

AVALIAÇÃO DA ANTIGENICIDADE DE TRÊS QUIMERAS RECOMBINANTES DE *B. henselae*

THAYNÁ LANER CARDOSO; STELLA BUCHHORN DE FREITAS²;AMILTON CLAIR PINTO SEIXAS NETO³; DAIANE DRAWANZ HARTWIG⁴; MARTA GONÇALVES AMARAL⁵.

¹Universidade Federal de Pelotas– nanalaner@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – stellafreiitas@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – amiltonseixas@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas - martagamaral@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Bartonella spp. são bactérias em formato de cocobacilo, gram-negativas, intracelulares facultativas, aeróbicas e oxidase negativas, possuem crescimento lento, sendo os únicos bacilos gram-negativos relatados como capazes de viver dentro dos eritrócitos (GARY, 1990; REGIER; ÓROURKE; KEMPF, 2016; VIEIRADAMIANI *et al.*, 2015). *Bartonella henselae* é a espécie de maior importância clínica dentro do gênero, pois infecta tanto animais quanto humanos, sendo o agente etiológico da Doença da Arranhadura do Gato (*Cat Scratch Disease* - CSD). (BREITSCHWERDT, 2017; KSIAA *et al.*, 2019). A transmissão para humanos ocorre principalmente da arranhadura do gato, sendo os humanos hospedeiros acidentais e os felinos os hospedeiros definitivos (IANNINO *et al.*, 2018; MALHEIROS *et al.*, 2016).

A CSD é uma zoonose de distribuição mundial, mais frequente em locais de clima quente e úmido (CAMARGO *et al.*, 2009; OLSEN, 1999). É uma infecção frequentemente autolimitante em indivíduos imunocompetentes, porém, pode ser fatal em indivíduos imunocomprometidos (VIEIRADAMIANI *et al.*, 2015). No Brasil, há poucos relatos de casos, isso se deve a exclusão da CSD no diagnóstico diferencial de várias síndromes clínicas e também pela não inclusão no quadro de doença de notificação compulsória (ARAGÃO *et al.*, 2010; NOVAIS *et al.*, 2017).

O diagnóstico preciso da CSD é um desafio, visto que os sintomas da doença se assemelham com os de outras doenças, dificultando o diagnóstico clínico e, principalmente, por não existir um método “padrão ouro” (EDUARDO *et al.*, 2006; PINZÓN, 2020). Não há vacinas disponíveis para o controle da doença, tanto para os animais quanto para os humanos. Assim, estudos nessa área são muito promissores, visto que há poucas pesquisas publicadas sobre o assunto, e o desenvolvimento de uma vacina eficaz para os felinos seria um grande avanço para o controle da doença (CAMARGO *et al.*, 2009; OLSEN, 1999).

Atualmente, estudos tem sido publicados com o uso de proteínas recombinantes, principalmente envolvendo as proteínas GroEL e 17kDa (FERRARA *et al.*, 2014), Pap31 (ANGKASEKWINA *et al.*, 2014) e P26 (WERNER *et al.*, 2008). Diante disso, o presente estudo avaliou a antigenicidade de três quimeras recombinantes, contendo epítopos antigênicos de *B. henselae*. Esses resultados serão utilizados para análises posteriores dependentes.

2. METODOLOGIA

2.1. Produção e expressão das quimeras recombinantes: a construção e produção das três quimeras recombinantes, chamadas rQ1, rQ2 e rQ3, foram descritas anteriormente (GONÇALVES, 2020) e protegida sob o depósito de patente BR 10 2019 027574 0 A2 (HARTWIG; GONÇALVES; FREITAS, 2020).



2.2. Soros Humanos: Os soros utilizados nesse trabalho foram cedidos pelo Laboratório de Hantaviroses e Rickettsioses (LHR) da Fundação Oswaldo Cruz (FIO-CRUZ, RJ, Brasil). Ao total foram utilizados 13 soros humanos verdadeiramente positivos para *B.henselae*, previamente testados pela técnica de reação de imuno-fluorescência indireta RIFI/IgG. Todos os soros eram de fase convalescentes e com diferentes titulações (entre 64 e 8.192).

2.3. ELISA indireto: Para o ELISA, três placas de fundo chato foram sensibilizadas, uma para cada proteína químéricas (rQ1, rQ2 e rQ3). Foram adicionadas 50 ng de cada quimera por poço (100 µl, pH 9,6). Após, as placas foram incubadas à 4°C por 16-18 horas (*overnight*). Ao final da incubação, as cavidades foram bloqueadas com solução PBS-T/BSA [PBS 1X acrescido de 0,05% (v/v) de Tween 20 e 1% (w/v) de albumina sérica bovina] por 1 hora. Posteriormente, os soros foram diluídos em PBS-T 1X (pH 7,4) na proporção 1:100 e adicionados aos poços, sendo as placas mantidas à 37°C por 1 hora. Anticorpos anti-IgG de humanos conjugados a peroxidase (Sigma-Aldrich, USA) foram adicionados em uma diluição 1:10.000. As placas foram mantidas à 37°C por 1h. A visualização do resultado ocorreu através da adição de tampão fosfato-citrato (pH 5,3) acrescido de 0,2 mg/mL de *o-phenylenediamine dihydrochloride* (OPD) e 0,03% de H₂O₂. Uma solução 2M H₂SO₄ foi utilizada parar interromper a reação. A quantificação da reação foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 492 nm. Entre cada uma das etapas descritas do ELISA, as placas foram lavadas quatro vezes com solução PBS-T (PBS acrescido de 0,05% de Tween 20). Como controle positivo, foi utilizado um pool de soros humanos positivos para *B. henselae*, e como controle negativo, soro de felino negativo para *B. henselae*. Os testes foram repetidos duas vezes, em dias diferentes e em duplicata. Os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism versão 6.01 (GraphPad Inc., San Diego, CA, EUA) por ANOVA de duas vias e teste de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da antigenicidade de proteínas químéricas recombinantes é uma etapa essencial para o desenvolvimento de vacinas eficazes, pois avalia a condição e a qualidade do antígeno, o qual será responsável por estimular a resposta imunológica, especialmente humoral, com a produção de anticorpos (CHENOWETH *et al.*, 2004).

Dos 13 soros positivos avaliados, 10 (76,9%) apresentaram reação significativa ($P < 0,05$) com a rQ1, 11 (90,9%) com a rQ2 e 4 (30,8%) com a rQ3, quando comparadas ao controle negativo. Desse modo, observamos que todas as quimeras reagiram com os anticorpos presentes nos soros positivos, duas em maior proporção, como a rQ1 e rQ2 e a rQ3, em menor proporção. Isto indica que os抗ígenos presentes na construção dessas quimeras são reconhecidos pelos anticorpos produzidos durante a infecção natural *in vivo* por *B.henselae*.

Tabela 1: Reação de soros humanos positivos para *Bartonella* spp., confirmados pela técnica RIFI, com as quimeras recombinantes.

SOROS	QUIMERA 1[§]	QUIMERA 2[§]	QUIMERA 3[§]
1	0,336±0,036*	0,255±0,049*	0,257±0,005*
2	0,073±0,010	0,092±0,013	0,116±0,013
3	0,162±0,035*	0,144±0,001*	0,086±0,013
4	0,285±0,002*	0,153±0,010*	0,189±0,035*
5	0,260±0,013*	0,245±0,024*	0,261±0,011*
6	0,168±0,024*	0,168±0,024*	0,130±0,057*

SOROS	Quimera 1[§]	Quimera 2[§]	Quimera 3[§]
7	0,148±0,025*	0,153±0,001*	0,110±0,069
8	0,144±0,008*	0,097±0,054	0,103±0,002
9	0,162±0,027*	0,164±0,006*	0,087±0,016
10	0,188±0,009*	0,179±0,025*	0,120±0,001
11	0,154±0,006*	0,149±0,013*	0,107±0,003
12	0,104±0,003	0,126±0,004*	0,120±0,014
13	0,115±0,043	0,119±0,004*	0,119±0,062
SORO POSITIVO	0,347±0,010*	0,218±0,040*	0,216±0,039*
SORO NEGATIVO	0,039±0,006	0,034±0,006	0,042±0,008

§ Resultados representam a média ± o desvio padrão de dois ensaios independentes.

* Diferenças significativas em comparação ao soro negativo, *P<0,05.

As quimeras recombinantes avaliadas, contêm os epítopos imunogênicos das proteínas GroEL, 17 kDa, P26 BadA, Pap31, OMP89 e OMP43 de *B.henselae*. Uma das quimeras avaliadas neste estudo (rQ3), apresentou reação significativa com um pequeno número de soros positivos. LOA *et al.*, (2006), apresentou resultados semelhantes quando avaliou antigenicidade da proteína recombinante 17 kDa, pois a proteína foi reativa com soros de humanos positivos para *B. henselae*, mas algumas amostras de soros também não reagiram ou reagiram fracamente com a proteína. Alguns fatores podem explicar essa situação, como por exemplo, a seleção dos epítopos na construção das proteínas quiméricas, de modo que, esses epítopos não foram totalmente reconhecidos pelos anticorpos presentes nos soros avaliados.

4. CONCLUSÕES

As três quimeras recombinantes com抗ígenos de *B. henselae* são antigênicas e foram reconhecidas pelos anticorpos presentes no soro de humanos naturalmente infectados por *B. henselae*. Estudos com essas quimeras se demonstraram muito promissores, de modo que, esse trabalho faz parte de um projeto com o intuito de produzir anticorpos policlonais para o controle da CSD.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGKASEKWINAI, Nasikarn *et al.* An evaluation study of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) using recombinant protein Pap31 for detection of antibody against *Bartonella bacilliformis* infection among the Peruvian population. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 4, p. 690–696, 2014.
- ARAGÃO, Ricardo Evangelista Marrocos de *et al.* Optic neuropathy secondary to cat scratch disease: case report. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 73, n. 6, p. 537–538, 2010.
- BREITSCHWERDT, Edward B. Bartonellosis, One Health and all creatures great and small. **Veterinary Dermatology**, v. 28, n. 1, p. 96-e21, 2017.
- CAMARGO, Mario E. *et al.* Immunogenicity of *Bartonella henselae* P26 in cats. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2–4, p. 333–346, 2009.
- CHENOWETH, Matthew R. *et al.* Predominant outer membrane antigens of *Bartonella henselae*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 6, p. 3097–3105, 2004.
- EDUARDO, Paulo *et al.* Case Report Diagnosis of *Bartonella spp.* infection : study of a bacillary um caso de angioma bacilar *. v. 81, n. 4, p. 349–353,

- 2006.
- FERRARA, F. et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Bartonella henselae* infection detection. **Letters in Applied Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 253–262, 2014.
- GARY, P.H.; Joseph B.M.; Susan C.T. et al. **The New English Journal of medicine**, v. 323, n. 16, p. 1120–1123, 1990.
- GONÇALVES, Jêniher Malheiros. **Construção de quimeras recombinantes contendo antígenos de Bartonella henselae**. Jêniher Malheiros Gonçalves. 2020. 98 f. - Universidade Federal de Pelotas, 2020.
- HARTWIG, Daiane Drawanz; GONÇALVES, Jêniher Malheiros; FREITAS, Stella Buchhorn de. **Proteínas quiméricas recombinantes contendo antígenos de Bartonella henselae**. BR 10 2019 027574 0 A2. Concessão: 2020.
- IANNINO, Filomena et al. *Bartonella* infections in humans dogs and cats. **Veterinaria Italiana**, v. 54, n. 1, p. 63–72, 2018.
- KSIAA, Imen et al. Update on *Bartonella* neuroretinitis. **Journal of Current Ophthalmology**, v. 31, n. 3, p. 254–261, 2019.
- LOA, Chien Chang et al. Production of recombinant *Bartonella henselae* 17-kDa protein for antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 55, n. 1, p. 1–7, 2006.
- MALHEIROS, J. et al. Identification of vector-borne pathogens in dogs and cats from Southern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 5, p. 893–900, 2016.
- NOVAIS, Dayane Goto et al. Doença da arranhadura do gato (DAG) e a importância de um diagnóstico preciso: relato de caso clínico. **Archives of Health Investigation**, v. 6, n. 5, p. 222–224, 2017.
- OLSEN, Christopher W. Vaccination of cats against emerging and reemerging zoonotic pathogens. **Advances in Veterinary Medicine**, v. 41, n. C, p. 333–346, 1999.
- PINZÓN, Jairo Hernández. Neuroretinitis caused by *Bartonella henselae*, 2020.
- REGIER, Yvonne; ÓROURKE, Fiona; KEMPF, Volkhard A.J. *Bartonella spp.* - A chance to establish One Health concepts in veterinary and human medicine. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2016.
- VIEIRA-DAMIANI, Gislaine et al. *Bartonella claridgeiae* bacteremia detected in an asymptomatic blood donor. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 352–356, 2015.
- WERNER, Jonathan A et al. Infection in Cats. v. 58, n. 4, p. 375–380, 2008.