice infestation					
Yes	24	8 (33.3) ^a		1	
No	184	75 (40.8) ^a	0.6332	1.38	0.56-3.38

Present flea infestation					
No	100	32 (32.0) ^a		1	
Yes	108	51 (47.2) ^b	0.0359	1.9	1.08–3.35
Past flea infestation					
No	28	6 (21.4) ^a		1	
Yes	180	77 (42.8) ^b	0.0525	2.74	1.06–7.09
Ectoparasiticide use					
Yes	135	46 (34.1) ^a		1	
No	73	37 (50.7) ^b	0.0288	1.99	1.11–3.55
Vaccination					
Yes	89	28 (31.5) ^a		1	
No	119	55 (46.2) ^b	0.0447	1.87	1.05–3.33
Worm therapy					
Yes	168	65 (38.7) ^a		1	
No	40	18 (45.0) ^a	0.5805	1.3	0.64–2.60
Contact with other species					
No	78	24 (30.8) ^a		1	
Yes	130	59 (45.4) ^a	0.0527	1.87	1.03–3.38
Contact with dogs					
No	23	9 (39.1) ^a		1	
Yes	185	73 (40.0) ^a	0.8844	1.04	0.43–2.52
Contact with opossums					
No	196	75 (38.3) ^a		1	
Yes	12	8 (66.7) ^a	0.0685	3.22	0.94–11.1
Contact with horse					
No	186	72 (38.7) ^a		1	
Yes	22	11 (50.0) ^a	0.4281	1.58	0.65–3.84
Period (months)					
22/Sep - 20/Dec	43	15 (34.9) ^{ab}			
21/Dec - 19/Mar	47	13 (27.7) ^a		1	
20/Mar - 19/Jun	67	35 (52.2) ^b	0.0154	2.86	1.29–6.36
20/Jun - 21/Sep	51	20 (39.2) ^{ab}			

^{a,b} Same letters in the same column do not differ according to Fisher's exact or Chi-square test at 5% significance.

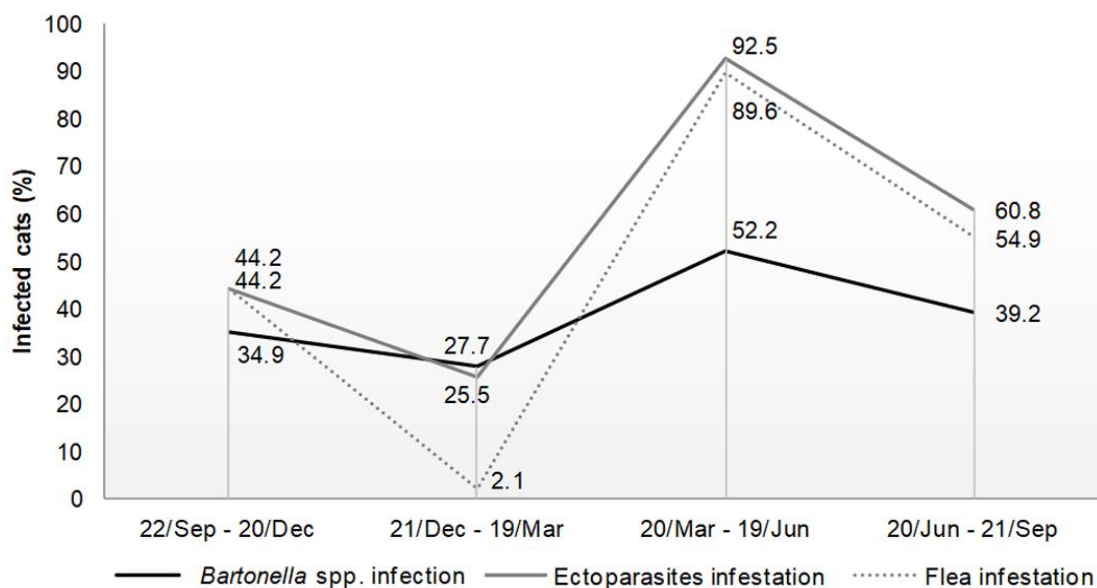


Figure 1: Distribution of *Bartonella* species in shelter cats by period (months).

Table 3: Association between *Bartonella* species bacteremia in asymptomatic and symptomatic cats, clinical signs and diseases reported in 208 shelter cats from Metropolitan Region of Rio de Janeiro State, Brazil

Clinical signs or disease	Positive	Negative	Total	%	p-value
Asymptomatic	32	44	76	42.1	0.7301
Symptomatic	51	81	132	38.6	
Anorexia	0	11	11	0.0	0.0036
Lethargy	0	7	7	0.0	0.0434
Reproductive failure	0	1	1	0.0	1.0000
Diarrhea	2	10	12	16.7	0.1295
Skin lesions	5	17	22	22.7	0.1312
Ocular signs	1	4	5	20.0	0.6502
Oral signs	4	10	14	28.6	0.4142
Stomatitis	0	1	1	0.0	1.0000
Gingivitis	3	10	13	23.1	0.2515
Ulcers in the tongue	1	1	2	50.0	1.0000
Urinary tract disorders	1	3	4	25.0	0.6519
Fever (>39,2°C)	12	25	37	32.4	0.3729
Dehydration	19	38	57	33.3	0.3029
Sporotrichosis	11	17	28	39.3	0.8921
Respiratory Signs	20	27	47	42.6	0.8008
Hyperthyroidism	1	1	2	50.0	1.0000

Table 4: Hematological results from 208 shelter cats screened for *Bartonella* spp. infection

<i>Bartonella</i> species						
Parameter	Result	Mean	DP	EP	p-value	Reference*
RBC ($10^6/\mu\text{l}$)	Positive	8.3 ^a	1.5	0.2	0.6645	5.0-10.0
	Negative	8.1 ^a	1.6	0.2		
Hematocrit (%)	Positive	37.7 ^a	6.5	0.7	0.3098	30-45
	Negative	36.1 ^a	7.0	0.6		
Hemoglobin (g/dl)	Positive	11.6 ^a	2.0	0.2	0.2335	9.8.-15.4
	Negative	11.1 ^a	2.3	0.2		
MCV (fl)	Positive	45.5 ^a	4.8	0.5	0.4197	39-55
	Negative	44.7 ^a	4.1	0.4		
MCHC (%)	Positive	30.8 ^a	2.1	0.2	0.8655	30-36
	Negative	30.8 ^a	1.8	0.2		
Platelet ($10^3/\mu\text{l}$)	Positive	371 ^a	135	15.0	0.0494	300-800
	Negative	334 ^b	142	12.7		
TPP (g/dl)	Positive	7.9 ^a	0.8	0.1	0.0109	6.0-7.5
	Negative	8.3 ^b	1.1	0.1		
WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	Positive	17.14 ^a	7.55	0.83	0.4587	5.5-19.5
	Negative	16.70 ^a	8.13	0.73		
Band neutrophils ($10^3/\mu\text{l}$)	Positive	0.25 ^a	0.31	0.03	0.6806	0.0-0.3
	Negative	0.35 ^a	0.59	0.05		
Segmented neutrophils ($10^3/\mu\text{l}$)	Positive	10.21 ^a	6.77	0.74	0.9719	2.5-12.5
	Negative	10.23 ^a	6.83	0.61		
Lymphocytes ($10^3/\mu\text{l}$)	Positive	4.96 ^a	3.13	0.34	0.2116	1.5-7.0
	Negative	4.35 ^a	2.58	0.23		
Monocytes ($10^3/\mu\text{l}$)	Positive	0.45 ^a	0.38	0.04	0.2568	0.0-0.9
	Negative	0.53 ^a	0.47	0.04		
Eosinophils ($10^3/\mu\text{l}$)	Positive	1.27 ^a	0.88	0.10	0.0169	0.0-0.8
	Negative	1.14 ^b	1.14	0.10		
Basophils ($10^3/\mu\text{l}$)	Positive	0.01 ^a	0.07	0.01	0.9615	0.0-0.2
	Negative	0.01 ^a	0.06	0.01		

^{a,b} Same letters in the same column did not differ according to Mann-Whitney test at 5% significance. RBC: Red blood cell count; MCV: Mean corpuscular volume; MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration; TPP: Total plasma protein concentration; WBC: White blood cell count; DP: standard deviation; EP: standard error. *Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine

Table 5: Hematological results for *Bartonella* infection in cats from shelters located in the Metropolitan Region of Rio de Janeiro State, Brazil

Hematological change		<i>Bartonella</i> species n(%)		p-value
		Positive (n=83)	Negative (n=125)	
Eosinophilia	Yes	53 (63.9) ^a	60 (48.0)	0.0352
	No	30 (36.1) ^b	65 (52.0)	
Thrombocytopenia	Yes	20 (24.1) ^a	50 (40.0)	0.0259
	No	63 (75.9) ^b	75 (60.0)	
Lymphopenia	Yes	02 (2.4) ^a	14 (11.2)	0.0305
	No	81 (97.6) ^b	111 (88.8)	
Hyperproteinemia	Yes	52 (62.7) ^a	92 (73.6)	0.1280
	No	31 (37.3) ^b	33(26.4)	

^{a,b} Same letters in the same column did not differ according to Chi-square test at 5% significance

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the researchers James R. Welch for revising English language of this manuscript, Maria L. Corrêa and Caio J. B. Coutinho Rodrigues for helping in the blood sample collection.

CONFLICT OF INTEREST

None

FINANCIAL SUPPORT

This research was financially supported by Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support in the State of Rio de Janeiro (FAPERJ; grant number: E-26/110.386/2014)

REFERENCES

1. **Guptill L.** *Bartonella* infections in cats: what is the significance? *In Practice* 2012; **34**: 434-445.
2. **Boulouis HJ, Chang CC, Henn JB.** Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Veterinary Research* 2005; **36**: 383-410.
3. **Almeida CLR, Babo-Terra V.** Bartonellosis in cats and its role in public health. *Acta Veterinaria Brasílica* 2013; **7**: 5-13.
4. **Chomel BB, et al.** Fatal case of endocarditis associated with *Bartonella henselae* type I infection in a domestic cat. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; **41**: 5337-5339.
5. **Perez C, et al.** Successful treatment of *Bartonella henselae* endocarditis in a cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2010; **12**: 483-486.
6. **Sykes JE, et al.** Association between *Bartonella* species infection and disease in pet cats as determined using serology and culture. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2010; **12**: 631-636.
7. **Varanat M, et al.** Identification of *Bartonella henselae* in 2 cats with pyogranulomatous myocarditis and diaphragmatic myositis. *Veterinary Pathology* 2012; **49**: 608-611.

8. **Lappin MR, et al.** Prevalence of *Bartonella* species antibodies and *Bartonella* species DNA in the blood of cats with and without fever. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2009; **11**: 141-148.
9. **Breitschwerdt EB, Broadhurst JJ, Cherry NA.** *Bartonella henselae* as a cause of acute-onset febrile illness in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2015; Open reports 1-9.
10. **Leibovitz K, et al.** *Bartonella* species antibodies and DNA in cerebral spinal fluid of cats with central nervous system disease. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2008; **10**: 331-337.
11. **Kordick DL, et al.** Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; **37**: 1536-1547.
12. **Guptill L.** Bartonellosis. *Veterinary Microbiology* 2010; **40**: 347–359.
13. **Staggemeier R, et al.** Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats in the south of Brazil: a molecular study. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2010; **105**: 873-878.
14. **Braga MSCO, et al.** Molecular characterisation of *Bartonella* species in cats from São Luís, state of Maranhão, north-eastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2012; **107**: 772-777.
15. **Miceli NG, et al.** Molecular detection of feline arthropod-borne pathogens in cats in Cuiabá, state of Mato Grosso, central-western region of Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 2013; **22**: 385-390.
16. **André MR, et al.** Tick-borne agents in domesticated and stray cats from the city of Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, midwestern Brazil. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 2015; **6**: 779-786.
17. **Stützer B, Hartmann K.** Chronic bartonellosis in cats: What are the potential implications? *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2012; **14**: 612-621.
18. **Meinkoth JH, Clinkenbeard KD, Rizzi TE.** Normal Hematology of the Cat. In: Weiss DJ, Wardrop KJ, eds. *Schalm's Veterinary Hematology*. Iowa: Blackwell Publishing, 2010, pp.152-161.
19. **Horta MC, et al.** *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2007; **102**: 793-801.
20. **Maggie RG, Breitschwerdt EB.** Potential limitations of the 16S-23S rRNA intergenic region for molecular detection of *Bartonella* species. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; **43**: 1171-1176.
21. **Norman AF, et al.** Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; **33**: 1797-1803.
22. **Bergmans AMC, et al.** Prevalence of *Bartonella* species in domestic cats in the Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; **35**: 2256-2261.
23. **Lappin MR, Hawley J.** Presence of *Bartonella* species and *Rickettsia* species DNA in the blood, oral cavity, skin and claw beds of cats in the United States. *Veterinary Dermatology* 2009; **20**: 509-514.
24. **Namekata DY, et al.** Oral shedding of *Bartonella* in cats: correlation with bacteremia and seropositivity. *Veterinary Microbiology* 2010; **146**: 371–375.
25. **Souza AM, et al.** Bartonelose: Análise molecular e sorológica em gatos do Rio de Janeiro – Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária* 2010; **17**: 7-11.

26. **Bouhsira E, et al.** *Ctenocephalides felis* an in vitro potential vector for five *Bartonella* species. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2013; **36**: 105-111.
27. **Fleischman DA, et al.** *Bartonella* infection among cats adopted from a San Francisco shelter, revisited. *Applied and Environmental Microbiology* 2015; **81**: 6446-6450.
28. **Guptill L, et al.** Prevalence, risk factors, and genetic diversity of *Bartonella henselae* infections in pet cats in four regions of the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; **42**: 652-659.
29. **Gurfield AN, et al.** Epidemiology of *Bartonella* infection in domestic cats in France. *Veterinary Microbiology* 2001; **80**: 185-198.
30. **Abbott RC, et al.** Experimental and natural infection with *Bartonella henselae* in domestic cats. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 1997; **20**: 41-51.
31. **Chomel BB, et al.** Experimental infection of cats with *Afipia felis* and various *Bartonella* species or subspecies. *Veterinary Microbiology* 2014; **172**: 505-510.
32. **Kim YS, et al.** Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats and dogs in Korea. *Journal of Veterinary Science* 2009; **10**: 85-87.
33. **Oskouizadeh K, Zahraei-Salehi T, Aledavood SJ.** Detection of *Bartonella henselae* in domestic cats' saliva. *Iranian Journal of Microbiology* 2010; **2**: 80-84.
34. **Chomel BB, et al.** *Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; **33**: 2445-2450.
35. **Tsai YL, et al.** *Bartonella* infection in shelter cats and dogs and their ectoparasites. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2011; **11**: 1023-1030.
36. **Barros-Battesti DM, Arzua M.** Geographical distribution by biomes of some marsupial siphonaptera from the state of Paraná, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1997; **92**: 485-486.
37. **Oliveira HH, et al.** Siphonaptera of small rodents and marsupials in the Pedra Branca State Park, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 2010; **19**: 49-54.
38. **Möstl K, et al.** Prevention of infectious diseases in cat shelters. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2013; **15**: 546-554.
39. **Breitschwerdt EB.** Feline bartonellosis and cat scratch disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2008; **123**:167-171.
40. **Aboudharam G, et al.** Molecular detection of *Bartonella* spp. in the dental pulp of stray cats buried for a year. *Microbial Pathogenesis* 2005; **38**: 47-51

4.2. CAPÍTULO II – “Prevalence of *Bartonella* species in shelter cats and their ectoparasites in Southeastern Brazil”

Bartonella spp. in cats and their ectoparasites

Juliana Macedo Raimundo¹, Andresa Guimarães¹, Gleice Marques Amaro¹, Aline Tonussi da Silva¹, Huarrisson Avezedo Santos², Elba Regina Sampaio de Lemos³, Aleksandra Rodrigues de Mendonça Favacho⁴, Cristiane Divan Baldani^{1*}

¹ Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Seropédica, RJ, Brazil

² Laboratório de Sanidade Avícola, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Seropédica, RJ, Brazil

³ Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁴ Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil.

*Corresponding author: Cristiane Divan Baldani. Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, BR 465, Km 47, CEP 23890-000, Seropédica, RJ, Brazil. email: crisbaldani@gmail.com

ABSTRACT

Cats are likely the main mammalian reservoir hosts for the zoonotic species *Bartonella henselae*, *B. clarridgeiae*, and *B. koehlerae*, agents commonly associated with many human diseases. Feline *Bartonella* can be transmitted to humans through cat scratches or bites, and between cats by *Ctenocephalides felis* flea. The occurrence of *Bartonella* DNA was assessed in ectoparasites and their cat hosts living in shelters in state of Rio de Janeiro, Brazil. Conventional polymerase chain reaction (PCR) based survey on the ITS region and *gltA* gene were performed to detect *Bartonella* genus DNA in cat blood and ectoparasites. *Bartonella* DNA was detected in 47.5% (19/40) of blood samples from shelter cats and in 18.3% (21/115) and 13.3% (2/15) of *Ctenocephalides felis* fleas and eggs pools, respectively. No bacterial amplification was observed in a *Rhipicephalus sanguineus* nymph. *Bartonella henselae* and *B. clarridgeiae* DNA were detected in cat fleas, while *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, and *B. koehlerae* in blood samples from bacteremic cats. Prevalence of bacteremia in cats and presence of positive ectoparasites did not differ significantly, although cats infested by positive ectoparasites showed approximately twice the chance of being infected. Our results indicate shelter cats have a high prevalence of *Bartonella* species known to be human pathogens and highlight the importance of controlling their infestation by ectoparasites to avoid cat and human infection.

Keywords: *Bartonella* spp., Vectors., Pathogen transmission, Cats, Cat flea

INTRODUCTION

Considering One Health concepts, studies approaching bartonellosis are important because this bacterial genus infects a broad variety of animals, are linked to an ever increasing number of human diseases, and are transmitted by arthropod vectors (REGIER et al., 2016). According to the List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (LPSN 2016), the genus *Bartonella* contains 33 species and 3 subspecies. Potential domesticated and wild animal reservoirs include horse, cats, dogs, rodent, rabbits, ruminants, sea mammals, wild felines, coyotes, deer, elk, and foxes. The list of vectors and potential vectors associated with bacterial transmission includes flies, fleas, ticks, lice, and mites (BALDANI et al., 2014). To date, natural infections in cats have been reported for six *Bartonella* species: *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. koehlerae*, *B. bovis*, *B. quintana*, *B. vinsonii* subsp. *Berkhoffii*, and more recently *B. capreoli* (CHOMEL & KASTEN 2010, VARANAT et al., 2009, GIL et al., 2013). Most *Bartonella* species infecting humans are zoonotic, and cats appear to be the primary mammalian reservoir for *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, and *B. koehlerae* (BOULOUIS et al., 2005). Feline *Bartonella* can be transmitted to humans through scratches or bites. Transmission between cats most often occurs via *Ctenocephalides felis* flea (CHOMEL et al., 1996, KORDICK et al., 1999, GUPTILL, 2012), which harbors *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. quintana*, and *B. koehlerae* DNA (ROLAIN et al., 2003).

In Brazil, little information is available about *Bartonella* occurrence in animals and humans, and to date no study has verified the occurrence of *Bartonella* spp. in cat shelters in the Southeast region. Therefore, the objective of this study was to investigate the prevalence of *Bartonella* infection in shelter cats and their ectoparasites.

MATERIALS AND METHODS

Cat sample

The study protocol was approved by the animal use ethics committee at Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (process number 027/2014). The survey was carried out in shelters in the Metropolitan Region of Rio de Janeiro State, Brazil, from September 2014 to September 2015. After obtaining the shelter owner's permission, approximately 2 mL of blood was aseptically obtained from cats by cephalic phlebotomy, transferred into sterile tubes containing the anticoagulant ethylenediamine tetraacetic acid, and maintained at -80°C until used for molecular analysis.

Ectoparasite collection and identification

Ectoparasites were retrieved manually from the cats, placed into dry sterile tubes, and stored at -20°C until used. All ectoparasites were morphologically identified to genus or species based on morphological criteria observed with a stereoscopic microscope, according to standard taxonomic keys by Linardi and Santos (2012) and Barros-Battesti et al. (2006).

Molecular detection

Fleas and ticks were individually packed in separate tubes. Some fleas laid eggs inside the tubes, permitting their separation into a single pool per specimen for DNA extraction. As described by Horta et al. (2007), each flea or tick and pool of flea eggs was ground in 40 μl of TE buffer (10 mM Tris-HCl; 0.5 mM EDTA; pH 9.0) in sterile micro

tubes. The final suspension was boiled at 100°C for 30 minutes and maintained at -20°C until tested by polymerase chain reaction (PCR). For cats, DNA was extracted from 200µL of whole blood sample using Kit Relia Prep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega®), according to the manufacturer's instructions. For quality assurance, a negative control was processed at the same time as the study samples.

All DNA samples were screened for the presence of *Bartonella* spp. 16S-23S rRNA intergenic spacer region (ITS) using primers 321s and 983as, as described by Maggi et al. (2005), and of citrate synthase gene (*gltA*) using primers BhCS.781p and BhCS.1137n, as previously reported by Norman et al. (1995). Following amplification, PCR products were subjected to horizontal electrophoresis on 1% agarose gel and stained with GelRed (Biothium, CA, USA). The positive control consisted of *B. henselae* (Houston strain) cultured in HEp-2 cells. All PCR runs were performed with nuclease-free water (Invitrogen, USA) as negative control. In order to prevent PCR contamination, DNA extraction, reaction setup, PCR amplification, and electrophoresis were performed in separated rooms.

Positives flea and cat samples were randomly selected and purified using the Illustra GFX PCR Purification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire England, UK). Purified DNA fragments were submitted to sequence confirmation in an automatic sequencer (ABI3730xl, Applied Biosystem, CA, USA). Sense and antisense sequences were analyzed using DNA Sequence Assembler version 4 software and compared with those deposited in the GenBank DNA database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, National Center for Biotechnology Information, available at <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Statistical analysis

The relationship between bacteremia in cats and their ectoparasites was evaluated by Fisher's exact test using the Bioestat 5.0 statistical software.

RESULTS

A total of 115 fleas and one tick were collected from 40 cats. All flea specimens were identified as *Ctenocephalides felis* adults. The tick specimen was identified as a *Rhipicephalus sanguineus* nymph. All sampled cats presented ectoparasites on their bodies. On average, approximately three fleas were collected per cat (range 1–9 fleas). Overall, 47.5% (19/40) of cats tested positive for *Bartonella* DNA according to both *gltA* and ITS (Table 1). Sequencing confirmed *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae*, and *Bartonella koehlerae* infection among the blood samples. Cases in which ITS and *gltA* sequences from a single same cat corresponded to different feline *Bartonella* species were considered coinfections.

Bartonella DNA was detected in 18.3% (21/115) of *C. felis* fleas, of which 15.7% were by means of the *gltA* gene and 4.3% by the ITS. Bacterial DNA was amplified for both ITS and *gltA* fragments in only three samples. Among 15 pools of eggs laid by fleas, 13.3% showed amplification of the expected *Bartonella* spp. *gltA* gene. *Bartonella henselae* DNA was detected in cat fleas and their respective eggs, while *Bartonella clarridgeiae* DNA was only identified in fleas. No eggs were positive for the ITS region. No amplification of *Bartonella* DNA was obtained in the *Rhipicephalus sanguineus* nymph. *Bartonella henselae* was the predominant species in both fleas and cats (Table 2).

At least one *Bartonella* species was detected in fleas in each shelter. Additionally, all bacteria species detected in each shelter's fleas were also identified in at least one of its cats. *Bartonella* spp. was also amplified from fleas belonging to apparently uninfected cats and from bacteremic cats infested by negative fleas. Not all fleas had the same *Bartonella* species as their hosts. Two of three positive fleas were infected with the same *Bartonella* species as their cat hosts (Table 2). Whereas 60% (n = 15) of cats with positive ectoparasites was bacteremic, the prevalence was only 40% (n = 25) in those infested by negative ectoparasites. Although cats infested by positive ectoparasites, especially fleas, had more than twice the chance of being infected, there was no statistical correlation between cats' bacteremia status and parasitism by positive fleas (Table 3).

DISCUSSION

One Health is an initiative aiming to bring together human, animal, and environmental health and plays a significant role in zoonosis prevention and control (BIDAISSE & MACPHERSON, 2014). The increasingly close health relationship between humans and their domestic animals, especially cats, is conspicuous. According to the Brazilian Association of Pet Products Industry, the cat population has shown an accelerated annual growth in Brazil. Based on these facts, zoonosis studies have become ever more important. From a public health perspective, cats are a major reservoir host for at least three zoonotic *Bartonella* species (*B. henselae*, *B. clarridgeiae*, and *B. koehlerae*) and they are commonly infested by *C. felis* fleas, which also represent the great majority of fleas observed in peoples' homes (BITAM et al., 2010). To the best of our knowledge, this is the first study in Brazil to investigate *Bartonella* DNA in ectoparasites and shelter cats.

The overall prevalence of *Bartonella* DNA was 47.5% in cat blood, 17.4% in fleas, and 13.3% in flea egg pools. The occurrence of *Bartonella* DNA was higher than previously reported, especially in shelter cats (BERGMANS et al., 1997, NAMEKATA et al., 2010, STAGGEMEIER et al., 2010, MICELI et al., 2013, BRAGA et al., 2015). However, Souza et al. (2010) reported 97.3% positivity in one shelter in Rio de Janeiro, Brazil. Risk factors which appear to influence the occurrence of bacteremia in cats include age, flea infestation status, and multiple cat households (CHOMEL et al., 1995, GURFIELD et al., 2001). *Bartonella* DNA detected in *C. felis* fleas varies worldwide, with prevalence ranging from 7.3% to 75.6% (ROLAIN et al., 2003, TSAI et al., 2011, GUTIÉRREZ et al., 2015, RIZZO et al., 2015). *Bartonella* DNA was not detected in ticks collected from shelter cats in Taiwan (TSAI et al., 2011).

This study confirmed *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae*, and *Bartonella koehlerae* single infection as well as coinfection by *B. henselae* and *B. clarridgeiae* in feline blood samples. Occurrence of concurrent infection by two or more *Bartonella* species are uncommon in the literature, being documented in low percentages of cats or being absent (GIL et al., 2013; ANDRÉ et al., 2015; GUTIÉRREZ et al., 2015). *Bartonella* species encountered in the present study in cat fleas (*B. henselae* and *B. clarridgeiae*) have also been detected in cat fleas in previous studies (ASSARASAKORN et al., 2012; ROJAS et al., 2015)

In all shelters, *Bartonella* spp. were detected in fleas and their hosts. In one shelter, *Bartonella* species detected in fleas and their eggs were different from those in their respective hosts. However, the discrepant bacteria species was detected in other cats sharing the same environment. For such non coincident cases, it is possible that fleas previously fed on different bacteremic cats from the one on which they were collected.

Interestingly, bacteria DNA was detected in fleas collected from non-bacteremic hosts and detected in cats harboring negative fleas. It is noteworthy that in this study, fleas collected from cats represent a sample of the real flea population present on cats and in the local environment. Thus, newly emerged or not yet infected fleas may have been collected. Examples of different bacterial species in fleas and cat hosts has been documented previously (LA SCOLA et al., 2002, GABRIEL et al., 2009, BAI et al., 2015, GUTIÉRREZ et al., 2015).

The presence of *Bartonella* DNA in *C. felis* fleas collected in bacteremic cats also suggests that these ectoparasites play an important role in the transmission of *Bartonella* species to cats. Bouhsira et al. (2013) have shown *C. felis* to be a potential vector for *Bartonella* species including those for which cats serve as natural reservoir, such as *B. henselae* and *B. clarridgeiae*. Although there was no statistical association, cats infested by fleas have at least twice the chance of becoming infected by *Bartonella*. Similarly, previous studies found no apparent correlation (LA SCOLA et al., 2002, BAI et al., 2015).

The possibility of vertical *Bartonella* spp. transmission among fleas remains a hypothesis. In our study, *B. henselae* DNA was detected in naturally infected fleas and their respective eggs. Consistent with our findings, *Bartonella* DNA was detected in reproductive tissues (ovary) of flea species collected from several mammals, suggesting that transovarian transmission of this organism among fleas may be possible (BRINKERHOFF et al., 2010). However, no *Bartonella* DNA was amplified in eggs laid by infected fleas, but the authors concluded that their results cannot be extended to natural conditions (BOUHSIRA et al., 2013). Knowledge of *Bartonella* behavior and dispersal in fleas is limited and the question of whether fleas can acquire *Bartonella* by mechanisms other than ingestion of infected blood remains. Additional studies are needed to validate the vertical transmission hypothesis. According to a study evaluating ticks as a possible bacterial vector, transovarian transmission was not supported because no bacterial amplification was obtained in larvae even though *B. henselae* DNA was detected in the respective egg pools laid by females ticks that had fed on infected blood (COTTÉ et al., 2008).

This study shows that three distinct *Bartonella* species occur in shelter cats in metropolitan region of Rio de Janeiro and that *B. henselae* and *B. clarridgeiae* circulate among fleas collected from them, reinforcing the importance of this ectoparasite in bacterial transmission between cats. For public health purposes, it is important to note that the three species identified in ectoparasites and their host cats are important agents associated with human disease. Thus, ectoparasites control measures should be implemented to prevent flea infestation and, consequently, *Bartonella* infection in cats and the humans with whom they have close contact.

Table 1: Prevalence of *Bartonella* DNA in cats and their ectoparasites in shelters located in the Metropolitan Region of Rio de Janeiro State, Brazil

DNA Samples	Cats (n/%)			
	Blood	Ectoparasites		
		Flea		Ticks
	Adults	Eggs (pool)		
Total N°. of samples	40	115	15	1
Total PCR Positive	19 (47.5)	21 (18.3)	2 (13.3)	0 (0.0)
<i>gltA</i> Positive	18 (45.0)	18 (15.7)	2 (13.3)	0 (0.0)
ITS Positive	10 (25.0)	5 (4.3)	0 (0.0)	0 (0.0)

Table 2: *Bartonella* species in cats and their fleas by shelter and sequencing (identities varied from 95 to 100%) in Rio de Janeiro State, Brazil

	Host Cat	Ectoparasites	
		Flea	
		Adult	Eggs
Shelter 1			
211	<i>B. henselae</i>	<i>B. henselae</i>	<i>B. henselae</i>
208	-	*	-
76	*	*	-
Shelter 2			
175	<i>B. clarridgeiae</i>	<i>B. henselae</i>	<i>B. henselae</i>
171	<i>B. koehlerae</i>	*	-
168	<i>B. henselae</i>	-	-
172	<i>B. henselae</i>	-	-
178	*	-	-
180	-	*	-
173	-	*	-
Shelter 3			
205	<i>B. clarridgeiae</i>	<i>Bartonella</i> sp.	-
207	<i>B. clarridgeiae</i>	*	-
201	<i>B. clarridgeiae</i> + <i>B. henselae</i>	-	-
206	-	<i>B. clarridgeiae</i>	-
202	<i>B. clarridgeiae</i>	-	-
Shelter 4			
117	<i>B. henselae</i>	<i>B. henselae</i>	-
116	<i>B. henselae</i>	<i>Bartonella</i> sp.	-
Shelter 5			
132	-	<i>B. clarridgeiae</i>	-
131	<i>B. clarridgeiae</i>	-	-
129	<i>B. henselae</i>	-	-
Shelter 6			
193	<i>B. henselae</i>	-	-
191	*	<i>B. henselae</i>	-
195	<i>B. henselae</i>	-	-
200	<i>B. henselae</i>	-	-
198	-	*	-

*Sample positive, but showing weak bands whose DNA concentration was too low to be sequenced.

Table 3: Statistical analysis of the *Bartonella* infection status of host cats and fleas in Rio de Janeiro State, Brazil

		Cat blood		p-value	Odds ratio	IC (95%)
		Positive	Negative			
Fleas	Positive	9 (60.0) ^a	6 (40.0)	0.3685	2.25	0.61 – 8.31
	Negative	10 (40.0) ^a	15 (60.0)			

^aSame letters in the same column did not differ by Chi-square test at 5% significance.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Maria Lopes Corrêa, Caio Junior Balduino Coutinho Rodrigues, and Raisa Braul Rodrigues for helping in the blood sample collection, and Adriana Ribeiro da Silva for assisting with molecular analysis.

REFERENCES

1. André MR, Dumler JS, Herrera HM, Gonçalves LR, de Souza KCM, Scorpio DG, Santis ACGA, Domingos IH, Macedo GC, Machado ZM. Assessment of a quantitative 5' nuclease real-time polymerase chain reaction using the nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase gamma subunit (nuoG) for *Bartonella* species in domiciled and stray cats in Brazil. *J Feline Med Surg.* 2015;18(10):783-90.
2. Assarasakorn S, Veir JK, Hawley JR, Brewer MM, Morris AK, Hill AE, Lappin MR. Prevalence of *Bartonella* species, hemoplasmas, and *Rickettsia felis* DNA in blood and fleas of cats in Bangkok, Thailand. *Res Vet Sci.* 2012; 93:1213-1216.
3. Bai Y, Rizzo MF, Alvarez D, Moran D, Peruski LF, Kosoy M. Coexistence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in population of cats and their fleas in Guatemala. *J Vector Ecol.* 2015; 40(2):327-32.
4. Baldani CD, Santos HA, Massard CL. The Family Bartonellaceae. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*, 4th ed. London: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2014. 81-114.
5. Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH. Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases, Butantan; 2006. 223pp.
6. Bergmans AMC, Jong CMA, Amerongen GV, Schot ACS, Schouls LM. Prevalence of *Bartonella* species in domestic cats in the Netherlands. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(9): 2256-61.
7. Bidaisee S, Macpherson C. Zoonoses and One Health: A Review of the Literature. *J Parasitol Res.* 2014.
8. Bitam I, Dittmar K, Parola P, Whiting MF, Raoult D. Fleas and flea-borne diseases. *Int J Infect Dis.* 2010; 14:e667–e676.
9. Bouhsira E, Ferrandez Y, Liu M, Franc M, Boulouis HJ, Biville F. *Ctenocephalides felis* an in vitro potential vector for five *Bartonella* species. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2013; 36:105-11.

10. Boulouis HJ, Chang CC, Henn JB, Kasten RW, Chomel BB. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet Res.* 2005; 36:383–410.
11. Braga IA, Dias ISO, Chitarra CS, Amude AM, Aguiar DM. Molecular detection of *Bartonella clarridgeiae* in domestic cats from Midwest Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2015; 19 (4):451-52.
12. Brinkerhoff RJ, Kabeya H, Inoue K, Bai Y, Maruyama S. Detection of multiple *Bartonella* species in digestive and reproductive tissues of fleas collected from sympatric mammals. *ISME J.* 2010; 4:955–58.
13. Chomel BB, Abbott RC, Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, Kass PH, Glaser CA, Pedersen NC, Koehler JE. *Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(9):2445–2450.
14. Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins K, Chi B, Yamamoto K, Roberts-Wilson J, Gurfield AN, Abbott RC, Pedersen NC, Koehler JE. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J Clin Microbiol.* 1996; 34(8):1952–6.
15. Chomel BB, Kasten RW. Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. *J Appl Microbiol.* 2010; 109:743–50.
16. Cotté V, Bonnet S, Le Rhun D, Le Naour E, Chauvin A, Boulouis H-J, Lecuelle B, Lilin T, Vayssier-Taussat M. Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14(7): 1074–1080.
17. Gabriel MW, Henn J, Foley JE, Brown RN, Kasten RW, Brown RN, Kasten RW, Foley P, Chomel BB. Zoonotic *Bartonella* in fleas collected on gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009; 9(6): 597–602.
18. Gil H, Escudero R, Pons I, Rodríguez-Vargas M, García-Esteban C, Rodríguez-Moreno I, García-Amil C, Lobo B, Valcárcel F, Pérez A, Jiménez S, Jado I, Juste R, Segura F, Anda P. Distribution of *Bartonella henselae* Variants in Patients, Reservoir Hosts and Vectors in Spain. *PLoS One.* 2013; 8(7): e68248.
19. Guptill L. *Bartonella* infections in cats: what is the significance?. In *Pract.* 2012; 34:434 – 45.
20. Gutiérrez R, Nachum-Biala Y, Harrus S. Relationship between the presence of *Bartonella* species and bacterial loads in cats and cat fleas (*Ctenocephalides felis*) under natural conditions. *Appl Environ Microbiol.* 2015; 81:5613–5621.
21. Gurfield AN, Boulouis HJ, Chomel BB, Kasten RW, Heller R, Bouillin C, et al. Epidemiology of *Bartonella* infection in domestic cats in France. *Vet Microbiol.* 2001; 80:185-98
22. Horta MC, Labruna MB, Pinter A, Linardi PM. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102:793-801.
23. Kordick DL, Brown TT, Shin K, Breitschwerdt EB. Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(5):1536–1547.
24. La Scola B, Davoust B, Boni M, Raoult D. Lack of correlation between *Bartonella* DNA detection within fleas, serological results, and results of blood culture in a *Bartonella*-infected stray cat population. *Clin Microbiol Infect.* 2002; 8(6):345-51.
25. Linardi PM, Santos JLC. *Ctenocephalides felis felis* vs. *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae): some issues in correctly identify these species. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2012; 21(4):345-54.
26. Maggie RG, Breitschwerdt EB. Potential limitations of the 16S-23S rRNA intergenic region for molecular detection of *Bartonella* species. *J Clin Microbiol* 2005; 43:1171-76.

27. Miceli NG, Gavioli FA, Gonçalves LR, André MR, Sousa VRF, Sousa KCM, Machado RZ. Molecular detection of feline arthropod-borne pathogens in cats in Cuiabá, state of Mato Grosso, central-western region of Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2013; 22(3):385-90.
28. Namekata DY, Kasten RW, Boman DA, Straub MH, Siperstein-Cook L, Couvalaire K, Chomel BB. Oral shedding of *Bartonella* in cats: Correlation with bacteremia and seropositivity. *Vet Microbiol.* 2010; 146:371–375.
29. Norman AF, Regnery R, Jameson P, Greene C, Krause DC. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(7):1797-1803.
30. Regier Y, O'Rourke F, Kempf VAJ. *Bartonella* spp. - a chance to establish One Health concepts in veterinary and human medicine. *Parasit Vectors.* 2016; 9:261
31. Rizzo MF, Billeter SA, Osikowicz L, Luna-Caipo, DV, Cáceres AG. Fleas and flea-associated *Bartonella* species in dogs and cats from Peru. *J Med Entomol Soc Am.* 2015; 52(6):1374-1377.
32. Rolain JM, Franc M, Davoust B, Raoult D. Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9(3):338–342.
33. Rojas N, Troyo A, Castillo D, Gutierrez R, Harrus S. Molecular Detection of *Bartonella* Species in Fleas Collected from Dogs and Cats from Costa Rica. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2015; 15(10):630-632.
34. Souza AM, Almeida DNP, Guterres A, Gomes R, Favacho ARM, Moreira NS, Mai LMP, Rozental T, Filho RAT, Cerqueira AMF, Lemos ERS, Almosny NRP. Bartonelose: Análise molecular e sorológica em gatos do Rio de Janeiro – Brasil. *Rev Bras Ciências Vet.* 2010; 17(1):7-11.
35. Staggemeier R, Venker CA, Klein DH, Petry M, Spilki FR, Cantarelli VV. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats in the south of Brazil: a molecular study. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010; 105(7): 873-78.
36. Tsai Y, Lin CC, Chomel BB, Chuang ST, Tsai KH, Wu WJ, Huang CG, Yu JC, Sung MH, Kass PH, Chang CC. *Bartonella infection* in shelter cats and dogs and their ectoparasites. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011; 11(8), 1023–30.
37. Varanat M, Travis A, Lee W, Maggi RG, Bissett, SA, Linder KE, Breitschwerdt EB. Recurrent osteomyelitis in a cat due to infection with *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* genotype II. *J Vet Intern Med.* 2009; 23:1273–1277.

5 CONCLUSÕES GERAIS

É frequente a infecção por *Bartonella* spp. na população de gatos domésticos de abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, principalmente por *Bartonella henselae*;

Gatos não castrados, com acesso à rua, histórico de briga, sem uso de ectoparasiticidas e infestados por pulgas estão mais propensos à infecção;

As pulgas *Ctenocephalides felis*, principal ectoparasito encontrado nos gatos do estudo, aparentam ser vetores importantes na transmissão de *Bartonella* spp. entre os gatos domésticos. Logo, medidas de controle devem ser implementadas para prevenir a infecção em gatos, hospedeiros vertebrados e pessoas.

A ocorrência *Bartonella* spp. em pulgas e gatos de abrigos na Região Metropolitana do Rio de Janeiro enfatiza a necessidade de alertar a comunidade veterinária local, proprietários e autoridades de saúde pública para o risco desta zoonose.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBOTT, R.C.; CHOMEL, B.B.; KASTEN, R.W.; FLOYD-HAWKINS, K.A.; KIKUCHI, Y.; KOEHLER, J.E.; PEDERSEN, N.C. Experimental and natural infection with *Bartonella henselae* in domestic cats. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.20, p.41-51, 1997.
2. ABINPET. Divulgação de dados. Disponível em:< abinpet.org.br>. Acesso em 22 de Janeiro de 2016.
3. ABOUDHARAM, G.; LA, V.D.; DAVOUST, B.; DRANCOURT, M.; RAOULT D. Molecular detection of *Bartonella* spp. in the dental pulp of stray cats buried for a year. *Microbial Pathogenesis*, v.38, p.47-51, 2005.
4. ALMEIDA, C.L.R.; BABO-TERRA, V. Bartonellosis in cats and its role in public health. *Acta Veterinária Brasílica*, v.7, p.5-13, 2013.
5. ANDRE, M.R, DENARDI, N.C.B.N.; SOUZA, K.C.M.; GONÇALVES, L.R.; HENRIQUE, P.C.; ONTIVERO, C.R.G.R.; GONZALEZ, I.H.L.; NERY, C.V.C.; CHAGAS, C.R.F.; MONTICELLI, C.; SANTIS, A.C.G.C.; MACHADO, R.Z. Arthropod-borne pathogens circulating in free-roaming domestic cats in a zoo environment in Brazil. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, v.5, p.545–551, 2014.
6. ANDRÉ, M.R.; HERRERA, H.M.; FERNANDES, S.J.; DE SOUZA, K.C.; GONÇALVES, L.R.; DOMINGOS, I.H.; DE MACEDO, G.C.; MACHADO, R.Z. Tick-borne agents in domesticated and stray cats from the city of Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, midwestern Brazil. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, v.6, p.779-786, 2015.
7. ANGELAKIS, E.; BILLETER, S.A.; BREITSCHWERDT, E.B; CHOMEL, B.B.; RAOULT, D. Potential for Tick-Borne Bartonelloses. *Emerging Infectious Diseases*, v.16, p.385-391, 2010.
8. ASSARASAKORN, S.; VEIR, J.K.; HAWLEY, J.R.; BREWER, M.M.; MORRIS, A.K.; HILL, A.E.; LAPPIN, M.R. Prevalence of *Bartonella* species, hemoplasmas, and *Rickettsia felis* DNA in blood and fleas of cats in Bangkok, Thailand. *Research in Veterinary Science*, v.93, p.1213-1216, 2012.
9. AVIDOR, B.; GRAIDY, M.; EFRAT, G.; LEIBOWITZ, C.; SHAPIRA, G.; SCHATTNER, A.; ZIMHONY, O.; GILADI, M. *Bartonella koehlerae*, a new cat-associated agent of culture-negative human endocarditis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, p.3462–3468, 2004.
10. AZZAG, N.; HADDAD, N.; DURAND, B.; PETIT, E.; AMMOUCHE, A.; CHOMEL, B.B.; BOULOUIS, H.J. Population structure of *Bartonella henselae* in Algerian Urban Stray Cats. *PLoS ONE*, v.7, p.e43621, 2012.
11. 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: International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases, Butantan; 2006. 223pp.
12. BARRS, V.R.; BEATTY, J.A.; WILSON, B.J.; EVANS, N.; GOWAN, R.; BARAL, R.M.; LINGARD, A.E.; PERKOVIC, G.; HAWLEY, J.R.; LAPPIN, M.R. Prevalence of *Bartonella* species, *Rickettsia felis*, haemoplasmas and the *Ehrlichia* group in the blood of cats and fleas in eastern Australia. *Australian Veterinary Journal*, v.88, p.160-65, 2010

13. BENNETT, A.D.; GUNN-MOORE, D.A.; LAPPIN, M.R. Prevalence of *Bartonella* species, haemoplasmas and *Toxoplasma gondii* in cats in Scotland. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.13, p.553 -557, 2011.
14. BERMOND, D.; BOULOUIS, H.J.; HELLER, R.; VAN LAERE, G.; MONTEIL, H.; CHOMEL, B.B.; SANDER, A.; DEHIO, C.; PIÉMONT, Y. *Bartonella bovis* Bermond et al. sp. nov. and *Bartonella capreoli* sp. nov., isolated from European ruminants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.52, p.383–390, 2002.
15. BERMOND, D.; HELLER, R.; BARRAT, F.; DELACOUR, G.; DEHIO, C.; ALLIOT, A.; MONTEIL, H.; CHOMEL, B.B.; BOULOUIS, H.J.; PIÉMONT, Y. *Bartonella birtlesii* sp. nov., isolated from small mammals (*Apodemus* spp.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.50, p.1973–1979, 2000.
16. BIDAISEE, S.; MACPHERSON, C. Zoonoses and One Health: A Review of the Literature. *Journal of Parasitology Research*, v.2014, p.1-8, 2014.
17. 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.45, p.1–8, 1995.
18. BORTOLI, C.P.; ANDRÉ, M.R.; SEKI, M.C.; PINTO, A.A.; MACHADO, S.T. Z.; MACHADO, Z.M. Detection of hemoplasma and *Bartonella* species and co-infection with retroviruses in cats subjected to a spaying/neutering program in Jaboticabal, SP, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.21, p.219-223, 2012.
19. BOUHSIRA, E.; FERRANDEZ, Y.; LIU, M.; FRANC, M.; BOULOUIS, H.J.; BIVILLE, F. *Ctenocephalides felis* an in vitro potential vector for five *Bartonella* species. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.36, p.105-111, 2013.
20. BOULOUIS, H.J.; CHANG, C.C.; HENN, J.B.; KASTEN, R.W.; CHOMEL, B.B. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Veterinary Research*, v.36, p.383–410, 2005.
21. BRAGA, M.S.C.O.; DINIZ, P.P.V.P.; ANDRÉ, M.R.; BORTOLI, C.P.; MACHADO, R.Z. Molecular characterisation of *Bartonella* species in cats from São Luís, state of Maranhão, north-eastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.107, p.772-777, 2012.
22. BRAGA, I.A.; DIAS, I.S.O.; CHITARRA, C.S.; AMUDE, A.M.; AGUIAR, D.M. Molecular detection of *Bartonella clarridgeiae* in domestic cats from Midwest Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Disease*, v.19, p.451-52, 2015.
23. BRANLEY, J.; WOLFSON, C.; WATERS, P.; GOTTLIEB, T.; BRADBURY, R. Prevalence of *Bartonella henselae* bacteremia, the causative agent of cat scratch disease, in an Australian cat population. *Pathology*, v.28, p.262–265, 1996.
24. BREITSCHWERDT, E.B.; KORDICK, D.L. *Bartonella* Infection in Animals: Carriership, Reservoir Potential, Pathogenicity, and Zoonotic Potential for Human Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, v.13, p.428-38, 2000.
25. BREITSCHWERDT, E.B.; LEVINE, J.F.; RADULOVIC, S.; HANBY, S.B.; KORDICK, D.L.; LA PERLE, K.M.D. *Bartonella henselae* and *Rickettsia* Seroreactivity in a Sick Cat Population from North Carolina. The

- International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine, v.3, p.287-302, 2005
26. BREITSCHWERDT, E.B.; MAGGI, R.G.; SIGMON, B.; NICHOLSON, W.L. Isolation of *Bartonella quintana* from a woman and a cat following putative bite transmission. *Journal of Clinical Microbiology*, v.45, p.270-272, 2007.
 27. BREITSCHWERDT, E.B. Feline bartonellosis and cat scratch disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.123, p.167–171, 2008.
 28. BREITSCHWERDT, E.B.; BROADHURST, J.J.; CHERRY, N.A. *Bartonella henselae* as a cause of acute-onset febrile illness in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, p.1-9, 2015.
 29. BRENNER, D.J.; O'CONNOR, S.P.; WINKLER, H.H.; STEIGERWALT, A.G. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family Bartonellaceae from the order Rickettsiales. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.43, p.777–786, 1993.
 30. BRUNT, J.; GUPTILL, L.; KORDICK, D.L. KUDRAK, S.; LAPPIN, M.R. American Association of Feline Practitioners 2006: Panel report on diagnosis, treatment, and prevention of *Bartonella* spp. Infections. *Journal of feline medicine and surgery*, v.8, p.213-226, 2006
 31. CHALONER, G.L.; HARRISON, T.G.; COYNE, K.P.; AANENSEN, D.M.; BIRTLES, R.J. Multilocus Sequence Typing of *Bartonella henselae* in the United Kingdom Indicates that Only a Few, uncommon sequence types are associated with zoonotic disease. *Journal of Clinical Microbiology*, v.49, p.2132-37, 2011.
 32. CHOMEL, B.B.; ABBOTT, R.C.; KASTEN, R.W.; HAWKINS-FLOYD, K.A.; KASS, P.H.; GLASER, C.A.; PEDERSEN, N.C.; KOEHLER, J.E. *Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. *Journal of Clinical Microbiology*, v.33, p.2445-2450, 1995
 33. CHOMEL, B.B.; KASTEN, R.W.; FLOYD-HAWKINS, K.A.; CHI, B., YAMAMOTO, K.; ROBERTS-WILSON, J.; GURFIELD, A.N.; ABBOTT, R.C.; PEDERSEN, N.C.; KOEHLER, J.E. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *Journal of Clinical Microbiology*, v.34, p.1952–1956, 1996.
 34. CHOMEL, B.B.; WEY, A.C.; KASTEN, R.W.; STACY, B.A.; LABELLE, P. Fatal Case of Endocarditis Associated with *Bartonella henselae* Type I Infection in a Domestic Cat. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, p.5337-5339, 2003.
 35. CHOMEL, B.B.; BOULOUIS, H.J.; BREITSCHWERDT, E. B. Cat scratch disease and other zoonotic *Bartonella* infections. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 224, p.1270–1279, 2004.
 36. CHOMEL, B.B.; KASTEN, R.W.; HENN, J.B.; MOLIA, S. *Bartonella* infection in domestic cats and wild felids. *Annals New York Academy of Sciences*, v.1078, p.410-415, 2006a.
 37. CHOMEL, B.B.; BOULOUIS, H.J.; MARUYAMA, S.; BREITSCHWERDT E.B. *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. *Emerging Infectious Diseases*, v.12, p.389–394, 2006b.
 38. CHOMEL, B.B.; BOULOUIS, H.J.; BREITSCHWERDT, E.B.; KASTEN, R.W.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; BIRTLES, R.J.; KOEHLER, J.E.; DEHIO C. Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. *Veterinary Research*, v.40, p.29, 2009.

39. CHOMEL, B.B.; KASTEN, R.W. Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. *Journal of Applied Microbiology*, v. 109, p.743–750, 2010.
40. CHOMEL, B.B.; KASTEN, R.W.; STUCKEY, M.J.; BREITSCHWERDT, E.B.; MAGGI, R.G.; HENN, J.B.; KOEHLER, J.E.; CHANG, C.C. Experimental infection of cats with *Afipia felis* and various *Bartonella* species or subspecies. *Veterinary Microbiology*, v.172, p.505–510, 2014.
41. CICUTTIN, G.L.; BRAMBATI, D.F.; GENNARO, M.F.; CARMONA, F.; ISTURIZ, M.L.; PUJOL, L.E.; BELERENIAN, G.C. *Bartonella* spp. in cats from Buenos Aires, Argentina. *Veterinary Microbiology*, v.168, p.225-28, 2014.
42. CLARRIDGE, J.E.3rd.; RAICH, T.J.; PIRWANI, D.; SIMON, B.; TSAI, L.; RODRIGUEZ-BARRADAS, M.C.; REGNERY, R.; ZOLLO, A.; JONES, D.C.; RAMBO, C. Strategy to detect and identify *Bartonella* species in routine clinical laboratory yields *Bartonella henselae* from human immunodeficiency virus-positive patient and unique *Bartonella* strain from his cat. *Journal of Clinical Microbiology*, v.33, p.2107–2113, 1995.
43. CORREA, F.G.; PONTES, C.L.S.; VERZOLA, R.M.M.; MATEOS, J.C.P.; et al. Association of *Bartonella* spp. bacteremia with Chagas cardiomyopathy, endocarditis and arrhythmias in patients from South America. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.4, p. 644-651, 2012.
44. COTTÉ, V.; BONNET, S.; LE RHUN, D.; LE NAOUR, E.; CHAUVIN, A.; BOULOUIS, HJ.; LECUELLE, B.; LILIN, T.; VAYSSIER-TAUSSAT, M. Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerging Infectious Diseases*, v.14, p.1074–1080, 2008.
45. CRISSIUMA, A.; FAVACHO, A.; MENDES-DE-ALMEIDA, F.; MARES-GUIA, A.; ROZENTAL, T.; BARREIRA, J.; LEMOS, E.R.S.; LABARTHE, N. Prevalence of *Bartonella* species DNA and antibodies in cats (*Felis catus*) submitted to a spay/neuter program in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.12, p.149-151, 2011.
46. CURI, A.L.; MACHADO, D.O; HERINGER, G.; CAMPOS, W.R.; OREFICE, F. Ocular manifestation of cat-scratch disease in HIV-positive patients. *American Journal of Ophthalmology*, v.141, p.400-401, 2006.
47. DEHIO, C.; LANZ, C.; POHL, R.; BEHRENS, P.; BERMOND, D.; PIÉMONT, Y.; PELZ, K.; SANDER, A. *Bartonella schoenbuchii* sp. nov., isolated from the blood of wild roe deer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.51, p.1557–1565, 2001.
48. DOS SANTOS, A.P.; DOS SANTOS, R.P.; BIONDO, A.W.; DORA, J.M.; et al. Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v.14, p.1922-1924, 2008.
49. DROZ, S.; CHI, B.; HORN, E.; STEIGERWALT, A.G.; WHITNEY, A.M.; BRENNER, D.J. *Bartonella koehlerae* sp. nov., isolated from cats. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, p.1117–1122, 1999.
50. DROZ, S.; CHI, B.; HORN, E.; STREIGERWALT, A. G.; WHITNEY, A. M.; BRENNER, D. J. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List N 73. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.50, p.423–424, 2000.
51. EREMEEVA, M.E.; GERNS, H.L.; LYDY, S.L.; GOO, J.S.; RYAN, E.T.; MATHEW, S.S.; FERRARO, M.J.; HOLDEN, J.M.; NICHOLSON, W.L.; DASCH, G.A.; KOEHLER, J.E. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List N 144

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.62, p.473–475, 2012.
52. FABBI, M.; GIULI, L.; TRANQUILLO, M.; BRAGONI, R.; CASIRAGHI, M.; GENCHI, C. Prevalence of *Bartonella henselae* in Italian Stray Cats: Evaluation of Serology to Assess the Risk of Transmission of *Bartonella* to Humans. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, p.264-68, 2004.
 53. FILONI, C.; CATÃO-DIAS, J.L.; BAY, G.; DURIGON, E.L.; JORGE, R.S.P.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. First Evidence of Feline Herpesvirus, Calicivirus, Parvovirus, and *Ehrlichia* Exposure in Brazilian Free-ranging Felids. *Journal of Wildlife Diseases*, v.42, p.470-477, 2006
 54. FILONI, C.; CATÃO-DIAS, J.L.; CATTORI, V.; WILLI, B.; MELI, M.L.; CORRÊA, S.H.; MARQUES, M.C.; ADANIA, C.H.; SILVA, J.C.; MARVULO, M.F.; FERREIRA NETO, J.S.; DURIGON, E.L.; DE CARVALHO, V.M.; COUTINHO, S. D.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Surveillance using serological and molecular methods for the detection of infectious agents in captive Brazilian neotropical and exotic felids. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.24, p.166–173, 2012.
 55. FLEISCHMAN, D.A.; CHOMEL, B.B.; KASTEN, R.W.; STUCKEY, M.J.; SCARLET, J.; LIU, H.; BOULOUIS, H.J.; HADDAD, N.; PEDERSEN, N.C. *Bartonella* Infection among Cats Adopted from a San Francisco Shelter, Revisited. *Applied Environmental Microbiology*, v.81, p.6446-6450, 2015.
 56. FOIL, L.; ANDRESS, E.; FREELAND, R.L.; ROY, A.F.; RUTLEDGE, R.; TRICHE, P.C.; O'REILLY, K.L. Experimental Infection of Domestic Cats with *Bartonella henselae* by Inoculation of *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae) Feces. *Journal of entomology*, v.35, 625-28, 1998.
 57. FONTALVO, M.C.; FAVACHO, A.R.M.; ARAÚJO, A.C.; SANTOS, N.M.; OLIVEIRA, G.M.B.; AGUIAR, D.M.; LEMOS, E.R.S.; HORTA, M.C. *Bartonella* species pathogenic for humans infect pets, free-ranging wild mammals and their ectoparasites in the Caatinga biome, Northeastern Brazil: a serological and molecular study. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.21, p.290-96, 2017
 58. GERMAN, A.J.; CANNON, M.J.; DYE, C.; BOOTH, M.J.; PEARSON, G.R.; REAY, C.A.; GRUFFYDD-JONES, T.J. Oesophageal strictures in a cats associated with doxycycline therapy. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.7, p.33-41, 2005.
 59. GIL, H.; ESCUDERO, R.; PONS, I.; RODRÍGUEZ-VARGAS, M.; GARCÍA-ESTEBAN, C.; RODRÍGUEZ-MORENO, I.; GARCÍA-AMIL, C.; LOBO, B.; VALCÁRCEL, F.; PÉREZ, A.; JIMÉNEZ, S.; JADO, I.; JUSTE, R.; SEGURA, F.; ANDA, P. Distribution of *Bartonella henselae* Variants in Patients, Reservoir Hosts and Vectors in Spain. *PLoS One*, v.8, p.e68248., 2013
 60. GUIMARÃES, A.M.S.; BRANDÃO, P.E.; MORAES, W.; KIIHL, S.; SANTOS, L.C.; FILONI, C.; CUBAS, Z.S.; ROBES, R.R.; MARQUES, L.M.; NETO, R.L.; YAMAGUTI, M.; OLIVEIRA, R.C.; CATÃO-DIAS, J.L.; RICHTZENHAIN, L.J.; MESSICK, J.B.; BIONDO, A.W.; TIMENETSKY, J. Detection of *Bartonella* spp. in neotropical felids and evaluation of risk factors and hematological abnormalities associated with infection. *Veterinary Microbiology*, v.142, p.346-351, 2010.
 61. GUNDI, V.A.K.B.; TAYLOR, C.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. *Bartonella rattaaustraliani* sp. nov., *Bartonella queenslandensis* sp. nov. and *Bartonella coopersplainsensis* sp. nov., identified in Australian rats. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.59, p.2956–2961, 2009

62. GUPTILL, L.; SLATER, L.; WU, C.C.; LIN, T.L.; GLICKMAN, L.T.; WELCH, D.F.; HOGENESCH, H. Experimental infection of young specific pathogen-free cats with *Bartonella henselae*. *The Journal of Infectious Diseases*, v.176, p.206-216, 1997.
63. GUPTILL, L.; WU, C.C.; HOGENESCH, H.; SLATER, L.N.; GLICKMAN, N.; DUNHAM, A.; SYME, H.; GLICKMAN, L. Prevalence, Risk Factors, and Genetic Diversity of *Bartonella henselae* Infections in Pet Cats in Four Regions of the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, p.652-659, 2004
64. GUPTILL, L. Bartonellosis. *Veterinary Microbiology*, v.40, p.347-59, 2010
65. GUPTILL, L. *Bartonella* infections in cats: what is the significance?. *In Practice*, v.34, p.2012; 34: 434-445
66. GUPTILL, L. Bartonelose. In: Greene, C. E. Doenças infecciosas em cães e gatos. 4 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.571-592, 2015.
67. GURFIELD, A.N.; BOULOUIS, H.J.; CHOMEL, B.B.; KASTEN, R.W.; HELLER, R.; BOUILLIN, C.; GANDOIN, C.; THIBAUT, D.; CHANG, C.C.; BARRAT, F.; PIÉMONT, Y. Epidemiology of *Bartonella* infection in domestic cats in France. *Veterinary Microbiology*, v.80, p.185-98, 2001.
68. GUTIERREZ, R.; MORICK, D.; GROSS, I.; WINKLER, R.; ABDEEN, Z.; HARRUS, S. Bartonellae in Domestic and Stray Cats from Israel: Comparison of Bacterial Cultures and High-Resolution Melt Real-Time PCR As Diagnostic Methods. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, v.13, 2013.
69. GUTIÉRREZ, R.; NACHUM-BIALA, Y.; HARRUS, S. Relationship between the presence of *Bartonella* species and bacterial loads in cats and cat fleas (*Ctenocephalides felis*) under natural conditions. *Applied Environmental Microbiology*, v.81, p.5613-5621, 2015.
70. HARMS, A.; DEHIO, C. Intruders below the Radar: Molecular Pathogenesis of *Bartonella* spp. *Clinical Microbiology Reviews*, v.25, p. 42-78, 2012.
71. HELLER, R.; RIEGEL, P.; HANSMANN, Y.; DELACOUR, G.; BERMOND, D.; DEHIO, C.; LAMARQUE, F.; MONTEIL, H.; CHOMEL, B.; PIÉMONT, Y. *Bartonella tribocorum* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rats. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.48, p.1333-1339, 1998.
72. HELLER, R.; KUBINA, M.; MARIET, P.; RIEGEL, P.; DELACOUR, G.; DEHIO, C.; LAMARQUE, F.; KASTEN, R.; BOULOUIS, H.J.; MONTEIL, H.; CHOMEL, B.; PIÉMONT, Y. *Bartonella alsatica* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rabbits. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.49, p.283-288, 1999.
73. INOUE, K.; KABEYA, H.; SHIRATORI, H.; UEDA, K.; KOSOY, M.Y.; CHOMEL, B.B.; BOULOUIS, H.J.; MARUYAMA, S. *Bartonella japonica* sp. nov. and *Bartonella silvatica* sp. nov., isolated from *Apodemus* mice. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, v.60, p.759-763, 2010.
74. JACOMO, V.; KELLY, P.J.; RAOULT, D. Natural History of *Bartonella* Infections (an Exception to Koch's Postulate). *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.9, p.8-18, 2002.
75. JOSEPH, A.K.; WOOD, C. W.; ROBSON, J.M.; PAUL, S.L.; MORRIS, A. J. *Bartonella henselae* bacteraemia in domestic cats from Auckland. *The New Zealand Veterinary Journal*, v.45, p.185-187, 1997.
76. KAMANI, J.; BANETH, G.; GUTIERREZ, R.; NACHUM-BIALA, Y, SALANT, H.; MUMCUOGLU, K.Y.; HARRUS, S. Molecular screening of *Ctenocephalides felis* fleas collected from stray cats in the Jerusalem District, Israel, for *Bartonella* spp.,

- Rickettsia* spp. and *Coxiella burnetii*. Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports, v.1-2, p.59-64, 2015
77. KELLY, P.J.; MOURA, L.; MILLER, T.; THURK, J.; PERREAULT, N.; WEIL, A.; MAGGIO, R.; LUCAS, H.; BREITSCHWERDT, E. Feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus and *Bartonella* species in stray cats on St Kitts, West Indies. Journal of Feline Medicine and Surgery, v.12, p.447-50, 2010.
 78. KEŠNEROVÁ, L.; MORITZ, R.; ENGEL, P. *Bartonella apis* sp. nov., a honeybee gut symbiont of the class Alphaproteobacteria. International Journal of Systematic Bacteriology, v.66, p.414-421. 2016.
 79. KIM, Y.S.; SEO, K.W.; LEE, J.H.; CHOI, E.W.; LEE, H.W.; HWANG, C.Y.; SHIN, N.S.; YOUN, H.J.; YOUN, H.Y. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats and dogs in Korea. Journal of Veterinary Science, v.10, p.85-87, 2009.
 80. KITADA, A.A.B.; FAVACHO, A.R.M.; OLIVEIRA, R.V.C.; PESSOA, A.A.; GOMES, R.; HONSE, C.O.; GREMIÃO, LEMOS, E.R.S.; PEREIRA, S.A. Detection of serum antibodies against *Bartonella* species in cats with sporotrichosis from Rio de Janeiro, Brazil. Journal of Feline Medicine and Surgery, p.16, p.308-11, 2014.
 81. KORDICK, D.L.; WILSON, K.H.; SEXTON, D.J.; HADFIELD, T.L.; BERKHOFF, H.A.; BREITSCHWERDT, E.B. Prolonged *Bartonella* bacteremia in cats associated with Cat-Scratch Disease patients. Journal of Clinical Microbiology, v.33, p.3245-3251, 1995.
 82. KORDICK, D.L.; SWAMINATHAN, B.; GREENE, C.E.; WILSON, K.H.; WHITNEY, A.M.; O'CONNOR, S.; HOLLIS, D.G.; MATAR, G.M.; STEIGERWALT, A.G.; MALCOLM, G.B.; HAYES, P.S.; HADFIELD, T.L.; BREITSCHWERDT, E.B.; BRENNER, D.J. *Bartonella vinsonii* subsp. *verkhoffii* subsp. nov., isolated from dogs; *Bartonella vinsonii* subsp. *vinsonii*; and emended description of *Bartonella vinsonii*. International Journal of Systematic Bacteriology, v.46, p.704-709, 1996.
 83. KORDICK, D.L.; HILYARD, E.J.; HADFIELD, T.L.; WILSON, K.H.; STEIGERWALT, A.G.; BRENNER, D.J.; BREITSCHWERDT, E.B. *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease). Journal of Clinical Microbiology, v.35, p.1813-1818, 1997.
 84. KORDICK, D.L.; BREITSCHWERDT, E.B. Persistent infection of pets within a household with three *Bartonella* species. Emerging Infectious Diseases Journal, v.4, p.325-328, 1998.
 85. KORDICK, D.L.; BROWN, T.T.; SHIN, K.; BREITSCHWERDT, E.B. Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats. Journal of Clinical Microbiology, v.37, p.1536-1547, 1999
 86. LA, V.D.; TRAN-HUNG, L.; ABOUDHARAM, G.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. *Bartonella quintana* in domestic cat. Emerging Infectious Diseases, v.11, p.1287-1289, 2005.
 87. LAMAS, C.C.; MARES-GUIA, M.A.; ROZENTAL, T.; MOREIRA, N.; FAVACHO, A.R.M.; BARREIRA, J.; GUTERRES, A.; BÓIA, M.N.; LEMOS, E.R.S. *Bartonella* spp. infection in HIV positive individuals, their pets and ectoparasites in Rio de Janeiro, Brazil: serological and molecular study. Acta Tropica, v.115, p.137-141, 2010.

88. LAPPIN, M.R.; KORDICK, D.L.; BREITSCHWERDT, E.B. *Bartonella* spp. antibodies and DNA in aqueous humour of cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.2, p.61–68, 2000.
89. LAPPIN, M.R.; BREITSCHWERDT, E.B.; BREWER, M.; HAWLEY, J.; HEGARTY, B.; RADECKI, S. Prevalence of *Bartonella* species antibodies and *Bartonella* species DNA in the blood of cats with and without fever. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.11, p.141-48, 2009.
90. LAWSON, P.A.; COLLINS, M.D. Description of *Bartonella clarridgeiae* sp. nov. isolated from the cat of a patient with *Bartonella henselae* septicemia. *Medical Microbiology Letters*, v.5, p.64–73, 1996.
91. LEIBOVITZ, K.; PEARCE, L.; BREWER, M.; LAPPIN, M.R. *Bartonella* species antibodies and DNA in cerebral spinal fluid of cats with central nervous system disease. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.10, p.331-337, 2008.
92. LINARDI, P.M.; SANTOS, J.L.C. *Ctenocephalides felis felis* vs. *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae): some issues in correctly identify these species. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.21, p.345-354, 2012.
93. LOBETTI, R.; LAPPIN, M.R. Prevalence of *Toxoplasma gondii*, *Bartonella* species, and haemoplasma infection in cats in South Africa. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.14, p.857-862, 2012.
94. LOUREIRO, V.S.; HAGIWARA, M. Levantamento de anticorpos anti-*Bartonella henselae* em felinos domiciliados na cidade de São Paulo, estado de São Paulo e sua importância em saúde pública. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v.14, p.39-42
95. MAGGI, R.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Potential limitations of the 16S-23S rRNA intergenic region for molecular detection of *Bartonella* species. *Journal of Clinical Microbiology*, v.43, p.1171-1176, 2005.
96. MAGGI, R.G.; ERICSON, M.; MASCARELLI, P.E.; BRADLEY, J.M.; BREITSCHWERDT, E.B. *Bartonella henselae* bacteremia in a mother and son potentially associated with tick exposure. *Parasites and Vectors*, v.6, p.101, 2013.
97. MAGUIÑA, C.M.D.; GUERRA, H.M.D.; VENTOSILLA, P. Bartonellosis. *Clinics in Dermatology*, v.27, p.271-280, 2009.
98. MAILLARD, R.; RIEGEL, P.; BARRAT, F.; BOUILLIN, C.; THIBAUT, D.; GANDOIN, C.; HALOS, L.; DEMANCHE, C.; ALLIOT, A.; GUILLOT, J.; PIEMONT, Y.; BOULOUIS, H.J.; VAYSSIER-TAUSSAT, M. *Bartonella chomelii* sp. nov., isolated from French domestic cattle (*Bos taurus*). *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, v.54, p.215–220, 2004
99. MALHEIROS, J.; COSTA, M.M, AMARAL, R.B.; SOUSA, K.C. ANDRÉ, MR.; MACHADO, R.Z.; VIEIRA, M.I. Identification of vector-borne pathogens in dogs and cats from Southern Brazil, v.7, p.893-900, 2016
100. MARGILETH, A.M.; BAEHREN, D.F. Chest-wall abscess due to cat-scratch disease (CSD) in an adult with antibodies to *Bartonella clarridgeiae*: case report and review of the thoracopulmonary manifestations of CSD. *Clinical Infectious Diseases*, v.27, p.353–357, 1998.
101. MARUYAMA, S.; SAKAI, T.; MORITA, Y.; TANAKA, S.; KABEYA, H.; BOONMAR, S.; POAPOLATHEP, A.; CHALARMCHAIKIT, T.; CHANG, C.C.; KASTEN, R.W.; CHOMEL, B.B.; KATSUBE, Y. Prevalence of *Bartonella* species and 16s rRNA gene types of *Bartonella henselae* from domestic cats in Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.65, p.783-87, 2001.

102. MCGROTTY, Y.L.; KNOTTENBELT, C.M. Oesophageal strictures in a cat due to oral administration of tetracyclines. *Journal of Small Animal Practice*, v.43, p.221-223, 2002 (Abstract).
103. MEDIANNIKOV, O.; EL KARKOURI, K.; ROBERT, C.; FOURNIER, P.E.; RAOULT, D. Non-contiguous finished genome sequence and description of *Bartonella florenciae* sp. nov. *Standards in Genomic Sciences*, v.9, p.185-196, 2013a.
104. MEDIANNIKOV, O.; EL KARKOURI, K.; DIATTA, G.; ROBERT, C.; FOURNIER, P. E.; RAOULT, D. Non-contiguous finished genome sequence and description of *Bartonella senegalensis* sp. nov. *Standards in Genomic Sciences*, v.8, p.279-289, 2013b.
105. MEHOCK, J.R.; GREENE, C.E.; GHERARDINI, F.C.; HAHN, T.W.; KRAUSE, D.C. *Bartonella henselae* invasion of feline erythrocytes in vitro. *Infection and immunity*, v.66, p.3462–3466, 1998.
106. MESSAM, L.L.McV.; KASTEN, R.W.; RITCHIE, M.J.; CHOMEL, B.B. *Bartonella henselae* and Domestic Cats, Jamaica. *Emerging Infectious Disease*, v.11, p.1146-47, 2005.
107. MICELI, N.G.; GAVIOLI, F.A.; GONÇALVES, L.R.; ANDRÉ, M.R.; SOUSA, V.R.F.; SOUSA, K.C.M.; MACHADO, R.Z. Molecular detection of feline arthropod-borne pathogens in cats in Cuiabá, state of Mato Grosso, central-western region of Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.22, p.385-390, 2013.
108. MOGOLLON-PASAPERA, E.; JR, L.O.; GIORDANO A.; CASSONE, M. *Bartonella*: emerging pathogen or emerging awareness? *International Journal of Infectious Diseases*, v.13, p.3-8, 2009.
109. MULLINS, K.E.; HANG, J.; JIANG, J.; LEGUIA, M.; KASPER, M.R.; VENTOSILLA, P.; MAGUINA, C.; JARMAN, R.G.; BLAZES, D.; RICHARDS, A.L. Description of *Bartonella ancashensis* sp. nov., isolated from the blood of two patients with verruga peruana. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.65, p.3339-3343, 2015.
110. NAKAMURA, R. K.; ZIMMERMAN, S. A.; LESSER, M. B. Suspected *Bartonella*-associated myocarditis and supraventricular tachycardia in a cat. *Journal of Veterinary Cardiology*, v.13, p.277–281, 2011.
111. NAMEKATA, D.Y.; KASTEN, R.W.; BOMAN, D.A.; STRAUB, M.H.; SIPERSTEIN-COOK, L.; COUVALAIRE, K.; CHOMEL, B.B. Oral shedding of *Bartonella* in cats: Correlation with bacteremia and seropositivity. *Veterinary Microbiology*, v.146, p.371–375, 2010.
112. NOAH, D.L.; KRAMER, C.M.; VERBSKY, M.P.; ROONEY, J.A.; SMITH, K.A.; CHILDS, J.E. Survey of veterinary professionals and other veterinary conference attendees for antibodies to *Bartonella henselae* and *B. quintana*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.210, p.342–344, 1997.
113. NORMAN, A.F.; REGNER, R.; JAMESON, P.; GREENE, C.; et al. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *Journal of Clinical Microbiology*, v.33, p.1797-1803, 1995.
114. OSKOUIZADEH, K.; ZAHRAEI-SALEHI, T.; ALEDAVOOD, S.J. Detection of *Bartonella henselae* in domestic cats' saliva. *Iran Journal of Microbiology*, v.2, p.80-84, 2010.
115. PEARCE, L.K.; RADECKI, S. .; BREWER, M.; LAPPIN, M.R. Prevalence of *Bartonella henselae* antibodies in serum of cats with and without clinical signs of

- central nervous system disease. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.8, p.315-320, 2006.
116. PENNISI, M.G.; CAMERA, E.L.; GIACOBBE, A.; ORLANDELLA, B.M.; LENTINI, V.; ZUMMO, S.; FERA, M.T. Molecular detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in clinical samples of pet cats from Southern Italy. *Research in Veterinary Science*, v.88, p.379–384, 2010.
117. PEREZ, C.; HUMMEL, J.B.; KEENE, B.W.; MAGGI, R.G.; DINIZ, P.P.V.P.; BREITSCHWERDT, E.B. Successful treatment of *Bartonella henselae* endocarditis in a cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.12, p.483-486, 2010.
118. PRESSLER, B. Bartonellosis. In: August, R.J. Consultation in feline internal medicine. p. 29-37, 2006.
119. QUIMBY, J.M.; ELSTON, T.; HAWLEY, J.; BREWER, M.; MILLER, A.; LAPPIN, M.R. Evaluation of the association of *Bartonella* species, feline herpesvirus 1, feline calicivirus, feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus with chronic feline gingivostomatitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.10, p.66-72, 2008.
120. REGIER, Y.; O'ROURKE, F.; KEMPF, V.A.J. *Bartonella* spp. - a chance to establish One Health concepts in veterinary and human medicine. *Parasites and Vectors*, v.9, 2016.
121. REGNERY, R.; MARANO, N.; JAMESEON, P.; MARSTON, E.; JONES, D.; ANDLEY, S.; GOLDSMITH, C.; GREENE, C. A fourth *Bartonella* species, *Bartonella weissii*, species nova, isolated from domestic cats. Abstract 4. In: Proceedings of the 15th Meeting of the American Society of Rickettsiology. Captiva Island, 2000.
122. ROLAIN, J.M.; FOUCAULT, C.; GUIEU, R.; LA SCOLA, B.; BROUQUI, P.; RAOULT, D. *Bartonella quintana* in human erythrocytes. *Lancet*, v.360, p.226-228, 2002.
123. ROLAIN, J.M.; FRANC, M.; DAVOUST, B.; RAOULT, D. Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. *Emerging Infectious Diseases*, v.9, p.338–342, 2003.
124. SANDER, A.; ZAGROSEK, A.; BREDT, W.; SCHILTZ, E.; PIÉMONT, Y.; LANZ, C.; DEHIO, C. Characterization of *Bartonella clarridgeiae* flagellin (FlaA) and detection of anti-flagellin antibodies in patients with lymphadenopathy. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, p.2943–2948, 2000.
125. SATO, S.; KABEYA, H.; FUJINAGA, Y.; INOUE, K.; UNE, Y.; YOSHIKAWA, Y.; MARUYAMA, S. *Bartonella jaculi* sp. nov., *Bartonella callosciuri* sp. nov., *Bartonella pachyuromydis* sp. nov. and *Bartonella acomydis* sp. nov., isolated from wild Rodentia. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, v.63, p.1734–1740, 2013.
126. SCOTT, M.A.; MCCURLEY, T.L.; VNENCAK-JONES, C.L.; HAGER, C.; MCCOY, J.A.; ANDERSON, B.; COLLINS, R.D.; EDWARDS, K.M. Cat scratch disease: detection of *Bartonella henselae* DNA in archival biopsies from patients with clinically, serologically, and histologically defined disease. *American Journal of Pathology*, v.149, p.2161–2167, 1996.
127. SILVA, B.T.G.; SOUZA, A.M.; CAMPO, S.D.E.; LEMOS, E.R.S.; FAVACHO, A.R.M.; ALMOSNY, N.R.P. Presence of *Bartonella* spp. in domestic cats from a state park in Rio de Janeiro, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.60, e.14, 2018.

- 128.SLATER, L.N.; WELCH, D.F.; MIN, K.W. *Rochalimaea henselae* causes bacillary angiomatosis and peliosis hepatis. Archives of Internal Medicine, v.152, p.602–606, 1992.
- 129.SLHESSARENKO, N.; CAMARGO, M.C.G.O.; DÀURIA, S.R.N. Soroprevalência de *Bartonella henselae* em gatos do município de São Paulo. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.29; p.104,1996.
- 130.SOUZA, A.M.; ALMEIDA, D.N.P.; GUTERRES, A.; GOMES, R.; FAVACHO, A.R.M.; MOREIRA, N.S.; MAIA, L.M.P.; ROZENTAL, T.; TORRES-FILHO, R.A.; CERQUEIRA, A.M.F.; LEMOS, E.R.S.; ALMOSNY, N.R.P. Bartonelose: Análise molecular e sorológica em gatos do Rio de Janeiro – Brasil. Revista Brasileira de Ciência Veterinária, v.17, p.7-11, 2010.
- 131.SOUZA, A.M.; ALMOSNY, N.R.P.; FAVACHO, A.R.M.; ALMEIDA, D.N.P.; FERREIRA, R.F.; FERREIRA, E.O.; MOREIRA, N.S.; LEMOS, E.R.S. *Bartonella* spp. and hematological changes in privately owned domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. The Journal of Infection in Developing Countries, v.11, p.591-596, 2017.
- 132.STAGGEMEIER, R.; VENKER, C.A.; KLEIN, D.H.; PETRY, M.; SPILKI, F.R.; CANTARELLI, V.V. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats in the south of Brazil: a molecular study. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.105, p. 873-878, 2010.
- 133.STAGGEMEIER, R.; PILGER, D.A.; SPILKI, F.R.; CANTARELLI, V.V. Multiplex SYBR® green-real time PCR (qPCR) assay for the detection and differentiation of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats. Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v.56, n.2, p.93-95, 2014.
- 134.STÜTZER, B.; HARTMANN, K. Chronic bartonellosis in cats: What are the potential implications? Journal of Feline Medicine and Surgery, v.14, p.612-621, 2012.
- 135.SYKES, J.E.; WESTROPP, J.L.; KASTEN, R.W.; CHOMEL, B.B. Association between *Bartonella* species infection and disease in pet cats as determined using serology and culture. Journal of Feline Medicine and Surgery, v.12, p.631-636, 2010
- 136.TABAR, MD.; ALTET, L.; FRANCINO, O.; SÁNCHEZ, A.; FERRER, L.; ROURA, X. Vector-borne infections in cats: Molecular study in Barcelona area (Spain). Veterinary Parasitology, v. 151, p.332-36, 2008.
- 137.TRATARIS, A.N.; ROSSOUW, J.; ARNTZEN, L.; KARSTAEDT, A.; FREAN, J. *Bartonella* spp. in human and animal populations in Gauteng, South Africa, from 2007 to 2009. The Onderstepoort Journal of Veterinary Research, v.79, p.452, 2012.
- 138.TSAI, Y.L.; CHANG, C.C.; CHUANG, S.T.; CHOMEL, B.B. Bartonella species and their ectoparasites: Selective host adaptation or strain selection between the vector and the mammalian host?. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, v.34, p. 299– 314, 2011.
- 139.URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. Parasitologia veterinária. 2 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1998. p. 304.
- 140.VARANAT, M.; TRAVIS, A.; LEE, W.; MAGGI, R.G.; BISSETT, S.A.; LINDER, K.E.; BREITSCHWERDT, E.B. Recurrent osteomyelitis in a cat due to infection with *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* genotype II. Journal of Veterinary Internal Medicine, v.23, p.1273–1277, 2009.
- 141.VARANAT, M.; BROADHURST, J.; LINDER, K.E.; MAGGI, R.G.; BREITSCHWERDT, E.B.; Identification of *Bartonella henselae* in 2 Cats With Pyogranulomatous Myocarditis and Diaphragmatic Myositis. Veterinary Pathology, v.49, p.608-611, 2012.

142. VAYSSIER-TAUSSAT, M.; MOUTAILLER, S.; FÉMÉNIA, F.; RAYMOND, F.; CROCE, O.; LA SCOLA, B.; FOURNIER, P.E.; RAOULT, D. Identification of Novel Zoonotic Activity of *Bartonella* spp., France. *Emerging Infectious Diseases*, v.22, p.457-62, 2016.
143. VEIR, J.K.; LAPPIN, M.R. Molecular Diagnostic Assays for Infectious Diseases in Cats. *Veterinary Clinical of Small Animals*, v.40, p.1189-1200, 2010.
144. VIEIRA-DAMIANI, G.; DINIZ, P.P.; PITASSI, L.H.; SOWY, S.; SCORPIO, D.G.; LANIA, B.G.; DRUMMOND, M.R.; SOARES, T.C.; BARJAS-CASTRO, M.L.; BREITSCHWERDT, E.B.; NICHOLSON, W.L.; VELHO, P.E. *Bartonella clarridgeiae* bacteremia detected in an asymptomatic blood donor. *Journal of Clinical Microbiology*, v.53, p.352-6, 2015
145. WARDROP, K.J.; REINE, N.; BIRKENHEUER, A.; HALE, A.; HOHENHAUS, A.; CRAWFORD, C.; LAPPIN, M. R. Canine and feline blood donor screening for infectious disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.19, p.135-142, 2005.
146. WELCH, D.E.; CAROLL, K.C.; HOFMEISTER, E.K.; PERSING, D.H.; ROBSON, D.A.; STREIGERWALT, G.; BRENNER, D.J. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List N 72. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, v.50, p.3-4, 2000.
147. WHITTEMORE, J.C.; HAWLEY, J.R.; RADECKI, S.V.; STEINBERG, J.D.; LAPPIN, M.R. *Bartonella* species antibodies and hyperglobulinemia in privately owned cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.26, p.639-644, 2012.
148. YAMAMOTO, K.; CHOMEL, B.B.; KASTEN, R.W.; HEW, C.M.; WEBER, D.K.; LEE, W.I.; KOEHLER, J.E.; PEDERSEN, N.C. Infection and re-infection of domestic cats with various *Bartonella* species or types: *B. henselae* type I is protective against heterologous challenge with *B. henselae* type II. *Veterinary Microbiology*, v.92, p.73-86, 2003.
149. YUAN, C.; ZHU, C.; WU, Y.; PAN, X.; HUA, X. Bacteriological and molecular identification of *Bartonella* species in cats from different regions of China. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.5, e1301, 2011.
150. ZANUTTO, M.S.; MAMIZUKA, E.M.; RAIZ-JÚNIOR, R.; LIMA, T.M.; DIOGO, C.L.; OKAY, T.S. & HAGIWARA, M.K. - Experimental infection and horizontal transmission of *Bartonella henselae* in domestic cats. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.43, p.257-261, 2001.

7 ANEXOS

7.1. Anexo I - Termo de consentimento livre e esclarecido:



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Instituto de Veterinária

Proprietário: _____ Data: ____/____/____

Convite à participação da pesquisa intitulada “**Avaliação clínico-hematológica-bioquímica da bartonelose e associação com FIV/FeLV em felinos domésticos domiciliados e de abrigo do Rio de Janeiro**” que tem como principal objetivo investigar a presença de *Bartonella* spp. em felinos domésticos domiciliados e de abrigo do estado do Rio de Janeiro através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e reação em cadeia da polimerase (PCR), buscando correlacionar as alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas com a infecção, bem como sua associação com as retrovíroses FIV/FeLV. O conhecimento deste agente infeccioso em gatos, bem como dos fatores que interagem para seu surgimento são necessários para a formulação de estratégias de profilaxia e controle.

A pesquisa não oferece riscos físicos para você ou seus animais, no entanto, seu animal será devidamente contido para coleta da amostra de sangue, procedimento que pode trazer algum desconforto ao animal e indiretamente ao proprietário.

Sua participação baseia-se no **consentimento da coleta de amostra de sangue do seu animal por um profissional da equipe de pesquisa e na resposta a um questionário padronizado** que será aplicado em todas as propriedades pesquisadas. As informações obtidas serão utilizadas somente para fins da pesquisa acima mencionada, sua identificação e dados confidenciais serão mantidos em sigilo.

Pela participação no projeto o (a) senhor (a) não receberá qualquer remuneração, assim como não será cobrada qualquer taxa. Está assegurada sua liberdade de recusa em participar da pesquisa ou de retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma. Qualquer dúvida em relação à pesquisa o Sr.(a) poderá procurar a pesquisadora responsável no endereço abaixo:

Cristiane Divan Baldani, DSc. Prof. Adjunto I

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária - Departamento de Medicina e Cirurgia

Veterinária (BR 465, Km 7, Seropédica, RJ - CEP: 23890-000)

Telefone: 21 2682-1711 / Ramal 232/ e-mail: crisbaldani@ufrj.br

Concordo voluntariamente em participar do estudo, dispondo da informação de que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício adquirido.

 (Assinatura do participante) Data: ____/____/____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste proprietário.

 (Assinatura do responsável pelo estudo) Data: ____/____/____

7.2. Anexo II - Aprovação CEUA/IV:

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA

BR 465, Km 7 – Centro – Seropédica – Rio de Janeiro – CEP: 23.890-000
Telefone: (21) 2682-3051 – E-mail: ceua.iv.ufrj@gmail.com

Seropédica 28 de maio de 2014

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que foi aprovado o protocolo de número 027/2014 intitulado **“Avaliação clínico-hematológica-bioquímica da bartonelose e associação com FIV/FelV em felinos domésticos domiciliados e de abrigo do Rio de Janeiro”** encaminhado pelo Professor(a) do Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária – Clínica Médica de Animais de Companhia, Cristiane Divan Baldani. Informamos que foi aprovado em reunião ordinária da CEUA-IV realizada no dia 28 de maio de 2014, após avaliação do plenário da referida Comissão.

Handwritten signature of Fabio Barbour Scott in blue ink.

Fabio Barbour Scott

v Coordenador CEUA-IV

Handwritten signature of Jonimar Pereira Paiva in blue ink.

Jonimar Pereira Paiva

Vice-Coordenador CEUA-IV