

PROTEÍNAS QUIMÉRICAS RECOMBINANTES DE BARTONELLA HENSELAE COMO IMUNODIAGNÓSTICO DE BARTONELOSE FELINA

 <https://doi.org/10.56238/arev6n4-031>

Data de submissão: 03/11/2024

Data de publicação: 03/12/2024

Helena Piúma Gonçalves

Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. Campus Universitário, Capão do Leão, RS/BR.
E-mail: helena.piuma@gmail.com

Amilton Clair Pinto Seixas Neto

Laboratório de bacteriologia e bioensaios (LaBBio), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.
Campus Capão do Leão

Sérgio Jorge

Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. Campus Universitário, Capão do Leão, RS/BR.

Daiane Drawanz Hartwig

Laboratório de bacteriologia e bioensaios (LaBBio), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.
Campus Capão do Leão

Adonai Alvino Pessoa Junior

Laboratório de Hantaviroses e Rickettsioses – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro,
RJ, Brasil.

Matheus Ribeiro da Silva Assis

Laboratório de Hantaviroses e Rickettsioses – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro,
RJ, Brasil.

Elba Regina Sampaio de Lemos

Laboratório de Hantaviroses e Rickettsioses – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro,
RJ, Brasil.

Marlete Brum Cleff

Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. Campus Universitário, Capão do Leão, RS/BR.

RESUMO

A bartonelose é uma doença de grande importância para a saúde única, mas apresenta um diagnóstico desafiador, visto que as técnicas convencionais são limitadas, em relação a alta complexidade e tempo necessário. Logo, a busca por novos alvos para o diagnóstico sorológico de *Bartonella henselae* é de considerável interesse e o desenvolvimento de抗ígenos específicos pode incrementar a sensibilidade e especificidade desse diagnóstico. Assim, esta pesquisa avaliou a atividade antigenica de proteínas quiméricas recombinantes sintetizadas a partir de epítópos imunogênicos de *B. henselae* para imunodiagnóstico de bartonelose felina. Para tanto, foi analisada a atividade de reconhecimento das quimeras em 145 amostras de soros felinos através de ELISA indireto (ELISA feline Bartonella-EFB).

Para analisar as características gerais do teste foi realizada uma análise de aderência, utilizando as métricas de acurácia, sensibilidade, especificidade e área sob a curva ROC (AUROC). A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia do EFB para detecção de anticorpos anti-B. henselae também foram mensurados frente ao teste de imunofluorescência indireta (IFA), para analisar sua possível aplicação como método de triagem e/ou de confirmação no diagnóstico sorológico da bartonelose felina. As proteínas quiméricas mostraram-se efetivas ao detectar a presença de anticorpos contra B. henselae em amostras de soros felinos, e ainda, todas as amostras reativas para bartonelose no teste proposto foram reativas também no teste padrão ouro (IFA). Como o teste proposto demonstrou baixa sensibilidade e alta especificidade, as proteínas recombinantes mostraram-se promissoras, e poderão ser utilizadas como ferramenta para o diagnóstico de bartonelose felina.

Palavras-chave: Diagnóstico. Doença da Arranhadura do Gato. Ectoparasitas. Quimeras. Zoonose.

1 INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por vetores são de suma importância para a medicina veterinária e humana, visto que a interação entre as espécies propicia a transmissão e disseminação de zoonoses⁽¹⁾. O diagnóstico adequado dessas enfermidades contribui para o tratamento dos animais em tempo hábil, reduzindo a transmissão do agente para outros animais e para o homem. Nesse sentido, zoonoses silenciosas, como a bartonelose, constituem um desafio, porque os animais são frequentemente assintomáticos ou oligossintomáticos, o que dificulta a identificação e tratamento precoce dos animais enfermos, aumentando o risco de transmissão a outros indivíduos⁽²⁾.

A bartonelose é causada por bactérias patogênicas do gênero *Bartonella*, subclasse α2 de proteobactérias, constituído por bacilos intracelulares, aeróbicos e de crescimento lento. Das 46 espécies conhecidas de *Bartonella* 18 estão associadas com doença humana⁽³⁾. Em relação às espécies, além de *B. henselae*, agente etiológico da doença da arranhadura do gato, que acomete pessoas e pode ocasionar infecção grave e até fatal em indivíduos imunocomprometidos⁽⁴⁾, também *B. clarridgeiae* e *B. koehlerae*, estão associadas aos gatos, considerados importantes reservatórios e transmissores⁽⁵⁾.

A transmissão ocorre principalmente de forma vetorial, por insetos hematófagos, como flebotomíneos e pulgas, sendo os mamíferos seus reservatórios naturais⁽⁶⁾. Pulgas da espécie *Ctenocephalides felis* são vetores naturais de *Bartonella* spp. e a transmissão para felinos ocorre por meio da inoculação de partículas de fezes das pulgas infectadas com a bactéria em lesões pré-existentes ou durante o *grooming*, possibilitando a transmissão para outros animais ou pessoas através de arranhadura ou mordedura^(1, 5, 6).

O diagnóstico da bartonelose é um desafio, pois ainda não há uma técnica que detecte a presença de infecção com acurácia⁽²⁾. As técnicas mais utilizadas são ELISA, *western blot*, imunofluorescência indireta, análise molecular como a reação em cadeia de polimerase (PCR), imunohistoquímica, isolamento e cultura microbiológica, porém, todas apresentam limitações^(2, 7). A cultura é considerada o padrão ouro para a confirmação da infecção por *Bartonella*, sendo recomendadas técnicas especializadas como meios de crescimento enriquecidos e cultivo celular⁽⁸⁾. Porém, essa técnica requer laboratório especializado, meios de cultura específicos, atmosfera controlada, e o crescimento lento do microrganismo demanda maior tempo para os resultados⁽⁹⁾.

Diante do exposto, compreender e aperfeiçoar os métodos de diagnóstico das bartoneloses é de grande interesse para a comunidade científica e para a sociedade, considerando que a infecção em gatos pode ser assintomática, ou com sinais clínicos inespecíficos e bacteremia persistente, fato que facilita a transmissão zoonótica^(10, 11). Assim, a disponibilidade de novos instrumentos diagnóstico mais rápidos, eficazes e de baixo custo é fundamental não somente para a saúde humana como também

para a medicina veterinária, especialmente em felinos de comunidades vulneráveis com controle de vetores inadequado. Portanto, essa pesquisa avaliou um novo método de diagnóstico sorológico para bartonelose em felinos, com o uso de proteínas quiméricas recombinantes produzidas a partir de antígenos de *B. henselae*, além de descrever parâmetros hematológicos e bioquímicos associados a felinos do estudo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Ambulatório Veterinário Ceval, que é um posto de atendimento clínico do Hospital de Clínicas Veterinária (HCV) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), localizado em uma região em vulnerabilidade social na cidade de Pelotas-RS, na Região Sul do Brasil. Nesses espaços, durante as consultas, usualmente ocorre a coleta de sangue dos animais para realizar exames a fim de determinar seu estado de saúde, sendo as amostras remanescentes identificadas e armazenadas na soroteca do Laboratório de Patologia Clínica do HCV/UFPel e disponibilizadas para a execução de pesquisas. Para este estudo a partir da informação de que praticamente 100% dos felinos atendidos no HCV apresentam ectoparasitas em alguma fase da vida, foram utilizadas 145 amostras de soro de felinos, oriundas de 125 pacientes. As amostras de sangue, em um volume de aproximadamente 3mL, foram coletadas de forma asséptica, por punção jugular ou cefálica, identificadas e acondicionadas em tubos estéreis sem anticoagulante. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a $3.000 \times g$ por 15 minutos. As amostras de soro obtidas foram transferidas para tubos de 2 ml e armazenadas a -20°C, até o processamento e utilização nas análises laboratoriais.

Adicionalmente foram coletados e tabulados os dados referentes às análises hematológicas e bioquímicas dos animais, obtidos por meio do software de gestão do HCV- UFPel (SimplesVet), em que consta o histórico completo de todos os pacientes, para identificar se estes apresentavam alguma alteração indicativa de infecção nos exames realizados.

2.1 PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Neste estudo foram analisadas três proteínas quiméricas recombinantes denominadas rQ1, rQ2 e rQ3 que foram desenvolvidas a partir de epítópos identificados com base nas sequências GroEL, 17 kDa, P26, BadA, Pap31, OMP89 e OMP43, que são antígenos importantes de *B. henselae*, como descritas por Gonçalves et al. ⁽¹²⁾. Segundo os autores, essas proteínas foram expressas e purificadas usando um sistema heterólogo baseado em *Escherichia coli* e reagiram com anticorpos presentes no soro de humanos naturalmente infectados, que foram cedidas para essa pesquisa pelo Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios (LABBio/UFPel).

2.2 ANTIGENICIDADE DAS QUIMERAS RECOMBINANTES COM SORO DE FELINOS

Foram realizados ensaios de *Western blot* (WB) para avaliar o reconhecimento das proteínas rQ1, rQ2 e rQ3 por anticorpos anti-*Bartonella* que pudessem estar presentes no soro de felinos naturalmente infectados. Para isso, as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%), eletro transferidas para membranas de nitrocelulose e bloqueadas com Soro Fetal Bovino (SFB 1%), durante 1h, sob agitação (50 rpm). Após, foram realizadas lavagens com tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline PBS-T*) para retirar a solução de bloqueio.

Na sequência, foi analisado um pool de 28 soros felinos ainda não testados para bartonelose (anticorpo primário), que foi agitado por 1h a 50 rpm. Posteriormente, foram realizadas lavagens com tampão PBS-T, para retirar o anticorpo primário (soros felinos). O anticorpo conjugado anti-IgG de felino (Rhea Biotech) (anticorpo secundário) foi adicionado à membrana nas concentrações definidas pelo fabricante (1:10.000), com o objetivo de amplificar a detecção dos anticorpos de interesse, conferindo maior especificidade ao teste. Para a revelação, utilizou-se uma solução substrato/cromógeno (6mg de diaminobenzidina, 0,03% de sulfato de níquel, 50 mM de Tris HCl pH 8,0 e 0,03% de peróxido de hidrogênio).

2.3 ELISA FELINE BARTONELLA (EFB)

O ELISA indireto foi desenvolvido utilizando as proteínas químéricas e soro anti-*Bartonella* de felinos, aqui denominados como ELISA Feline *Bartonella* (EFB), em placas de poliestireno com 96 cavidades sensibilizadas com as quimeras recombinantes de forma individual, diluídas em tampão carbonato-bicarbonato (50 mM; pH 9,6). A concentração de cada antígenos (5 µg/ml), bem como a diluição dos soros felinos (1:100) foram pré-determinadas através do ELISA *checkerboard*⁽¹³⁾. Após incubação por 1h à 37°C, as cavidades foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS 1X) e bloqueadas com solução de caseína 0,5%.

Os soros felinos foram diluídos em PBS 1X e incubados à 37°C por uma hora em contato com os抗ígenos. Foram utilizados quatro controles negativos: i) apenas as proteínas químéricas; ii) as proteínas químéricas e o diluente; iii) as proteínas químéricas e o conjugado e iv) apenas o conjugado. O anticorpo anti-IgG felino conjugado com peroxidase (Rhea Biotech) foi adicionado em diluições pré-estabelecidas pelo fabricante (1:10.000). As placas de poliestireno foram mantidas a 37°C por 1h entre cada uma das etapas do teste. Lavagens foram realizadas entre cada reação, utilizando solução PBS-T (PBS + 0,05% Tween 20). Para visualizar as reações foi adicionado o tampão citrato 0,1 M acrescido de 0,2 mg/mL de *O-Phenylenediamine Dihydrochloride* (OPD) e 0,03% de H₂O₂.

Subsequentemente foi utilizada uma solução de 2M H₂SO₄ para interromper a reação, que foi quantificada via espectrofotômetro com comprimento de onda de 492 nm.

Todos os testes foram realizados em duplicata e todas as amostras testadas para cada quimera (rQ1, rQ2 e rQ3). As amostras identificadas como reagentes foram testadas novamente em duplicata, após 20 dias do resultado reativo.

2.4 CONTRAPROVA - ANÁLISE SOROLÓGICA (IFA-FIOCRUZ)

A análise sorológica foi utilizada como contraprova dos resultados positivos no teste proposto (EFB) no Laboratório de Hantaviroses e Rickettsioses do Instituto Oswaldo Cruz (LHR), serviço de referência regional para o diagnóstico de rickettsioses, utilizando imunofluorescência indireta (IFA) para o diagnóstico de *B. henselae*, com o kit diagnóstico *Bartonella* IFA IgG REF IF1300G, lote X13082N (FOCUS), seguindo o protocolo do laboratório e as recomendações do fabricante, com um ponto de corte para amostras reagentes de 1:64. Na contraprova, foram analisadas oito amostras de soro felino selecionadas das amostras analisadas para EFB de forma aleatória e as quatro amostras reativas no EFB sem identificação, totalizando doze amostras. As amostras foram diluídas em 1:64 e 1:128 em tampão salino fosfato, a intensidade da fluorescência específica foi avaliada subjetivamente (com escores de 1 a 4) e o título de anticorpos foi definido pela principal diluição com escore 2.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A aderência do EFB foi analisada conforme as métricas de acurácia (total de acertos/total de registros), sensibilidade (total de acertos positivos/total de positivos), especificidade (total de acertos negativos/total de negativos) e área sob a curva ROC (AUROC) (sensibilidade em função da proporção de falsos positivos: 1- especificidade). Para avaliação das diferenças entre os parâmetros hematológicos e bioquímicos entre os animais, cada resultado foi comparado utilizando Modelos Lineares Generalizados (GLM's) de acordo com as categorias: positivo em ambos os testes; positivo apenas na FIOCRUZ e negativo em ambos os testes. Todos os testes foram realizados no R ⁽¹⁴⁾, considerando índice de significância de 95%.

A sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo (VPP), o valor preditivo negativo (VPN) e a acurácia do método EFB para detecção de anticorpos anti-*B. henselae* em amostras de soro felino foram mensuradas frente ao IFA, para analisar sua possível utilização como método de triagem e/ou de confirmação no diagnóstico sorológico da bartonelose felina.

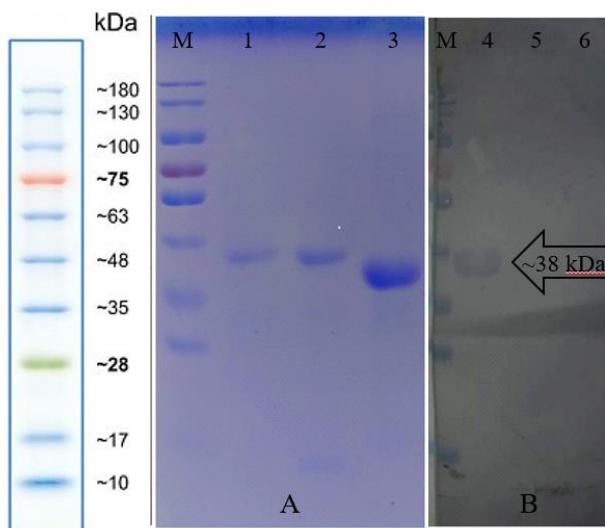
Para o cálculo de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia foram consideradas amostras verdadeiras reativas (VR), amostras verdadeiras não-reativas (VNR), amostras falsas

reativas (FR), amostras falsas não-reativas (FNR) do método de ELISA em relação ao método de IFA; amostras reativas (VR + FR) e amostras não-reativas (VNR + FNR) em relação ao método de ELISA; amostras reativas (R) e amostras não-reativas (NR) em relação ao método de IFA; e total de amostras analisadas (T).

3 RESULTADOS

Das três proteínas quiméricas purificadas avaliadas por *Western blot* (rQ1, rQ2 e rQ3) (Figura 1A), somente a rQ1 foi reconhecida por soro de felinos naturalmente infectados (Figura 1B).

Figura 1. Expressão e antigenicidade das proteínas quiméricas recombinantes rQ1, rQ2 e rQ3. Obs.: (A) SDS-PAGE 12% corado com Comassie Blue e (B) *Western blotting* de reconhecimento das quimeras recombinantes pelos anticorpos anti-*Bartonella henselae* presente no soro de felinos naturalmente infectados. M - Marcador de peso molecular Page Ruler (Thermo Scientific), 1 4 - Q1; 2e 5 - Q2; 3e 6 - Q3, identificados na faixa de 38 kDa.



Das 145 amostras de soro felino analisadas por EFB, quatro foram reagentes contra as quimeras avaliadas (Tabela 1), o que indica que estes felinos possivelmente estavam infectados pela bactéria, resultado que foi confirmado após a repetição do teste sob as mesmas condições. Assim, as quimeras recombinantes desenvolvidas por meio da predição de epítopos por ferramentas de imunoinformática reagiram com anticorpos presentes no soro de felinos, oferecendo uma alternativa interessante de imunodiagnóstico para a bartonelose.

Tabela 1. Resultados dos soros felinos submetidos ao teste ELISA *Feline Bartonella* (EFB).

	Amostra de soro felino 1	Amostra de soro felino 2	Amostra de soro felino 3	Amostra de soro felino 4
Proteína Q1	Reagente	Não reagente	Reagente	Não reagente
Proteína Q2	Reagente	Reagente	Reagente	Não reagente
Proteína Q3	Reagente	Não reagente	Reagente	Reagente

Das 12 amostras encaminhadas para confirmação por IFA, oito foram positivas, sendo que todas as amostras reativas para *Bartonella* no EFB ($n = 4$) também reagiram na IFA, mas quatro amostras não reativas no EFB, reagiram na contraprova (Tabela 1). Comparando os resultados obtidos no EFB com a contraprova (IFA) observamos, 4 amostras verdadeiras reativas, 4 falsas negativas reativas, 4 verdadeiras não reativas e nenhuma falsa reativa. Estes dados são utilizados para determinar a sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia do EFB para detecção de anticorpos anti-*Bartonella henselae* em amostras de soro felino mensuradas frente ao método IFA (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados dos soros felinos submetidos à contraprova IFA para validação dos resultados obtidos no teste ELISA *Feline Bartonella* (EFB).

Amostras soros felinos	Teste de ELISA <i>Feline Bartonella</i> (EFB)	Contraprova IFA
1	+	+
2	-	+
3	+	+
4	-	-
5	-	-
6	-	+
7	+	+
8	+	+
9	-	-
10	-	-
11	-	+
12	-	+

*IFA: Imunofluorescência Indireta.

A sensibilidade dos testes preliminares do EFB, em relação ao do IFA foi de 50% e a especificidade foi de 100%. O VPP, número de positivos em ambos os testes sobre o número de positivos apenas no EFB, foi de 100% e o VPN, calculado pelo número de amostras negativas em ambos os testes sobre o total de negativos no teste EFB, foi de 50%. A acurácia, determinada pela soma dos soros positivos e negativos detectados nos dois testes sobre o total da amostra, foi de 66,7%. A área sobre curva ROC demonstra que apesar da alta especificidade, ou seja, a capacidade do EFB de mensurar os felinos verdadeiramente negativos para bartonelose, a sensibilidade foi baixa, mostrando que o teste apresenta imprecisão na identificação dos verdadeiramente positivos (EUROC=0,75), apesar de não apresentar falsos negativos.

As amostras de sangue de todos os felinos avaliados foram submetidas também a análises hematológicas e bioquímicas, cujos resultados foram comparados entre os animais não reativos nos dois testes, reativos no IFA e reativos em ambos os testes, EFB e IFA (Tabela 3).

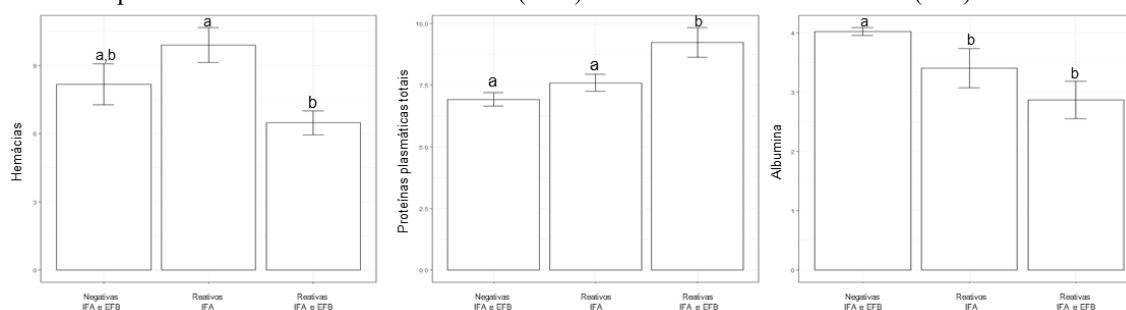
Tabela 3. Média e desvio padrão dos parâmetros hematológicas e bioquímicos dos felinos analisados para *Bartonella henselae*.

Variáveis	Não reativos EFB e IFA	Reativos IFA	Reativo EFB e IFA
ALT (TGP)	36,38 +/- 30,26 ^a	150,93 +/- 108,10 ^a	44,43 +/- 29,39 ^a
Creatinina	1,35 +/- 0,33 ^a	1,20 +/- 0,61 ^a	1,05 +/- 0,17 ^a
Ureia	73,76 +/- 23,61 ^a	91,61 +/- 90,40 ^a	65,98 +/- 21,36 ^a
Fosfatase Alcalina	60,13 +/- 13,51 ^a	50,73 +/- 27,83 ^a	21,28 +/- 19,42 ^a
Hemácias	8,17 +/- 1,80 ^{ab}	9,89 +/- 1,34 ^a	6,48 +/- 1,07 ^b
Hemoglobina	12,28 +/- 2,35 ^a	12,63 +/- 1,27 ^a	9,20 +/- 1,49 ^a
Hematócrito	0,40 +/- 0,09 ^a	0,40 +/- 0,04 ^a	0,29 +/- 0,04 ^a
VCM	47,03 +/- 1,65 ^a	40,20 +/- 2,21 ^b	45,15 +/- 3,24 ^a
CHCM	0,32 +/- 0,01 ^a	0,32 +/- 0,01 ^a	0,32 +/- 0,01 ^a
Plaquetas	79,67 +/- 4,62 ^a	97,00 +/- 115,97 ^a	213,67 +/- 163,54 ^a
Leucócitos Totais	8.900 +/- 2.546 ^a	7.933 +/- 2.996 ^a	19.675 +/- 13.340 ^a
Segmentados	5.433 +/- 2.132 ^a	4.694 +/- 2.034 ^a	15.244 +/- 13.142 ^a
Linfócitos	2.702 +/- 1.139 ^a	2.835 +/- 1.419 ^a	4.179 +/- 1.266 ^a
Monócitos	156,00 +/- 119,42 ^a	232,00 +/- 339,10 ^a	649,00 +/- 547,32 ^a
Eosinófilos	609,00 +/- 549,95 ^a	64,00 +/- 56,00 ^a	451,25 +/- 404,99 ^a
Proteínas Plasmáticas Totais	6,93 +/- 0,46 ^a	7,60 +/- 0,60 ^a	9,25 +/- 1,20 ^b
Fibrinogênio	125,00 +/- 50,00 ^a	166,67 +/- 57,74 ^a	150,00 +/- 57,74 ^a
Albumina	4,03 +/- 0,13 ^a	3,41 +/- 0,66 ^{ab}	2,87 +/- 0,63 ^b

Obs. Letras diferentes na mesma linha identificam diferenças estatísticas pelo GLM (*Generalized Linear Model* - Modelo Linear Generalizado, em português). EFB: ELISA Feline *Bartonella*.

As hemácias apresentaram uma pequena redução no grupo de animais que reagiu no EFB e na contraprova. Os animais reativos apenas no IFA, apresentaram Volume Corpuscular Médio (VCM) e Proteínas Plasmáticas Totais (PPT) menores, mas a albumina foi sensivelmente mais alta. O PPT foi mais elevado em todas as amostras reativas (EFB e IFA), em relação aos animais não reagentes em ambos os testes (Figura 2).

Figura 2. Parâmetros hematológicas e bioquímicos dos felinos analisados para *Bartonella henselae* comparados entre as amostras reativas para o teste ELISA Feline *Bartonella* (EFB) e imunofluorescência indireta (IFA).



Os resultados demonstraram que as três proteínas recombinantes (rQ1, rQ2 e rQ3) foram capazes de identificar animais com bartonelose felina através do EFB, o que também foi confirmado pela contraprova IFA. Ainda, o teste EFB demonstrou alta especificidade, mas baixa sensibilidade.

4 DISCUSSÃO

No ensaio *Western blot*, em que foi avaliada a atividade de reconhecimento das proteínas rQ1, rQ2 e rQ3 por anticorpos anti-*Bartonella* que pudesse estarem presentes no soro de felinos naturalmente infectados, em um pool contendo soros de 28 pacientes felinos aleatórios, e somente a rQ1 foi reconhecida. Tal técnica foi utilizada previamente aos ensaios do teste EFB, para avaliação inicial da antigenicidade das proteínas, no intuito de caracterizá-las de forma qualitativa e visual. A proteína Q1 foi reconhecida pelos anticorpos presentes nos soros, indicando naquele momento um resultado promissor em relação ao potencial de antigenicidade dessa quimera. Esta proteína destacou-se em relação às outras na avaliação de soros combinados, ao demonstrar atividade de reconhecimento de anticorpos contra *B. henselae*, o que pode ser explicado pela composição diferenciada de epítópos antigênicos desta quimera, visto que as três quimeras foram desenvolvidas a partir de frações diferentes de uma mesma sequência de aminoácidos⁽¹²⁾.

O teste diagnóstico proposto, ELISA *feline Bartonella* (EFB), foi capaz de identificar animais reativos para *B. henselae*, visto que quatro amostras foram reativas e foram confirmadas pela contraprova (IFA). Assim, a EFB tem potencial como teste diagnóstico para *Bartonella*, sendo uma opção mais rápida, simples e de menor custo. Porém, o IFA identificou quatro animais reagentes, que não reagiram ao EFB, o que indica que o teste proposto apresenta menor sensibilidade. Portanto, o EFB, após os ajustes nas concentrações para melhorar o desempenho do teste, pode ser uma alternativa para identificar animais infectados por *Bartonella*, principalmente em animais provenientes de locais com alta infestação por pulgas, como os felinos analisados, contudo, faz-se necessária a aplicação de uma técnica confirmatória, como a IFA, visto que o teste EFB demonstrou baixa sensibilidade.

Nessas regiões, o diagnóstico periódico dos animais, mesmo que assintomáticos, é necessário para o controle da disseminação da doença, pois possibilita o tratamento adequado e controle de ectoparasitas nos positivos, evitando que vetores se infectem e sigam disseminando a bactéria. A infestação por ectoparasitas é muito relevante no contexto epidemiológico da infecção por *Bartonella* spp. em felinos, sendo que maior parte dos gatos analisados estavam infestados por pulgas, quando foram realizadas as coletas de sangue. Além disso, estes animais em sua maioria não eram castrados, tinham acesso à rua, contato com outros animais e histórico de brigas, fatores que influenciam significativamente a ocorrência de bacteremia por *B. henselae*⁽⁵⁾, por isso, a associação de um diagnóstico correto com o tratamento adequado são a melhor estratégia para o controle dessa infecção.

Os pesquisadores citados acima identificaram ainda que o material genético bacteriano em 47,8% das amostras de sangue de gatos e 18,3% das pulgas *C. felis*, o que demonstra que esses ectoparasitas desempenham um papel essencial na transmissão das espécies de *Bartonella* aos gatos.

Contudo, no presente estudo aproximadamente 50% dos animais eram positivos, mesmo sendo assintomáticos, reforçando a necessidade de um correto diagnóstico clínico para o controle da doença, no intuito de prevenir a infecção por *Bartonella* em demais felinos, e consequentemente, em humanos. Em pesquisas futuras para o aprimorar o desempenho do teste, aumentando sua sensibilidade, além disso, deve ser analisado um número maior de soros de animais, para consolidar as informações referentes à sensibilidade e à especificidade do teste.

As quatro amostras reativas no EFB indicam que estes felinos estavam infectados com a *B. henselae*, o que foi confirmado pelo IFA e sugere que este teste pode ser útil para o diagnóstico da bartonelose felina. Porém, a sensibilidade do EFB para detecção de anticorpos IgG anti-*bartonella henselae* foi de apenas 50%, indicando que este método pode gerar falso negativos. Tal fenômeno poderia ser explicado pela reduzida concentração de anticorpos presentes nas amostras avaliadas, ou ainda, devido a imprecisões analíticas, visto que se trata de um teste em etapas iniciais de desenvolvimento.

Já a especificidade de 100%, sugere que este é um método com alta capacidade de identificar felinos não infectados, implicando em reduzidos casos de falso positivos, revelando a possibilidade de um diagnóstico precoce e acessível. Meurer et al. ⁽¹⁵⁾ também avaliaram o desempenho do método de ELISA para detecção de anticorpos anti-*Coxiella burnetii* frente ao método padrão ouro de diagnóstico, também a IFA, teste que também demonstrou baixa sensibilidade e alta especificidade. Portanto, mesmo que o teste ainda necessite de aprimoramento, o EFB já apresenta um grande potencial como um teste diagnóstico para infecção por *B. henselae*.

Nesses casos, o EFB pode ser utilizado tanto em amostras individuais quanto em *pools* de soros de felinos, como um teste confirmatório quanto a infecção *B. henselae* ⁽¹⁶⁾, pois felinos sintomáticos e assintomáticos têm similares chances de estarem infetados por *Bartonella* ⁽¹⁷⁾. Mesmo assim, o EFB ainda demanda mais análises, que testem diferentes concentrações de reagentes, anticorpos e antígenos em diferentes condições, e sendo avaliado em maiores quantidades de amostras de soros felinos, oriundos de diferentes populações, buscando a sua padronização e empenhando-se em melhorar também a sua sensibilidade.

Em relação às análises hematológicas e bioquímicas, os felinos infectados com *Bartonella* em geral não apresentam alterações nos exames clínicos de rotina, mesmo na análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos ⁽¹⁸⁾. A contagem de hemácias foi mais baixa nos animais reativos no EFB e na contraprova IFA, em relação aos reativos apenas na IFA. O VCM, que indica o tamanho médio das hemácias pode ter sido menos menor nos animais positivos apenas na IFA, enquanto os positivos

em ambos os testes não apresentaram diferença dos negativos, o que também deve ser avaliado em um número maior de amostras de soro felinos.

Porém, nas amostras analisadas, PPT e a albumina demonstraram diferença entre os não reativos e reativos. As PPT referem-se a todas as proteínas do plasma, compostas pela albumina e pelas globulinas, e as concentrações destas alteram-se significativamente durante a resposta sistêmica à inflamação, podendo ser o principal achado em algumas enfermidades⁽¹⁹⁾. O parâmetro PPT mostrou-se elevado em todas as amostras reativas, em ambos os testes realizados, em relação aos animais não reagentes. Tal alteração poderia estar relacionada com o processo inflamatório desencadeado pela infecção por *B. henselae* ou pela infecção concomitante com outros agentes infecciosos. Portanto, seria interessante mensurar este parâmetro em grupos maiores de animais avaliados para bartonelose para compreender melhor a relação entre esse indicador a bartonelose.

Apesar de existirem diferenças entre estes parâmetros, não é possível estabelecer uma relação entre a reação dos animais no EFB e as alterações encontradas, devido ao pequeno número de amostras analisadas. Portanto, considera-se que a repetição da análise do EFB em um número maior de animais em conjunto com uma análise longitudinal dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, em regiões com gatos com elevada infestação por ectoparasitas, pode esclarecer em quais condições clínicas ele é capaz de identificar animais infectados.

Na perspectiva da Saúde Única, o bem-estar do homem está intimamente relacionado com os animais e o ambiente que o cercam⁽¹⁾. Nas últimas décadas, a incidência de doenças em humanos ocasionadas por bactérias zoonóticas aumentou consideravelmente⁽²⁰⁾, e as bactérias do gênero *Bartonella* representam um dos maiores desafios contemporâneos para a Saúde Única⁽⁷⁾. Segundo os autores, os animais de estimação atuam como sentinelas para a exposição humana a patógenos.

Considerando que a população de felinos aumentou consideravelmente e a adoção de gatos como animais de companhia tornou-se uma tendência, pesquisas dedicadas a doenças de caráter zoonótico são fundamentais⁽¹⁶⁾. Nesse contexto, o teste proposto contribui para o conhecimento a respeito da bartonelose, visto que o diagnóstico de patógenos zoonóticos a partir de seus reservatórios é uma das principais formas de controlar estas doenças⁽²¹⁾. Considerando que as doenças zoonóticas são mais comuns em populações em situação de vulnerabilidade social, alternativas de diagnóstico mais acessíveis são de grande importância para predizer a incidência destes agravos nessas comunidades.

Apesar da difícil padronização, problema encontrado na execução da maioria dos testes sorológicos⁽⁹⁾, o EFB apresenta como vantagem a especificidade das proteínas recombinantes utilizadas, visto que elas são exclusivas para *B. henselae*, evitando reações cruzadas, adversidade

comumente enfrentada em outras técnicas diagnósticas^(15, 22). Os resultados negativos no ELISA e positivos no IFA, podem ser um indicativo da concentração de anticorpos nas amostras, que podem ser insuficientes para detecção pela técnica ELISA, mas suficientes para a IFA. Portanto, futuros resultados negativos encontrados pela aplicação do EFB devem ser interpretados com cautela. Ademais, o desenvolvimento de testes diagnósticos nacionais aumenta a disponibilidade dessas ferramentas de diagnóstico e diminui a dependência da importação de kits importados, o que diminui seu custo.

5 CONCLUSÃO

Os testes realizados com as proteínas quiméricas de *B. henselae* foram capazes de detectar a presença de anticorpos contra *B. henselae* tanto em amostras combinadas de soros felinos (*Western blot*), quanto nos testes ELISA indireto (EFB), com amostras individuais. Ainda, todas as amostras reativas para bartonelose no teste proposto foram reativas também na contraprova com a técnica de IFA, considerada padrão ouro no diagnóstico de bartonelose.

Portanto, as proteínas recombinantes rQ1, rQ2 e rQ3 podem ser consideradas no desenvolvimento de um teste diagnóstico de bartonelose em felinos. Como todo método inovador, o teste EFB necessita de aperfeiçoamento e padronização, para a sua validação como futuro teste diagnóstico comercial amplamente difundido, sendo avaliadas diferentes concentrações de reagentes, anticorpos e antígenos, em diferentes condições, considerando maiores quantidades de amostras de soros felinos, oriundos de diferentes populações para padronizar e melhorar a sensibilidade e o desempenho do teste aqui proposto.

Em relação às análises hematológicas e bioquímicas, apesar de existirem diferenças entre estes parâmetros, não foi possível estabelecer uma relação entre a reação dos animais no EFB e as alterações encontradas, devido ao pequeno número de amostras analisadas. Por isso, estudos com populações maiores associando estes parâmetros hematológicos e bioquímicos ao teste EFB são necessários para elucidar em quais condições clínicas ele é capaz de identificar animais infectados.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Silva BT, Souza AM, Campos SD, Macieira DD, Lemos ER, Favacho AR, Almosny NR. *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* infection, hematological changes and associated factors in domestic cats and dogs from an Atlantic rain forest area, Brazil. *Acta Trop* [Internet]. Maio 2019 [citado 19 maio 2024]; 193:163-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.02.026>
2. Álvarez-Fernández A, Breitschwerdt EB, Solano-Gallego L. Bartonella infections in cats and dogs including zoonotic aspects. *Parasites Amp Vectors* [Internet]. Dez 2018 [citado 19 maio 2024];11(1). Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3152-6>
3. Ansil BR, Mendenhall IH, Ramakrishnan U. High prevalence and diversity of *Bartonella* in small mammals from the biodiverse Western Ghats. *PLOS Neglected Trop Dis* [Internet]. 11 mar 2021 [citado 19 maio 2024];15(3):e0009178. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009178>
4. Angelakis E, Raoult D. Pathogenicity and treatment of *Bartonella* infections. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. Jul 2014 [citado 19 maio 2024];44(1):16-25. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.04.006>
5. Raimundo JM, Guimarães A, Amaro GM, Silva AT, Rodrigues CJ, Santos HA, Lemos ER, Favacho AR, Baldani CD. Prevalence of *Bartonella* species in shelter cats and their ectoparasites in southeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* [Internet]. 2022 [citado 19 maio 2024];31(1). Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1984-29612022006>
6. Eyer-Silva WD, Wutke LS, Paiva AD, Silva GA, Ferry FR, Signorini DJ, Oliveira JG, Lemos ER. A case of *Bartonella* neuroretinitis with macular star diagnosed by clinical, epidemiological, serological, and molecular data: resolution after initiation of antimicrobial therapy. *Rev Soc Bras Medicina Trop* [Internet]. 2020 [citado 19 maio 2024];53. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0516-2019>
7. Breitschwerdt EB. Bartonellosis, One Health and all creatures great and small. *Vet Dermatol* [Internet]. 29 jan 2017 [citado 19 maio 2024];28(1):96—e21. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/vde.12413>
8. Gutiérrez R, Vayssier-Taussat M, Buffet JP, Harrus S. Guidelines for the Isolation, Molecular Detection, and Characterization of *Bartonella* Species. *Vector Borne Zoonotic Dis* [Internet]. Jan 2017 [citado 19 maio 2024];17(1):42-50. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1956>
9. BRUNT J, GUPTILL L, KORDICK D, KUDRAK S, LAPPIN M. American Association of Feline Practitioners 2006 Panel report on diagnosis, treatment, and prevention of *Bartonella* spp. infections. *J Feline Med Amp Surg* [Internet]. Ago 2006 [citado 19 maio 2024];8(4):213-26. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2006.05.006>
10. Souza AM, Almeida DN, Guterres A, Gomes R, Favacho AR, Moreira ND, Maia LM, Rozental T, Torres RD, Cerqueira AD, Lemos ER, Pereira AN. Bartonelose: análise molecular e sorológica em gatos do Rio de Janeiro Brasil. *Rev Bras Cienc Vet* [Internet]. 2010 [citado 19 maio 2024];17(1):7-11. Disponível em: <https://doi.org/10.4322/rbcv.2014.135>

11. Favacho AR, Roger I, Akemi AK, Pessoa JR AA, Varon AG, Gomes R, Godoy DT, Pereira S, Lemos ER. MOLECULAR IDENTIFICATION OF *Bartonella henselae* IN A SERONEGATIVE CAT SCRATCH DISEASE PATIENT WITH AIDS IN RIO DE JANEIRO, BRAZIL. Rev Inst Medicina Trop Sao Paulo [Internet]. Jul 2014 [citado 19 maio 2024];56(4):363-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0036-46652014000400017>
12. Gonçalves JM, Cardoso TL, de Freitas SB, Woloski R, Neto AC, da Silva Pinto L, de Lemos ES, Hartwig DD. In silico analyses and design of chimeric proteins containing epitopes of *Bartonella henselae* antigens for the control of cat scratch disease. Appl Microbiol Biotechnol [Internet]. 16 nov 2022 [citado 19 maio 2024]. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12269-3>.
13. Crowther JR. The ELISA Guidebook [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2009 [citado 19 maio 2024]. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-254-4>
14. R: The R Project for Statistical Computing [Internet]. R: The R Project for Statistical Computing; [citado 19 maio 2024]. Disponível em: <https://www.r-project.org/>.
15. Meurer IR, Silva MR, Silva MV, de Lima Duré ÁÍ, Adelino TÉ, Costa AV, Vanelli CP, Rozental T, Lemos ER, do Amaral Corrêa JO. SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO MÉTODO DE ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-COXIELLA BURNETII FRENTE AO MÉTODO PADRÃO OURO DE DIAGNÓSTICO, A IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA. Braz J Infect Dis [Internet]. Jan 2021 [citado 19 maio 2024];25:101420. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.101420>
16. Ferrara F, Di Niro R, D'Angelo S, Busetti M, Marzari R, Not T, Sblattero D. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Bartonella henselae* infection detection. Lett Appl Microbiol [Internet]. 6 jun 2014 [citado 19 maio 2024];59(3):253-62. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/lam.12286>
17. Raimundo JM, Guimarães A, Amaro GM, da Silva AT, Botelho CF, Massard CL, de Lemos ER, Favacho AR, Baldani CD. Molecular Survey of *Bartonella* Species in Shelter Cats in Rio De Janeiro: Clinical, Hematological, and Risk Factors. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 5 jun 2019 [citado 19 maio 2024];100(6):1321-7. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0585>
18. Souza AM, Almosny NR, Favacho AR, Almeida DN, Ferreira RF, Ferreira EO, Moreira NS, Lemos ER. *Bartonella* spp. and hematological changes in privately owned domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. J Infect Dev Ctries [Internet]. 5 set 2017 [citado 19 maio 2024];11(08):591-6. Disponível em: <https://doi.org/10.3855/jidc.8152>
19. Thrall MA, Weiser G, Allison RW, Campbell TW. Hematologia e bioquímica clínica veterinária. São Paulo: Roca; 2015. 688 p.
20. Bernal MK, Pereira WL, Ribeiro BC, Sarmento VP, Nunes HM. BARTONELOSE: DOENÇA DE IMPORTÂNCIA PARA A SAÚDE PÚBLICA ENVOLVENDO A TRÍADE HOMEM-AMBIENTE-ANIMAL. Arq Cienc Vet Zool UNIPAR [Internet]. 12 abr 2023 [citado 19 maio 2024];26(1cont):01-24. Disponível em: <https://doi.org/10.25110/arqvvet.v26i1cont-001>

21. Sayed AS, Alsaadawy RM, Ali MM, Abd El-Hamid RF, Baty RS, Elmahallawy EK. Serological and Molecular Detection of *Bartonella henselae* in Cats and Humans From Egypt: Current Status and Zoonotic Implications. *Front Vet Sci* [Internet]. 14 abr 2022 [citado 19 maio 2024];9. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.859104>
22. Jost M, Latz A, Ballhorn W, Kempf VA. Development of a Specific and Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay as an In Vitro Diagnostic Tool for Detection of *Bartonella henselae* Antibodies in Human Serum. *J Clin Microbiol* [Internet]. 26 set 2018 [citado 19 maio 2024];56(12). Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.01329-18>