

EFICÁCIA DA VACINAÇÃO PARA *THEILERIA EQUI* COM PROTEÍNA EMA-2 RECOMBINANTE EM ÉGUAS PRENHES NO TERÇO FINAL DE GESTAÇÃO – DADOS PRELIMINARES

ALICE CORREA SANTOS¹; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE²; GUILHERME BORGES WEEGE²; ANA MUÑOZ VIANNA²; LUZIA LEON COELHO LEAL²; CARLOS EDUARDO WAYNE NOGUEIRA³

¹Universidade Federal de Pelotas – alice.cs@live.com

²Universidade Federal de Pelotas – fabio@leivasleite.com.br; gweege@gmail.com; a.munozvianna@gmail.com; luzialcleal@hotmail.com;

³Universidade Federal de Pelotas – cewn@terra.com.br

1. INTRODUÇÃO

Theileria equi é um protozoário hemoparasita, que juntamente com *Babesia caballi* são causadores da piroplasmose equina, doença de impacto epidemiológico internacional, endêmica em áreas tropicais e subtropicais. Diferentemente da *B. caballi*, que infecta apenas eritrócitos, *T. equi* apresenta uma fase intraeritrocitária e uma fase extraeritrocitária, tornando o equino portador pelo resto da vida (WISE et al, 2014). No Rio Grande do Sul (RS), *T. equi* é endêmica na população equina, por esse motivo seu controle é extremamente importante, embora não haja monitoramento efetivo da doença (NIZOLI et al, 2008). Pela característica de manter animais portadores assintomáticos na população, a profilaxia é fundamental para a manutenção do Estado (RS) e do Brasil no mercado equestre internacional.

As formas clássicas de transmissão são por carrapatos ixodídeos e via iatrogênica. A transmissão transplacentária de *T. equi* tem sido descrita nos últimos anos (ALLSOOP et al, 2007), porém o mecanismo específico ainda não foi comprovado (WISE et al, 2014). Esta pode cursar com aborto, nascimento de um natimorto, ou nascimento de um potro que manifeste os sinais clínicos da doença nos primeiros dias de vida (WISE et al, 2014). Medidas efetivas para prevenir a infecção transplacentária ainda não foram descritas (ROTHSCHILD, 2013).

Tendo em vista os danos causados na égua e principalmente no potro neonato infectados por *T. equi*, a imunização de éguas prenhes é uma alternativa que poderia fortalecer a imunidade materna e possivelmente transmitir anticorpos via imunidade passiva ao potro. O objetivo deste estudo é avaliar a resposta imunológica de éguas prenhes vacinadas com a proteína EMA-2 recombinante e a concentração de anticorpos obtida no colostro.

2. METODOLOGIA

Para obtenção da proteína de superfície da *T. equi* EMA-2 recombinante (rEMA-2), utilizou-se clonagem e expressão da mesma na levedura *Pichia pastoris* (VIANNA et al., 2014). Para a produção da vacina, proteína rEMA-2 foi utilizada na concentração de 200µg por dose da vacina (2ml). Como adjuvante utilizou-se Hidróxido de Alumínio a 10% acrescido de PBS 1X estéril até o volume de 2ml. Todo o preparo foi realizado em fluxo laminar com controle de pH (7,0) e controle bacteriológico em ágar sangue.

Foram utilizadas nove éguas prenhes pertencentes ao CEEEP UFPel (Centro de Estudo, Ensino e Experimentação da Palma), alojadas em piquetes com pastagem cultivada de azevém (*Lolium multiflorum*) com água *ad libitum*. A partir dos 300 dias de gestação iniciou-se o esquema vacinal, com três doses via intramuscular, em intervalos de 21 dias, e coletas de soro sanguíneo semanais. O parto foi assistido e com mínima intervenção em todas as éguas. Antes da

primeira mamada do potro, foram coletados 2ml de colostro, que foi acondicionado a -20°C para posterior análise (Comitê de Ética e Experimentação Animal nº 8247).

No processamento das amostras, a técnica para detecção de anticorpos foi ELISA indireto, utilizando como antígeno a proteína rEMA-2, conforme descrito por VIANNA et al (2014). Os testes foram realizados com soros e colostros maternos.

Os dados foram submetidos à estatística descritiva de cada coleta e ao teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade. Como as variáveis eram paramétricas, foram avaliadas por análise de variância e comparação entre as médias pelo teste Tukey, através do software Statistix 8.0® (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA). A significância foi atribuída aos valores de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que a vacina utilizada apresentou soroconversão satisfatória para *T. equi*. As médias e desvio padrão das leituras em densidade óptica no soro das éguas avaliadas semanalmente estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Médias e desvio padrão das leituras em densidade óptica (492nm) da soroconversão de anticorpos para *T. equi* semanalmente

	Média da leitura em densidade óptica
Semana 1	$0.3512 \pm 0.09^{\text{d}}$
Semana 2	$0.4164 \pm 0.10^{\text{cd}}$
Semana 3	$0.6132 \pm 0.18^{\text{abc}}$
Semana 4	$0.5082 \pm 0.10^{\text{bcd}}$
Semana 5	$0.7328 \pm 0.18^{\text{ab}}$
Semana 6	$0.7283 \pm 0.23^{\text{ab}}$
Semana 7	$0.6685 \pm 0.25^{\text{abc}}$
Semana 8	$0.8097 \pm 0.16^{\text{a}}$
Semana 9	$0.8118 \pm 0.16^{\text{a}}$

^{a,b,c,d} Letras diferentes nas linhas representam significância estatística entre as coletas semanais, $p < 0,001$.

A diferença observada ao longo das semanas na Tabela 1 é discreta, contudo indica que a partir da 3ª semana houve incremento na leitura em relação ao estado imunológico inicial, e na 5ª semana a leitura duplica em relação ao estado inicial e se mantém elevada até a última semana. O parto ocorreu em média $31,55 \pm 5,93$ dias após a vacinação, coincidindo com o decréscimo na leitura de anticorpos por volta da 4ª semana, que decorre da mobilização de anticorpos para o colostro no periparto. O colostro pré-mamada avaliado em nosso estudo teve média de leitura em densidade óptica de $1,043 \pm 0,34$.

A Figura 1 demonstra graficamente as médias de leitura da soroconversão para *T. equi* no ELISA. As setas na coleta 1, coleta 4 e coleta 7 indicam os momentos em que os animais foram vacinados.

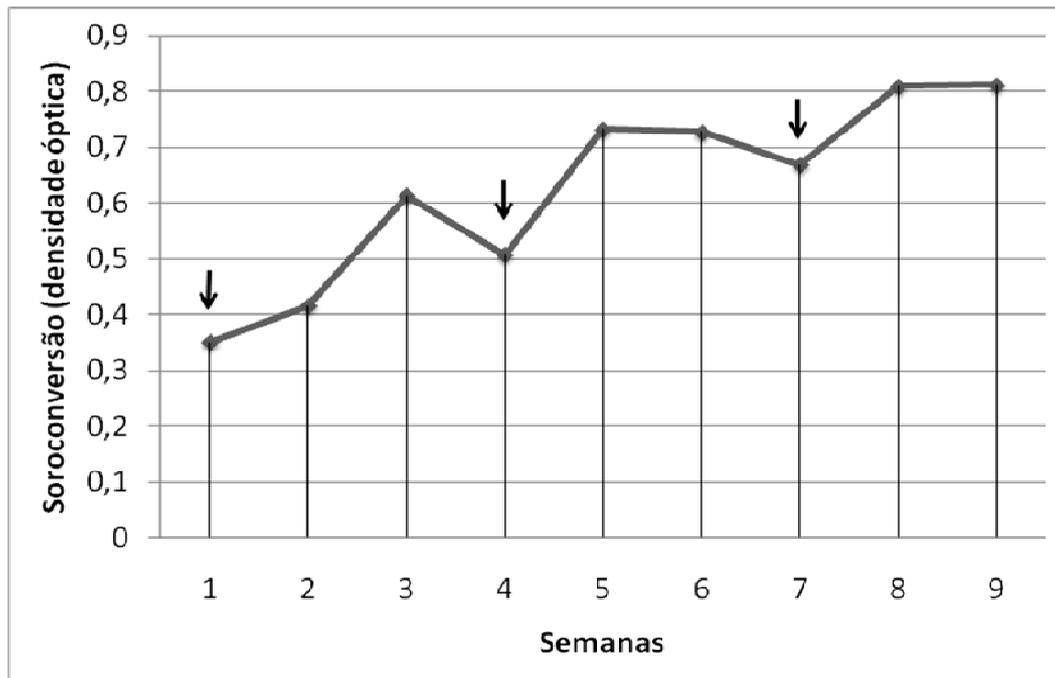


Figura 1 - Médias de absorvância na leitura em 492nm, indicando a soroconversão de anticorpos para *T. equi* semanalmente. As setas indicam os momentos de vacinação.

Observa-se na Figura 1 que ocorreu soroconversão (média de 48% de aumento percentual) após a 2ª e 3ª doses de vacina, e um platô entre as semanas 8 e 9, indicando estabilização da quantidade de anticorpos circulante. Relacionando o estado imunológico inicial com a leitura após o término do esquema vacinal, houve incremento percentual de 131,15%, resultado que indica uma soroconversão significativa de anticorpos frente a vacina.

A vacina recombinante para *T. equi* foi capaz de produzir anticorpos contra a proteína de superfície EMA-2, e conseqüentemente ao agente. Tanto a EMA-1 quanto a EMA-2 exercem importante papel na aderência e penetração de *T. equi* nos eritrócitos do hospedeiro, e são expressas em diferentes estágios do ciclo do parasita (KUMAR et al, 2013). Contudo, a EMA-2 é liberada no citoplasma e membrana do eritrocito, sendo o primeiro antígeno a ser reconhecido pelo sistema imune (KUMAR et al, 2013), e por esse motivo foi utilizada em nosso estudo como antígeno vacinal.

A gestação é um evento capaz de alterar a resposta imunológica frente a patógenos, em razão da diminuição da imunidade celular (NORONHA & ANTCZAK, 2010). Em mulheres nota-se uma susceptibilidade maior a microorganismos como *Listeria* e *Toxoplasma* (AVELINO et al, 2003), enquanto éguas tornam-se mais vulneráveis a patógenos que cursem com infecções abortivas (LUNN et al, 2009). Os abortos por *T. equi* ocorrem no final da gestação (LEWIS et al, 1999), por isso o esquema vacinal avaliado iniciou aos 300 dias de gestação, buscando imunizar a égua num período crítico e concentrar anticorpos vacinais no colostro.

A leitura de anticorpos (média de $1,043 \pm 0,34$) no colostro foi satisfatória comparada a quantidade circulante na égua, o que indica que houve a concentração efetiva a ser fornecida ao neonato. Isto é importante porque a imunidade humoral do potro depende da absorção via colostro de anticorpos pré-formados pela mãe. O colostro equino é composto predominantemente de IgG, que representa as experiências imunológicas da mãe, levando a uma leve imunossupressão durante sua concentração na glandula mamária (TIZARD,

2009). Em nosso estudo, observamos que no período coincidente com o periparto ocorreu a diminuição na quantidade de anticorpos vacinais, decorrente da mobilização sistêmica para a formação do colostro.

4. CONCLUSÕES

A vacinação de éguas prenhes com a proteína EMA-2 recombinante teve soroconversão positiva contra *T. equi* e concentração satisfatória no colostro, demonstrando ser uma alternativa promissora como profilaxia da doença.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WISE, L.N.; PELZEL-MCCLUSKEY, A.M.; MEALEY, R.H.; KNOWLES, D.P. Equine piroplasmiasis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. v.30, p. 677-693, 2014.
2. NIZOLI, L.Q.; GOTZE, M.M.; FÉLIX, S. R.; SILVA, S.S.; NOGUEIRA, C.E.W. Frequency of seropositive equines for *Theileria equi* in the Southern Rio Grande do Sul State, Brazil. **Parasitologia Latinoamericana**. v.63, p. 46-50, 2008.
3. ALLSOPP, M.T.E.P.; LEWIS, B.D.; PENZHORN, B.L. Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. **Veterinary Parasitology**. v.148, p. 130-136, 2007.
4. ROTHSCHILD, C. M. Equine piroplasmiasis. **Journal of Equine Veterinary Science**. v.33, p.497-508, 2013.
5. VIANNA, A. M.; GONÇALES, R.A.; DE LARA, A.P.S.S.; PINTO, L.S.; NIZOLI, L.Q.; LEITE, F.P.L. Expressão heteróloga da EMA-2 (*equi merozoite antigen*) de *Theileria equi* em *Pichia pastoris* com potencial utilização em imunobiológicos. **Ciência Rural**. v. 44, n.10, p. 1830 - 1836, 2014.
6. KUMAR, S.; KUMAR, R.; GUPTA, A.K.; YADAV, S.C.; GOYAL, S.K.; KHURANA, S.K.; SINGH, R.K.. Development of EMA-2 recombinant antigen based enzyme-linked immunosorbent assay for seroprevalence studies of *Theileria equi* infection in Indian equine population. **Veterinary Parasitology**, v.198, p.10-17, 2013.
7. NORONHA, L. E. & ANTCZAK, D. F. Maternal immune responses to trophoblast: the contribution of the horse to pregnancy immunology. **American Journal of Reproductive Immunology**. v.64, p.231-244, 2010.
8. AVELINO, M.M.; CAMPOS JR, D.; DO CARMO, B.P.R.; DE CASTRO, A.M. Pregnancy as a risk factor for acute toxoplasmosis seroconversion. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproduction Biology**. v.108, p.19-24, 2003.
9. LUNN, D.P.; DAVIS-POYNTER, N.; FLAMINIO, M.J.; HOROHOV, D.W.; OSTERRIEDER, K.; PUSTERLA, N.; TOWNSEND, H.G. Equine herpesvirus-1 consensus statement. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p.450-461, 2009.
10. LEWIS B. D.; PENZHORN, B.L.; VOLKMANN, D. Could treatment of pregnant mares prevent abortions due to equine piroplasmiasis? **Journal of the South African Veterinary Association**. v.70, p.90-91, 1999.
11. TIZARD, Ian R. **Imunologia Veterinária 9. ed.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.