

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Utilização de proteínas quiméricas de *Bartonella henselae* para
desenvolvimento de testes diagnósticos em felinos**

Helena Piúma Gonçalves

Pelotas, RS

2023

Helena Piúma Gonçalves

Utilização de proteínas quiméricas de *Bartonella henselae* para desenvolvimento de testes diagnósticos em felinos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientadora: Profa. Dra. Marlete Brum Cleff

Coorientador: Prof. Dr. Sérgio Jorge

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

G635u Gonçalves, Helena Piúma

Utilização de proteínas quiméricas de *Bartonella henselae* para desenvolvimento de testes diagnósticos em felinos [recurso eletrônico] / Helena Piúma Gonçalves ; Marlete Brum Cleff, orientadora ; Sérgio Jorge, coorientador. – Pelotas, 2023.

54 f. : il.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Diagnóstico. 2. Ectoparasitas. 3. Gato. 4. Quimeras. 5. Zoonose. I. Cleff, Marlete Brum, orient. II. Jorge, Sérgio, coorient. III. Título.

CDD 636.70896959

Helena Piúma Gonçalves

Utilização de proteínas quiméricas de *Bartonella henselae* para desenvolvimento de testes diagnósticos em felinos

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 21/07/2023

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Marlete Brum Cleff
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Daiane Drawanz Hartwig
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Amilton Clair Pinto Seixas Neto
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Karina Affeldt Guterres
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico este trabalho aos meus pais, meus maiores e melhores orientadores na vida.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus e a espiritualidade que me acompanha, me guia e me fortalece. Sou grata por tantas bênçãos e aprendizados.

Dedico esta conquista à minha família, meu porto seguro, razão da minha existência e a quem eu consagro todas as minhas conquistas.

Ao meu namorado Nico, pelo incentivo e companheirismo.

Agradeço à minha orientadora, professora Marlete, por mais esta oportunidade, por acreditar em mim, manter-me motivada, sempre com uma palavra amiga, otimista e incentivadora diante de todas as adversidades.

Às minhas queridas colegas Tabata, Luciana, Nielle, Stefanie, Cris e Sol, pela ajuda, companhia e amizade.

Agradeço especialmente ao Amilton Seixas, por toda a dedicação ao meu trabalho, por todos os ensinamentos, estando sempre disposto e atencioso, mesmo envolvido em tantos projetos. E a toda equipe do LaBBio (Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios) da UFPel, pela colaboração em meu projeto: Professora Daiane, Thayná e Stella.

Ao meu coorientador, professor Sérgio Jorge, pela iniciativa da criação deste projeto.

À professora Elba Sampaio de Lemos e Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) pela disponibilidade e pelos bons frutos que colhemos através da nossa parceria!

Ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária e à Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“O desejo pelo objetivo mostrará os meios.”

William Hazlitt

Resumo

Gonçalves, Helena Piúma. **Utilização de proteínas quiméricas de *Bartonella henselae* para desenvolvimento de testes diagnósticos em felinos**. 2023. 54f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

A bactéria *Bartonella henselae* tem grande importância em saúde única, por causar infecções agudas e crônicas em animais domésticos, silvestres e humanos. Embora a maioria dos casos sejam autolimitantes ou assintomáticos, podem ocorrer infecções graves e até fatais especialmente em pacientes imunocomprometidos. As infecções persistentes podem produzir manifestações clínicas diversas, ainda precariamente caracterizadas nos felinos, além desta ser a espécie com maior potencial zoonótico. O diagnóstico de bartonelose ainda é desafiador, visto que as técnicas convencionais atualmente utilizadas apresentam limitações. Portanto, a busca por novos ensaios para o diagnóstico da infecção por *B. henselae* é de considerável interesse. Assim, objetivou-se avaliar a atividade antigênica de proteínas quiméricas recombinantes sintetizadas a partir de epítomos imunogênicos de *B. henselae* para detecção de anticorpos específicos em amostras de felinos. Três proteínas quiméricas recombinantes foram utilizadas nesse estudo (rQ1, rQ2 e rQ3), tendo sua antigenicidade contra soros de felinos avaliada por *Western blotting*. Já o reconhecimento das quimeras por anticorpos anti-*Bartonella* presentes em 145 amostras de soros felinos foi verificada por ELISA indireto, pelo teste denominado ELISA *Feline Bartonella* (EFB). Foi realizada uma análise de aderência do EFB, utilizando as métricas de acurácia, sensibilidade, especificidade e área sob a curva ROC (AUROC). A sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo, o valor preditivo negativo e a acurácia do EFB na detecção de anticorpos anti-*Bartonella* foram comparadas com os resultados do 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 detectaram a presença de anticorpos contra *B. henselae* em amostras de soros felinos, e ainda, todas as amostras reativas para bartonelose no teste proposto (EFB) (n = 4) foram reativas também no teste padrão ouro (IFA). Observou-se 04 amostras reativas nos dois testes e outras 04 amostras reativas apenas na IFA. Ao analisar amostras de felinos oriundos de comunidades socialmente vulneráveis de Pelotas- RS foi identificada a presença de infecção por *B. henselae*. Na avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos entre os grupos reagentes e não reagentes na IFA, a única alteração encontrada foi nos níveis de albumina, não mostrando relevância clínica. Em síntese, as proteínas quiméricas recombinantes mostraram-se promissoras, e poderão ser utilizadas como insumos no desenvolvimento de testes de diagnóstico de bartonelose felina.

Palavras-chave: Diagnóstico; Ectoparasitas; Gato; Quimeras; Zoonose.

Abstract

Gonçalves, Helena Piúma. **Use of chimeric proteins from *Bartonella henselae* for the development of diagnostic tests in felines**. 2023. 54f. Tese (Doctor in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

Bartonella henselae is of great importance in one health, as it causes acute and chronic complications in domestic, wild and human animals. Although most cases are self-limiting or asymptomatic, severe and even fatal conditions can occur, especially in immunosuppressed patients. Persistent ones can produce diverse clinical manifestations, still poorly characterized in felines, in addition to being the species with the greatest zoonotic potential. The diagnosis of bartonellosis is still challenging, since the techniques currently used have presented limitations. Therefore, the search for new assays for the indirect diagnosis of *B. henselae* infection is of considerable interest. Thus, the objective was to evaluate the antigenic activity of recombinant chimeric proteins synthesized from immunogenic epitopes of *B. henselae* for detection of specific antibodies in feline samples. The chimeras were developed from bioinformatics tools and epitopes identified as the most immunogenic antigens of *B. henselae*, whose qualitative characterization and evaluation of antigenicity was evaluated by Western Blot. The anti-Bartonella recognition activity of the chimeras in 145 feline sera was verified by indirect ELISA, by the test entitled *ELISA Feline Bartonella* (EFB). An EFB adherence analysis was performed using the metrics of accuracy, sensitivity, specificity and Area Under the ROC Curve (AUROC). The sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy of the EFB for detecting anti-*Bartonella henselae* antibodies were compared with the results of the Indirect Immunofluorescence test (IFA), to analyze its possible application as a method of screening and/or confirmation in the serological diagnosis of feline bartonellosis. The chimeric proteins were effective in detecting the presence of antibodies against *B. henselae* in samples of feline sera, and yet, all reactive samples for bartonellosis in the proposed test (n = 4) were also reactive in the gold standard test (IFA). There were 04 reactive samples for the two tests and another 04 reactive samples only for the IFA. When analyzing feline samples from socially vulnerable communities in Pelotas-RS, the presence of infection by *B. henselae* was identified. In the evaluation of hematological and biochemical parameters between the IFA-reactive and non-reactive groups, the only alteration found was in albumin levels, not showing clinical relevance. In summary, the recombinant chimeric proteins showed promise, and could be used as a tool for the diagnosis of feline bartonellosis.

Keywords: Diagnosis; Ectoparasites; Cat; Chimeras; Zoonosis.

Lista de Figuras

Figura 1	Expressão e antigenicidade das proteínas quiméricas recombinantes rQ1, rQ2 e rQ3.....	38
Figura 2	Parâmetros hematológicas e bioquímicos dos felinos analisados para <i>Bartonella henselae</i> comparados entre as amostras reativas para o teste ELISA <i>Feline Bartonella</i> (EFB) e imunofluorescência indireta (IFA).....	41

Lista de Tabelas

Tabela 1	Resultados dos soros felinos submetidos ao teste ELISA <i>Feline Bartonella</i> (EFB).....	38
Tabela 2	Resultados dos soros felinos submetidos à contraprova IFA para validação dos resultados obtidos no teste ELISA <i>Feline Bartonella</i> (EFB).....	39
Tabela 3	Média e desvio padrão dos parâmetros hematológicas e bioquímicos dos felinos analisados para <i>Bartonella henselae</i>	40

Sumário

1 Introdução.....	14
2 Revisão da Literatura	16
2.1. <i>Bartonella spp.</i>.....	16
2.2 Bartonelose em felinos	18
2.3 Patogenia, patologia e sinais clínicos	20
2.4 Diagnóstico de bartonelose.....	22
2.5 Tratamento	27
2.6 Prevenção e controle.....	29
3 Artigo.....	30
4 Considerações Finais	500
Referências	511

1 Introdução

A bartonelose é uma enfermidade de grande importância médica e no âmbito da saúde única, entretanto o diagnóstico da afecção ainda é um desafio, visto que as técnicas convencionais atualmente utilizadas ainda demonstram limitações. Dentre as espécies de *Bartonella*, destaca-se *Bartonella henselae* devido a importância médica. Esta caracteriza-se como uma bactéria Gram-negativa, intracelular facultativa, e que frequentemente infecta gatos com grande infestação de pulgas, sendo estes animais os reservatórios primários da bactéria, enquanto as pessoas são consideradas hospedeiros acidentais (GIL *et al.*, 2013). As espécies de *Bartonella* são adaptadas a diversos hospedeiros, incluindo animais domésticos, silvestres e o homem (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGÓ, 2018).

Bartonella spp. são transmitidas aos mamíferos hospedeiros de forma vetorial, por artrópodes sugadores de sangue, devido à sua característica hemotrópica (DENG *et al.*, 2012; GUTIERREZ *et al.*, 2017), ou ainda, felinos contaminados através de pulgas, irão transmitir a bactéria por arranhões ou mordidas em pessoas, caracterizando a infecção como zoonose (ANGELAKIS; RAOULT, 2014). Nos felinos a infecção geralmente é assintomática, sendo que a principal espécie, *B. henselae* infecta prioritariamente eritrócitos e células endoteliais, mas pode ser encontrada em outros tecidos e extracelularmente (BRUNT *et al.*, 2006), assim, os gatos acometidos podem ser portadores assintomáticos por meses e até anos (GIL *et al.*, 2013).

O diagnóstico da enfermidade nos gatos ainda é laborioso e não está totalmente padronizado, sendo difícil a comprovação da enfermidade na rotina (BRUNT *et al.*, 2006). Resultando no subdiagnóstico das infecções por *Bartonella*, e poucos relatos na literatura científica, não correspondendo à soroprevalência mundial do agente em populações de cães e gatos (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGÓ, 2018). Assim, as dificuldades de diagnóstico e na identificação da doença, aliada à escassez de relatos por parte da comunidade acadêmica, comprometem a caracterização das condições clínicas e patológicas da enfermidade, bem como, do diagnóstico precoce e instituição de

protocolos terapêuticos mais eficazes para a infecção (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018).

A busca por novos antígenos alvo para o diagnóstico sorológico de infecção por *B. henselae* é, portanto, de considerável interesse, e antígenos projetados de forma criteriosa, como proteínas purificadas, podem incrementar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico. Proteínas quiméricas constituem um grupo de antígenos recombinantes que vem sendo preferidas aos antígenos naturais, e estas quimeras podem mostrar-se mais imunogênicas do que antígenos inteiros (FERRARA *et al.*, 2014).

Nesse contexto, as ferramentas de bioinformática vêm sendo amplamente utilizadas para otimizar o diagnóstico de inúmeras enfermidades. Para a bartonelose, através de análises de imunobioinformática, foram desenvolvidas proteínas quiméricas sintetizadas através da identificação de epítomos antigênicos de *B. henselae*, para uso em pesquisas e desenvolvimento de testes diagnósticos (GONÇALVES *et al.*, 2022). Estas quimeras demonstraram antigenicidade ao reagir com soro de humano naturalmente infectado por *B. henselae*, demonstrando potencial para uso no desenvolvimento biotecnológico de testes de diagnóstico (GONÇALVES *et al.*, 2022).

Desta forma, consideramos que as proteínas recombinantes contendo epítomos antigênicos de *B. henselae*, são promissoras para o desenvolvimento de testes de diagnóstico sorológico de bartonelose em felinos. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o uso de proteínas quiméricas recombinantes sintetizadas a partir de *B. henselae* em ensaio de diagnóstico sorológico tipo ELISA para bartonelose em felinos, a fim de detectar anticorpos anti-*Bartonella*, bem como, identificar pacientes felinos positivos para bartonelose provenientes do ambulatório Ceval e Hospital de Clínicas Veterinária (HCV-UFPel).

2 Revisão da Literatura

2.1. *Bartonella* spp.

O gênero *Bartonella* é responsável pela enfermidade bartonelose, que constitui importante problema no âmbito da Saúde Única, sendo considerada uma enfermidade infecciosa emergente, que requer uma abordagem global para a sua elucidação, prevenção e controle (BREITSCHWERDT, 2017). *Bartonella* é um gênero de Alphaproteobacteria que pertence à família *Bartonellaceae*. São bactérias Gram-negativas, pequenas, ligeiramente curvas, pleomórficas, hemotrópicas, de crescimento lento, e intracelulares facultativas (BRUNT *et al.*, 2006; DENG *et al.*, 2012; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018).

Diversas espécies e subespécies de *Bartonella* já foram identificadas e outras tantas ainda estão em fase de caracterização (DENG *et al.*, 2012; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018). São bactérias adaptadas a diversos hospedeiros, incluindo animais domésticos, silvestres e o homem (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018). *Bartonella* spp. está mundialmente distribuída, com diferentes taxas de prevalência e importância sanitária, de acordo com as espécies predominantes e a localização geográfica afetada (DENG *et al.*, 2012; BREITSCHWERDT, 2017).

As espécies de *Bartonella* são transmitidas aos mamíferos hospedeiros de forma vetorial, por artrópodes sugadores de sangue, devido à sua característica hemotrópica (DENG *et al.*, 2012; GUTIERREZ *et al.*, 2017). Cada espécie de *Bartonella* parasita poucos ou apenas uma espécie de artrópode (DENG *et al.*, 2012), assim como, cada espécie de *Bartonella* elege um único ou poucos mamíferos como reservatórios, onde provocam um processo de bacteremia intra-eritrocitária de longa duração, sendo esta uma peculiaridade da infecção (GUTIERREZ *et al.*, 2017).. Em geral, a bacteremia não provoca danos de forma imediata ao hospedeiro, sendo que as manifestações clínicas agudas geralmente ocorrem apenas em indivíduos imunocomprometidos, ou quando a bactéria é introduzida em um hospedeiro não convencional (GUTIERREZ *et al.*, 2017).

Embora a maioria dos casos sejam auto limitantes ou assintomáticos, *Bartonella spp.* pode causar infecções agudas ou crônicas em animais domésticos, silvestres e humanos, e estas infecções persistentes podem produzir manifestações clínicas diversas, ainda precariamente caracterizadas (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018).

O gênero *Bartonella* infecta uma grande quantidade de tipos celulares, desde eritrócitos e células endoteliais, até células dendríticas e células tronco, e pode alcançar qualquer local no organismo via circulação sanguínea e linfática (GUTIERREZ *et al.*, 2017). Além disso, apresenta singulares estratégias de patogenicidade, como a colonização intracelular não-hemolítica de eritrócitos e a invasão de células endoteliais, facilitando o trânsito na circulação e a evasão da resposta do sistema imune do hospedeiro, permitindo uma eficiente transmissão ao vetor (BREITSCHWERDT, 2017). Estes mecanismos evasivos contribuem para reduzir a eficácia dos antibióticos. Todos estes atributos conferem à *Bartonella spp.* grandes vantagens em relação à patogenicidade, induzindo infecções persistentes e assintomáticas, de grande variabilidade clínica (BREITSCHWERDT, 2017).

Dentre as diferentes espécies do gênero, *B. henselae*, *B. koehlerae* e *B. vinsonii berkhoffii* são as mais frequentemente associadas com enfermidade em humanos, cães e gatos (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018). Através de técnicas de cultura e amplificação de DNA, constatou-se que gatos podem ser infectados por *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. koehlerae*, *B. quintana* e *B. bovis* (BRUNT *et al.*, 2006; BREITSCHWERDT, 2017). Entretanto, dentre as espécies de *Bartonella*, *B. henselae* demonstra grande importância médica, pois pode causar doença grave ao infectar cães e gatos (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018), além de ser a espécie com maior potencial zoonótico (DENG *et al.*, 2012).

B. henselae foi primeiramente isolada de um humano imunocomprometido portador do vírus HIV, e posteriormente, identificada em felinos ao redor do mundo (BREITSCHWERDT, 2017). *B. henselae* é a espécie de *Bartonella* mais comumente encontrada em amostras de sangue de cães e gatos doentes, no entanto, mesmo em fase de bacteremia, não são detectados anticorpos circulantes, o que contribui para a subestimativa da soroprevalência da doença (BREITSCHWERDT, 2017).

2.2 Bartonelose em felinos

Há uma diversidade genética entre os diferentes isolados de *B. henselae* em gatos (BRUNT *et al.*, 2006), sendo que os felinos são os principais reservatórios deste patógeno (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018). *B. henselae* é transmitida aos gatos pela pulga, *Ctenocephalides felis*, responsável pela propagação do agente entre a espécie felina (BREITSCHWERDT, 2017). As fezes de pulgas são a principal fonte de infecção, sendo inoculadas através de arranhadura de gatos contaminados para outros gatos ou, de forma acidental, para os humanos (GIL *et al.*, 2013), denotando potencial risco de infecção, devido ao contato direto entre o homem e os seus animais de estimação (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018).

Os humanos são considerados hospedeiros acidentais, desenvolvendo a chamada Doença da Arranhadura do Gato, evidenciando o caráter zoonótico da doença (GIL *et al.*, 2013; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018). Os felinos jovens, infestados por pulgas, com livre acesso à rua, e que convivem com outros gatos são os mais acometidos (BOULOUIS *et al.*, 2005), entretanto felinos geralmente não desenvolvem sintomas de infecção (DENG *et al.*, 2012) e podem permanecer como portadores assintomáticos por longos períodos (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018). As possíveis vias de transmissão de *Bartonella spp.* aos felinos são a subcutânea, intradermal, intramuscular, intravenosa e oral, porém, a exposição às pulgas *Ctenocephalides felis*, ou às fezes destas pulgas são indubitavelmente a forma de transmissão mais importante (BRUNT *et al.*, 2006).

B. henselae é ingerida por pulgas durante o repasto sanguíneo em felinos, infectando o intestino da pulga, multiplicando-se e mantendo-se ativa em suas fezes por pelo menos nove dias (BRUNT *et al.*, 2006). É importante ressaltar que a transmissão de *B. henselae* através do gato só ocorre na presença de pulgas, portanto, lambeduras, mordeduras ou arranhaduras são improváveis fontes de contágio ao homem e outros animais, a não ser que a saliva ou as unhas do felino estejam contaminadas com fezes de pulga contendo *B. henselae* viáveis (BREITSCHWERDT, 2017).

Usualmente, *B. henselae* e *B. clarridgeiae* são as espécies mais comumente detectadas em infecções de gatos e as taxas de prevalência variam grandemente de acordo com a localização geográfica, dependendo da população avaliada, as evidências sorológicas de exposição ao agente são muito comuns (BOULOUIS *et al.*, 2005). Em áreas endêmicas para infestação por pulgas, as taxas de soroprevalência de *Bartonella* spp. em gatos podem ultrapassar 90%, e os casos de bacteremia são maiores que 50% (BREITSCHWERDT, 2017). Porém, sabe-se que a bacteremia por *Bartonella* é comumente detectada em torno de 20% dos gatos testados (BRUNT *et al.*, 2006). Estudos realizados em vários países nas Américas, Europa, Ásia e Oceania, com diferentes taxas de prevalência, *Bartonella* spp. foi detectada em *C. felis* e infectando gatos através de cultura ou amplificação de DNA por PCR (BOULOUIS *et al.*, 2005; BRUNT *et al.*, 2006).

Há indícios da possível transmissão de *B. henselae* por meio de outras espécies de pulga e não apenas *C. felis*, além de carrapatos, moscas, ácaros e aranhas (BREITSCHWERDT, 2017), havendo relatos da presença de DNA de *Bartonella* spp. em carrapatos e moscas (BRUNT *et al.*, 2006). Porém, o papel destes outros vetores na transmissão do patógeno necessita ser mais bem elucidado (BRUNT *et al.*, 2006). Não ocorre a transmissão de *B. henselae* pelas vias reprodutiva, transplacentária e transmamária (BRUNT *et al.*, 2006).

Sabe-se que as condições climáticas são importantes fatores epidemiológicos para a propagação da doença, visto que o calor e a precipitação são fatores importantes para uma maior exposição dos hospedeiros aos artrópodes, potenciais vetores de *Bartonella* (JAMESON *et al.*, 1995; BRUNT *et al.*, 2006). Assim, a prevalência da doença está relacionada às condições climáticas, ao manejo e controle de ectoparasitas na população felina referida (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018).

O homem adquire a enfermidade através de arranhaduras de gatos contaminados (GIL *et al.*, 2013), visto que o sangue do felino infectado ou fezes de pulgas infectadas por *Bartonella*, podem contaminar as garras do felino, principalmente durante o *grooming*. Ainda, é possível que a infecção ocorra por picadas de pulga ou pelo contato do homem com fezes de pulgas infectadas, através da inoculação em feridas pré-existentes (BRUNT *et al.*, 2006; DENG *et al.*, 2012). Desta forma, há potencial risco de infecção para o homem, devido ao contato direto deste com os animais de estimação com unhas contaminadas (ÁLVAREZ-

FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018), sendo que muitas pessoas com doença causada por *B. henselae* possuem histórico de contato estrito com gatos (BRUNT *et al.*, 2006).

A bartonelose não é considerada uma doença nova, amostras de DNA de *B. henselae* foram amplificadas a partir da polpa dentária de gatos que viveram há mais de 800 anos atrás (VU DANG *et al.*, 2004). Porém, alguns aspectos a tornam uma doença reemergente, principalmente no que tange ao seu aspecto zoonótico, a maior sensibilidade das técnicas de diagnóstico, o aumento de populações de indivíduos imunocomprometidos e a presença de coinfeções, assim como o aumento no deslocamento de hospedeiros infectados, fatores estes que contribuem para a sua evolução (BOULOUIS *et al.*, 2005; BRUNT *et al.*, 2006).

Em muitos aspectos, a epidemiologia da bartonelose é bastante complexa, devido à grande quantidade de espécies e subespécies de *Bartonella*, o amplo espectro de hospedeiros, reservatórios e vetores, e as distintas formas de transmissão do patógeno (BREITSCHWERDT, 2017).

2.3 Patogenia, patologia e sinais clínicos

O potencial patogênico varia entre as diferentes espécies de *Bartonella*, e ainda, entre os genótipos dentro de uma mesma espécie, havendo diferenças também em relação a diferentes isolados, e entre os hospedeiros afetados e o seu status imunológico (BRUNT *et al.*, 2006). As manifestações clínicas associadas à bartonelose são muito variadas, e permanecem ainda pouco caracterizadas em animais domésticos e silvestres (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018).

Bartonella henselae tem comportamento intracelular facultativo, podendo infectar eritrócitos e células endoteliais de seus hospedeiros, e esses processos infecciosos podem durar de poucas semanas até vários anos (GIL *et al.*, 2013; BREITSCHWERDT, 2017). Por tratar-se de um patógeno intracelular de transmissão vetorial altamente adaptado, os fatores que influenciam o surgimento das manifestações clínicas são bastante variáveis, e incluem o grau de virulência entre as espécies e cepas de *Bartonella* spp., o modo de transmissão, a resposta imune do hospedeiro, infecções e doenças concomitantes, imunossupressão e desnutrição

(BREITSCHWERDT, 2017; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018).

Nem sempre a infecção por *Bartonella* spp. resulta em doença clínica, e muitos casos mostram-se assintomáticos e auto limitantes; inclusive, indivíduos soropositivos podem apresentar-se clinicamente saudáveis (BRUNT *et al.*, 2006; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018), assim as infecções por *Bartonella* se manifestam desde a forma subclínica, até a presença de bacteremia.

Após a inoculação inicial, a bactéria penetra a barreira dérmica e se desloca pela corrente sanguínea atingindo diversos sítios, como as células endoteliais, linfonodos, rins, fígado, baço, derme e medula óssea, promovendo diferentes sinais clínicos, que incluem febre intermitente, linfadenomegalia e, inflamação granulomatosa envolvendo órgãos e tecidos o que pode ocasionar encefalite, endocardite, miocardite, poliartrite, neurorretinite, uveíte, paniculite, dermatite e outras manifestações, que são comuns a outras infecções (DENG *et al.*, 2012; BREITSCHWERDT, 2017; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018).

Como *Bartonella* spp. provoca infecção intravascular persistente, é comum a manifestação de patologias vasculares em animais e humanos, e o desenvolvimento de doenças autoimunes ou imunomediadas, como anemias, trombocitopenias, vasculites e glomerulonefrite (BREITSCHWERDT, 2017). Ainda, a infecção persistente por *Bartonella* pode resultar em imunossupressão, predispondo ao surgimento de coinfeções (BREITSCHWERDT, 2017).

Nos felinos acometidos, *B. henselae* infecta eritrócitos e células endoteliais, porém, pode ser encontrada em diversos outros tecidos, inclusive extracelularmente (BRUNT *et al.*, 2006). Os gatos são reservatórios para *B. henselae*, a infecção geralmente é assintomática e estes podem ser portadores subclínicos por meses e até anos. Porém, os efeitos da bacteremia prolongada não estão bem esclarecidos e cepas mais virulentas podem resultar em patogenicidade aumentada (BREITSCHWERDT, 2017). Adicionalmente, vírus imunossupressores como da leucemia felina (FeLV) e da imunodeficiência felina (FIV) podem predispor à infecção por *B. henselae*, com quadros clínicos mais graves (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018).

Em humanos, *B. henselae* causa a Doença da Arranhadura do Gato, uma síndrome que cursa com febre, mal-estar e linfadenopatia (BRUNT *et al.*, 2006). Após a inoculação do agente através da arranhadura do gato, forma-se uma pápula que posteriormente origina uma pústula no sítio de inoculação, em aproximadamente 14 dias. Na sequência, é comum o surgimento de linfadenopatia regional e formação de abscessos (BRUNT *et al.*, 2006). Ainda, outras manifestações clínicas conhecidas são angiomatose bacilar, peliose hepática, endocardite, neurorretinite, encefalopatia e bacteremia (ROLAIN *et al.*, 2004). Casos sem complicações geralmente são autolimitantes; no entanto, quando há envolvimento visceral ou do sistema nervoso central, requerem tratamento com antimicrobianos, e quando não tratados podem ser fatais (ROLAIN *et al.*, 2004).

Devido ao extenso espectro de manifestações clínicas e patológicas associadas a *Bartonella* spp., esta enfermidade deve ser considerada como diagnóstico diferencial em muitos casos, particularmente aqueles com sintomatologia inespecífica, de difícil resolução, com baixa resposta a terapias antimicrobianas, e quando o histórico do paciente é desconhecido (BREITSCHWERDT, 2017).

2.4 Diagnóstico de bartonelose

Apesar de ainda pouco diagnosticada na rotina clínica veterinária (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018), casos de bartonelose vem sendo relatados através de estudos em todo o mundo, sendo que países como Espanha, Itália e Alemanha apresentam alta soroprevalência da doença chegando a 80% (GIL *et al.*, 2013; OTEO *et al.*, 2017; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018), evidenciando a importância da inclusão desta enfermidade nos diagnósticos diferenciais de infecções de cães e gatos.

Entretanto, o diagnóstico de bartonelose permanece um desafio clínico, patológico e microbiológico, principalmente nas infecções crônicas (BREITSCHWERDT, 2017). Ainda não há disponível uma técnica que detecte a presença de infecção, quando se tem um resultado negativo (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018). Até o momento, as técnicas mais utilizadas são ELISA, Western Blot, Imunofluorescência Indireta, PCR, imunohistoquímica, isolamento e cultura microbiológica, porém, todas estas técnicas

apresentam limitações (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018; BREITSCHWERDT, 2017).

No caso dos felinos, o diagnóstico de *Bartonella* pode ainda ser obtido através de cultura de sangue ou tecidos, amplificação de DNA por PCR de tecidos e fluidos, detecção de anticorpos no soro, humor aquoso ou LCR (BRUNT *et al.*, 2006). Devido ao seu hemotropismo, o sangue é a amostra ideal para o diagnóstico de *Bartonella*; no entanto, a bacteremia é intermitente, e baixas concentrações sanguíneas podem resultar em falso negativos (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

Conhecer os métodos moleculares, isolamento e cultura bacteriana é essencial para a correta detecção e caracterização de *Bartonella* spp. (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017). A cultura é considerada o “padrão ouro” para a confirmação da infecção por *Bartonella*, sendo recomendadas técnicas especializadas, incluindo meios de crescimento enriquecidos e cultivo celular (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018). Porém, a técnica requer laboratório especializado, meios de cultura específicos, atmosfera controlada, e o crescimento lento do microrganismo demanda maior tempo para os resultados (BRUNT *et al.*, 2006; GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

Como *Bartonella* é uma bactéria de crescimento lento, uma cultura de sangue ou de biopsia negativa, mesmo após longo período de incubação, não exclui a suspeita de infecção. Segundo a literatura, pode haver gatos soropositivos, porém, com resultado negativo de cultura, que talvez já tenham eliminado a infecção (BRUNT *et al.*, 2006; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018). E ainda, os felinos podem apresentar bacteremia cíclica, não estando a bactéria presente na amostra cultivada (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018).

Outros fatores que podem afetar o resultado da cultura são uma baixa carga bacteriana, acondicionamento e transporte inadequado da amostra, tempo de incubação insuficiente (BRUNT *et al.*, 2006). E ainda assim, mesmo com resultados de cultura positivos para *Bartonella*, este fato não comprova que o gato está clinicamente doente devido à infecção pela bactéria (BRUNT *et al.*, 2006). Assim, apesar do isolamento e cultura de um animal infectado ser o método ideal para o diagnóstico e caracterização de *Bartonella*, esta técnica é laboriosa e lenta e nem sempre resultará no diagnóstico de infecção.

Já os métodos de diagnóstico molecular são mais sensíveis e rápidos. Estudos comparativos demonstraram que PCR *real time* apresenta maior sensibilidade que o isolamento em amostras positivas (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017). A amplificação do DNA de *Bartonella* spp. pode ser obtida através de amostras de sangue ou outros fluidos e tecidos, e vários alvos genéticos são utilizados para a técnica (BRUNT *et al.*, 2006). No entanto, ensaios de PCR são dispendiosos, de difícil padronização, e exigem laboratórios especializados, com rigoroso controle de qualidade, para evitar resultados falso positivos e negativos (BRUNT *et al.*, 2006).

Ainda, estima-se que apenas 5% dos eritrócitos de amostras de sangue de animais positivos estejam infectados (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017). Resultados positivos de PCR indicam a presença de DNA de *Bartonella*, porém, não comprovam que o microrganismo esteja vivo ou ainda, promovendo infecção e doença clínica no felino (BRUNT *et al.*, 2006). Conforme os mesmos autores, os resultados falsos negativos podem ocorrer devido à bacteremia intermitente, falta de DNA microbiano na amostra ou uso prévio de antibióticos. A técnica de PCR convencional possui sensibilidade limitada, o que é atribuído às baixas cargas de *Bartonella* nos hospedeiros, podendo resultar em falso negativo.

Entretanto, as técnicas de PCR *real time* e *nested* PCR são mais sensíveis, aprimorando o diagnóstico de bartonelose (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017). Assim, a recomendação seria o uso de ensaios de PCR *real time* para a triagem inicial da presença da bactéria, seguida por ensaios confirmatórios moleculares visando vários loci de *Bartonella*. As amostras positivas confirmadas por PCR devem ser encaminhadas para cultura e isolamento, que revela a presença de bactérias vivas, permitindo melhor caracterização das espécies (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

Em relação aos testes sorológicos, os anticorpos contra *Bartonella* spp. podem ser identificados através de imunoenaios de IFI, ELISA, *Western Blot* e a maioria destes testes tem como vantagens a rapidez e o menor custo, porém, são de difícil padronização (BRUNT *et al.*, 2006). *Western blotting*, ou *immunoblotting*, é uma técnica de biologia molecular rotineiramente utilizada para análise quantitativa de proteínas de amostras biológicas, além de mensurar seu peso molecular e detecção seletiva de antígenos usando anticorpos (HNASKO; HNASKO, 2015).

No caso da *Bartonella henselae*, anticorpos contra este agente podem ser identificados através de imunoenaios ELISA (BRUNT *et al.*, 2006). Entre os testes sorológicos, Imunofluorescência indireta (IFA) é considerado padrão ouro para

detectar anticorpos contra *B. henselae*, e apresenta boa sensibilidade, porém é laborioso, e ainda, anticorpos contra *B. henselae* comumente apresentam reação cruzada com outras espécies de *Bartonella* e com outras bactérias, como *Rickettsia* spp., *Ehrlichia chaffeensis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Bordetella* e *Borrelia* spp. (FERRARA *et al.*, 2014; JOST *et al.*, 2018). Portanto, um resultado positivo nem sempre consegue confirmar a espécie envolvida (BRUNT *et al.*, 2006).

Assim, o diagnóstico sorológico de bartonelose pelos testes atualmente disponíveis, apresenta problemas em relação à sensibilidade e especificidade, pois os resultados obtidos mostram-se variáveis, o que compromete o controle da doença em felinos e, conseqüentemente, favorece a transmissão desta importante doença ao homem (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018). Torna-se necessária a busca por novos antígenos purificados que possam ser utilizados como ferramentas alternativas para a detecção de anticorpos contra *B. henselae*, principalmente em populações felinas infectadas assintomáticas.

Desta forma, o diagnóstico de bartonelose ainda é laborioso e não está totalmente padronizado, sendo difícil a comprovação da enfermidade em gatos. O aumento de títulos de anticorpos indica apenas infecção, e não doença clínica. Um teste de anticorpos com resultado positivo sugere exposição prévia a *Bartonella*, porém, não evidencia se há infecção em curso; bem como, um teste negativo não exclui infecção. Não foram determinados os valores preditivos, a sensibilidade, a especificidade nem a classe de resposta de anticorpos (IgM ou IgG) em testes de anticorpos para *Bartonella* em felinos (BRUNT *et al.*, 2006).

Assim sendo, recomenda-se que o diagnóstico de bartonelose felina seja realizado através de uma combinação de informações, incluindo a presença de síndrome clínica compatível, exclusão de outras causas, detecção de *Bartonella* spp. através de algum teste diagnóstico (cultura, sorologia ou PCR), e resposta à utilização de tratamento com reconhecida atividade anti-*Bartonella* (BRUNT *et al.*, 2006). Porém, os antibióticos utilizados para o tratamento de bartonelose geralmente têm um amplo espectro, e são eficazes para outros organismos infectantes que causam síndromes semelhantes à bartonelose, tais como *Rickettsia*, *Ehrlichia* e *Mycoplasma*, desta forma, o diagnóstico de bartonelose felina clínica não é definitivo (FERRARA *et al.*, 2014).

Diante do exposto, as infecções causadas por *Bartonella* são subdiagnosticadas, e casos clínicos ainda são pouco relatados na literatura científica, não correspondendo à soroprevalência mundial do agente em populações de cães e gatos (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018). As deficiências na identificação da doença, aliada à escassez de relatos de caso por parte da comunidade médica, comprometem a caracterização das condições clínicas e patológicas da enfermidade, bem como do seu diagnóstico e protocolos de tratamento mais eficazes para a doença (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018).

Na rotina, a bartonelose não é elencada nos diagnósticos diferenciais, ou então, é considerada apenas depois da exclusão de outras tantas doenças (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018). No entanto, é fundamental que o diagnóstico de bartonelose seja confirmado antes do estabelecimento de antibioticoterapia de forma empírica, a fim de evitar o surgimento de resistência (BREITSCHWERDT, 2014). Ainda, tratamentos estabelecidos previamente ao diagnóstico podem interferir nos resultados dos testes sorológicos e moleculares (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018).

Assim, a produção de proteínas recombinantes por clonagem e expressão em sistemas procariotos constitui uma alternativa relevante e efetiva para a obtenção de antígenos altamente purificados para o uso em testes sorológicos, tornando-se uma alternativa para o diagnóstico de bartonelose. Proteínas da membrana externa (OMPs) são uma interface entre a bactéria e as células hospedeiras, podendo ser alvos para o desenvolvimento de testes diagnósticos.

Para *B. henselae*, as proteínas GroEL, 17 kDa, P26, BadA, Pap31, OMP89 e OMP43 são OMPs imunogênicas, o que foi comprovado em estudos científicos diversos, mostrando possuírem relevância no processo infeccioso de *B. henselae* (GONÇALVES *et al.*, 2022). Uma abordagem com grande potencial é a combinação de múltiplos epítomos para formação de quimeras, que tem apresentado sensibilidade e especificidade maiores que 95% nos ensaios de ELISA (FARIA; ANDRADE, 2012).

Na pesquisa de Gonçalves e colaboradores (2022), proteínas quiméricas recombinantes foram construídas através de análises *in silico*, a partir de epítomos imunogênicos de *B. henselae*, e sua antigenicidade foi avaliada em ensaio WB com soro de humanos naturalmente infectados por *B. henselae*, demonstrando que as

quimeras reagiram com anticorpos gerados durante infecção natural. Ainda, identificou-se que os epítomos selecionados tinham 100% de identidade com os antígenos de *B. henselae*. Estes resultados foram promissores, e estas proteínas recombinantes podem ser utilizadas como insumos biotecnológicos para o diagnóstico e controle de bartonelose (GONÇALVES *et al.*, 2022).

2.5 Tratamento

O diagnóstico de bartonelose felina ainda não foi padronizado; conseqüentemente, o tratamento da doença também não. A terapia antimicrobiana é a principal conduta adotada, porém, ainda não há um protocolo terapêutico completamente estabelecido para bartonelose em cães e gatos, e até mesmo em humanos (BRUNT *et al.*, 2006; BREITSCHWERDT, 2014; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018). *Bartonella* spp. mostra-se suscetível a vários antibióticos *in vitro* (ROLAIN *et al.*, 2004; BRUNT *et al.*, 2006), e, as escolhas de fármacos utilizados em animais, foram extrapolados do tratamento de bartonelose em humanos (BRUNT *et al.*, 2006).

A abordagem terapêutica deve ser individualizada, condicionada às manifestações clínicas apresentadas pelo paciente e dos órgãos e tecidos acometidos (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018). Apesar de a antibioticoterapia não erradicar totalmente a infecção em muitos casos (BRUNT *et al.*, 2006), ainda assim os antibióticos são recomendados para o tratamento de felinos doentes, com diagnóstico confirmado e sinais clínicos compatíveis com Bartonelose (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018). Contudo, o uso indiscriminado de antibióticos favorece a resistência bacteriana, sendo sugerido não optar pelo seu uso em gatos infectados por *B. henselae*, porém clinicamente saudáveis, apesar do risco de transmissão zoonótica (BREITSCHWERDT, 2014), excetuando os casos em que o felino conviva com indivíduos imunocomprometidos (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018).

Ainda, outro aspecto importante é que são recomendados longos períodos de tratamento (de 6 semanas a 3 meses), a fim de alcançar a resolução da infecção e evitar a resistência bacteriana a drogas (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018). A cura terapêutica completa

difícilmente é obtida (BREITSCHWERDT, 2014), sendo que o resultado do tratamento antimicrobiano sempre dependerá da patogenicidade do agente e da resposta imune do hospedeiro; e falhas podem estar relacionadas à localização intracelular de *Bartonella* (BRUNT *et al.*, 2006).

Combinações de antibióticos com diferentes mecanismos de ação são desejáveis, sendo necessário atingir altas concentrações plasmáticas e intracelulares para erradicar as infecções por *Bartonella* (BREITSCHWERDT, 2014). Antibióticos como amoxicilina, azitromicina, doxiciclina, enrofloxacina e rifampicina mostraram-se eficazes (BRUNT *et al.*, 2006; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018). Doxiciclina e amoxicilina com clavulanato são antibióticos apropriados como primeira escolha para gatos com bartonelose sem diagnóstico definitivo. Lembrando que, como *Bartonella* é um microrganismo intracelular, é recomendado manter o tratamento pelo tempo recomendado, e pelo menos por mais uma semana após a remissão dos sinais clínicos (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018).

Porém, se os sinais clínicos persistirem, a azitromicina ou outras fluorquinolonas são recomendados (BRUNT *et al.*, 2006). No entanto, os macrolídeos, como a azitromicina, não são recomendados como primeira escolha, devido ao rápido desenvolvimento de resistência entre cepas de *B. henselae*. Uma vez que a resistência se desenvolve, isolados de *B. henselae* serão resistentes a todos fármacos do grupo de macrolídeos (BREITSCHWERDT, 2014).

Para tratamentos prolongados, a associação de doxiciclina e enrofloxacina em cães e doxiciclina e pradofloxacina em gatos mostraram-se eficazes (BREITSCHWERDT, 2014; STEAGALL *et al.*, 2020), sendo a terapia recomendada, por um período adequado de no mínimo de 6 semanas, a fim de eliminar a infecção e prevenir o desenvolvimento de resistência (BREITSCHWERDT, 2014). A sorologia do paciente pós-tratamento e hemocultura devem ser usados para avaliar a resposta terapêutica.

Segundo Brunt *et al.* (2006), devido aos gatos sintomáticos serem provavelmente bacteriêmicos, devem ser adotadas medidas de precaução por parte dos tutores, evitando arranhaduras e mordeduras durante a administração de drogas. Os autores relataram ainda que a duração da bacteremia varia consideravelmente entre os gatos, podendo se estender de semanas até meses, sendo que está relacionada ao status imunológico do hospedeiro, bem como com o genótipo de

Bartonella envolvido na infecção. Ademais, deve haver a erradicação das pulgas nos animais e nos ambientes, em associação ao tratamento com antimicrobianos, sendo esta medida fundamental para evitar a reinfecção.

2.6 Prevenção e controle

Atualmente não existem vacinas disponíveis para prevenção de bartonelose; e no caso da elaboração de um imunizante, ele deveria ser multivalente, abrangendo diferentes espécies e genótipos de *Bartonella*, visto que pode ocorrer infecção simultânea (BRUNT *et al.*, 2006). Tratando-se de uma doença vetorial, o manejo dos vetores ectoparasitas, como pulgas e carrapatos, constitui medida fundamental para o controle da doença (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; BREITSCHWERDT; SOLANO-GALLEGO, 2018). Através do uso de acaricidas, na forma de coleiras, *spot-on*, sprays ou formulações orais, reduzindo assim a disseminação do agente bacteriano entre as populações canina e felina, diminuindo também o risco de transmissão zoonótica. Assim, minimizar a exposição a pulgas e carrapatos constitui uma medida de grande importância veterinária e de saúde pública (BREITSCHWERDT, 2017). Quando rigorosas medidas de controle de ectoparasitas forem instituídas, é possível que a transmissão de espécies de *Bartonella* para os animais e o homem seja consideravelmente reduzida ou até mesmo exterminada (BREITSCHWERDT, 2017).

As recomendações da “*American Association of Feline Practitioners*” para reduzir a probabilidade de contágio de gatos com *Bartonella* spp. são: manter um adequado controle de pulgas continuamente, ter cautela ao adotar gatos de procedência desconhecida, manter os gatos dentro de casa para minimizar a exposição a pulgas e outros possíveis vetores (BRUNT *et al.*, 2006).

Segundo Breitschwerdt (2017), os animais de estimação exercem um papel de sentinelas para a exposição humana a vetores de doenças infecciosas, que podem potencialmente atingir animais e pessoas, logo uma abordagem integrada de saúde única, beneficia de forma mútua a saúde animal e humana. Para o autor, portanto, os médicos veterinários têm uma importante função na saúde única, visto que atuam na prevenção de doenças zoonóticas, por meio da educação e difusão de informações para os tutores de seus pacientes, colegas de profissão, médicos e outros profissionais da área da saúde.

3 Artigo

Proteínas quiméricas recombinantes de *Bartonella henselae* como imunodiagnóstico de bartonelose felina

Bartonella henselae recombinant proteins as an immunodiagnostic test for feline bartonellosis

Helena Piúma Gonçalves; Amilton Clair Pinto Seixas Neto; Sérgio Jorge; Daiane Drawanz Hartwig; Adonai Alvino Pessoa Junior; Matheus Ribeiro da Silva Assis; Elba Regina Sampaio de Lemos; Marlete Brum Cleff

Publicado na Revista Aracê, ISSN: 2358-2472, Volume 6, Número 4, 2024.

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

**PROTEÍNAS QUIMÉRICAS RECOMBINANTES DE *BARTONELLA HENSELAE*
COMO IMUNODIAGNÓSTICO DE BARTONELOSE
FELINA**

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

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

Matheus Ribeiro da Silva Assis

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

Elba Regina Sampaio de Lemos

Laboratório de Hantavírus 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 antígenos específicos pode incrementar a sensibilidade e especificidade desse diagnóstico. Assim, esta pesquisa avaliou a atividade antigênica de proteínas quiméricas recombinantes sintetizadas a partir de epítomos 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-chaves: 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 $\alpha 2$ de proteobactérias, constituído por bacilos intracelulares facultativos, 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 (SimpleVet), 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 epítomos 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 quiméricas 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 antígeno (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 antígenos. Foram utilizados quatro controles negativos: i) apenas as proteínas quiméricas; ii) as proteínas quiméricas e o diluente; iii) as proteínas quiméricas 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 Hantavíroses 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).

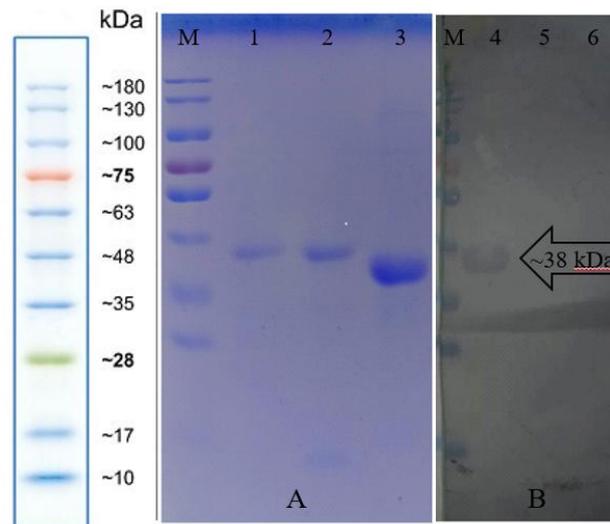


Figura 1. Expressão e antigenicidade das proteínas quiméricas recombinantes rQ1, rQ2 e rQ3. *Obs.:* (A) SDS-PAGE 12% corado com Comassie Blue e (B) *Western blotting* de reconhecimento das quimeras recombinantes pelos anticorpos anti-*Bartonella henselae* presente no soro de felinos naturalmente infectados. 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 epítomos 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).

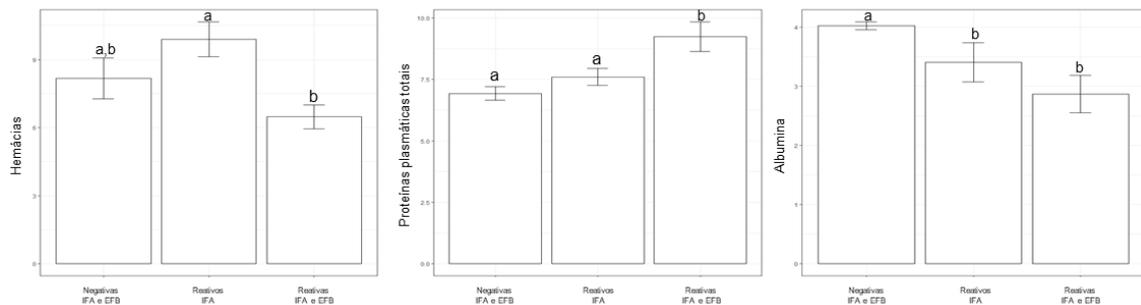


Figura 2. Parâmetros hematológicas e bioquímicos dos felinos analisados para *Bartonella henselae* comparados entre as amostras reativas para o teste ELISA *Feline Bartonella* (EFB) e imunofluorescência indireta (IFA).

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 pudessem estar presentes no soro de felinos naturalmente infectados, em um pool contendo soros de 28 pacientes felinos aleatórios, e somente a proteína 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 epítomos 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 infectados 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 umas 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 prever 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 o 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. Da 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 AÍ, Adelino TÊ, 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, Sarmiento 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/arqvet.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>

4 Considerações Finais

As proteínas recombinantes construídas a partir de epítomos de *B. henselae* mostraram-se promissoras para o diagnóstico de bartonelose, visto que foram capazes de identificar a presença de anticorpos contra a bactéria em soros de felinos infectados e confirmados por imunofluorescência indireta. Ainda, foi possível identificar a presença de infecção por *B. henselae* em felinos provenientes de comunidade em situação de vulnerabilidade social.

O teste EFB proposto neste estudo mostrou-se promissor como uma alternativa para o diagnóstico de bartonelose felina, devendo ser futuramente avaliado em maiores números de felinos, para determinar em quais condições clínicas o teste é capaz de identificar animais realmente infectados, e ser aprimorado como técnica diagnóstica padronizada.

Referências

ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, A., BREITSCHWERDT, E. B., SOLANO-GALLEGO, L. *Bartonella* infections in cats and dogs including zoonotic aspects. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-21, 2018.

ANGELAKIS, E., RAOULT, D. Pathogenicity and treatment of *Bartonella* infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 1, p. 16-25, 2014.

ANSIL, R., MENDENHALL, I., RAMAKRISHNAN, U. High prevalence and diversity of *Bartonella* in small mammals from the biodiverse Western Ghats. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, vol. 15, n. 3, p. e0009178, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009178>. Acesso em: 19 de maio de 2024.

BERNAL, M. K. M., PEREIRA, W. L. A., RIBEIRO, B. C., SARMENTO, V. P., NUNES, H. M. Bartonelose: doença de importância para a saúde pública envolvendo a tríade homem-ambiente-animal. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 26, n. 1, p. 01-24, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.25110/arqvet.v26i1cont-001>. Acesso em 19 de maio de 2024.

BOULOUIS, H. J., CHANG, C. C., HENN, J., KASTEN, R., CHOMEL, B. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. **Veterinary research**, v. 36, n. 3, p. 383-410, 2005.

BREITSCHWERDT E. B. **Treatment of canine and feline bartonellosis**. 2014. Disponível em: https://cvm.ncsu.edu/documents/vector-borne-treatment_bartonellosis/. Acesso em 06 de junho de 2023.

BREITSCHWERDT, E. B. Bartonellosis, One Health and all creatures great and small. **Advances in Veterinary Dermatology**, v. 8, p. 111-121, 2017.

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, n. 4, p. 213-226, 2006.

CAMPBELL, T. W.; TRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2015.

CROWTHER, J. R. **The ELISA guidebook**. Springer Science & Business Media, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-254-4>

DA SILVA, B. T. G., DE SOUZA, A. M., CAMPOS, S. D. E., DE BARROS MACIEIRA, D., DE LEMOS, E. R. S., DE MENDONÇA FAVACHO, A. R., ALMOSNY, N. R. P. *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* infection, hematological changes and associated factors in domestic cats and dogs from an Atlantic rain forest area,

Brazil. **Acta tropica**, v. 193, p. 163-168, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.02.026>. Acesso em 14 de abril de 2023.

DE SOUZA, A. M., DE ALMEIDA, D. N. P., GUTERRES, A., GOMES, R., DE MENDONÇA FAVACHO, A. R., DOS SANTOS MOREIRA, N., ALMOSNY, N. R. P. Bartonelose: análise molecular e sorológica em gatos do Rio de Janeiro - Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 17, n. 1, 2010.

DENG, H., LE RHUN, D., BUFFET, J. P. R., COTTÉ, V., READ, A., BIRTLES, R. J., VAYSSIER-TAUSSAT, M. Strategies of exploitation of mammalian reservoirs by *Bartonella* species. **Veterinary research**, v. 43, n. 1, p. 1-14, 2012.

EYER-SILVA, W. D. A., WUTKE, L. S. C., PAIVA, A. D. C. M., SILVA, G. A. R. D., FERRY, F. R. D. A., SIGNORINI, D. J. H. P., LEMOS, E. R. S. A case of *Bartonella* neuroretinitis with macular star diagnosed by clinical, epidemiological, serological, and molecular data: resolution after initiation of antimicrobial therapy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020.

FAVACHO, A. R., ROGER, I., AKEMI, A. K., PESSOA JR, A. A., VARON, A. G., GOMES, R., LEMOS, E. R. Molecular identification of *Bartonella henselae* in a seronegative cat scratch disease patient with AIDS in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, vol. 56, n. 4, p. 363-365, 2014.

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. **Letters in Applied Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 253-262, 2014.

GONÇALVES, J. M., CARDOSO, T. L., DE FREITAS, S. B., WOLOSKI, R., NETO, A. C. P. S., DA SILVA PINTO, L., HARTWIG, D. D. *In silico* analyses and design of chimeric proteins containing epitopes of *Bartonella henselae* antigens for the control of cat scratch disease. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 24, p. 8079-8091, 2022.

GIL, H., ESCUDERO, R., PONS, I., RODRIGUEZ-VARGAS, M., GARCIA-ESTEBAN, C., RODRIGUEZ-MORENO, I., ANDA, P. Distribution of *Bartonella henselae* variants in patients, reservoir hosts and vectors in Spain. **Plos One**, v. 8, p. 1-10, 2013.

GUTIÉRREZ, R., VAYSSIER-TAUSSAT, M., BUFFET, J. P., HARRUS, S. Guidelines for the isolation, molecular detection, and characterization of *Bartonella* species. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 1, p. 42-50, 2017.

HNASKO, T. S.; HNASKO, R. M. The western blot. **ELISA: Methods and Protocols**. p. 87-96, 2015.

JAMESON, P., GREENE, C., REGNERY, R., DRYDEN, M., MARKS, A., BROWN, J., GREENE, R. Prevalence of *Bartonella henselae* antibodies in pet cats throughout

regions of North America. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 4, p. 1145-1149, 1995.

JOST, M., LATZ, A., BALLHORN, W., KEMPF, V. A. 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 12, p. e01329-18, 2018.

KITADA, A. A., FAVACHO, A. R., OLIVEIRA, R. V., PESSOA JR, A. A., GOMES, R., HONSE, C. O., 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**, v. 14, p. 1-4, 2013.

LAMAS, C. C., MARES-GUIA, M. A., ROZENTAL, T., MOREIRA, N., FAVACHO, A. R., BARREIRA, J., DE LEMOS, E. R. *Bartonella* spp. infection in HIV positive individuals, their pets and ectoparasites in Rio de Janeiro, Brazil: serological and molecular study. **Acta tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 137-141, 2010.

LIN, ALICE V. Indirect elisa. **ELISA: methods and protocols**, Humana Press, New York, 2015, p. 51-59. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_5. Acesso em 09 de junho de 2023.

MEURER, I. R., SILVA, M. R., SILVA, M. V. F., DE LIMA DURÉ, A. Í., ADELINO, T. É., COSTA, A. V., DO AMARAL CORRÊA, J. O. Sensibilidade e especificidade do método de elisa para detecção de anticorpos anti-*coxiella burnetii* frente ao método padrão ouro de diagnóstico, a imunofluorescência indireta. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 2021, vol. 25, p. 101420. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.101420>. Acesso em 03 de junho de 2023.

OIE - Organização Mundial de Saúde Animal - World Organization for Animal Health, 2008. **Contributing to One World, One Health**. A Strategic Framework for Reducing Risks of Infectious Diseases at the Animal-Human-Ecosystems Interface. Consultation Document. Paris, France, 2008.

OTEO, J. A., MAGGI, R., PORTILLO, A., BRADLEY, J., GARCÍA-ÁLVAREZ, L., SAN-MARTÍN, M., BREITSCHWERDT, E. Prevalence of *Bartonella* spp. by culture, PCR and serology, in veterinary personnel from Spain. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2017.

R CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2022. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

RAIMUNDO, J. M., GUIMARÃES, A., AMARO, G. M., DA SILVA, A. T., BOTELHO, C. F., MASSARD, C. L., BALDANI, C. D. Molecular survey of *Bartonella* species in shelter cats in Rio de Janeiro: Clinical, Hematological, and Risk Factors. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 6, p. 1321, 2019.

RAIMUNDO, J. M., GUIMARÃES, A., AMARO, G. M., SILVA, A. T. D., RODRIGUES, C. J. B. C., SANTOS, H. A., BALDANI, C. D. Prevalence of *Bartonella* species in shelter cats and their ectoparasites in southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 31, 2022.

ROLAIN, J. M., BROUQUI, P., KOEHLER, J. E., MAGUINA, C., DOLAN, M. J., RAOULT, D. Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 1921-1933, 2004.

SAYED, A. S., ALSAADAWY, R. M., ALI, M. M., ABD EL-HAMID, R. F., BATY, R. S. ELMAHALLAWY, E. K. Serological and Molecular Detection of *Bartonella henselae* in Cats and Humans from Egypt: Current Status and Zoonotic Implications. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 859104, 2022.

SOUZA, A. M., ALMOSNY, N. R. P., FAVACHO, A. R. M., ALMEIDA, D. N. P., FERREIRA, R. F., FERREIRA, E. O., LEMOS, E. R. S. *Bartonella* spp. and hematological changes in privately owned domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil: *Bartonella* spp. in cats from Rio de Janeiro. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 11, n. 08, p. 591-596, 2017.

STEAGALL, P. V., PELLIGAND, L., PAGE, S. W., BOURGEOIS, M., WEESE, S., MANIGOT, G., GUARDABASSI, L. The World Small Animal Veterinary Association (WSAVA): List of Essential Medicines for Cats and Dogs. **The Journal of Small Animal practice**, v. 61, n. 9, p. E162-E176, 2020.

THRALL, M.A., WEISER, G., ALLISON, R.W., CAMPBELL, T.W. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca; 2015. 688 p.

VU DANG, L., CLAVEL, B., LEPETZ, S., ABOUDHARAM, G., RAOULT, D., DRANCOURT, M. Molecular detection of *Bartonella henselae* DNA in the dental pulp of 800-year-old French cats. **Clinical infectious diseases**, v. 39, n. 9, p. 1391-1394, 2004.