

Uso do “Cell ELISA” como ferramenta clínica auxiliar para avaliação de potros vacinados no controle da Adenite Equina

**MÜLLER, Vitória¹; SCHMITH, Rubia Alves¹; FINGER, Ilusca Sampaio²;
RIBAS, Leandro do Monte³; LEIVAS LEITE, Fabio Pereira⁴; NOGUEIRA,
Carlos Eduardo Wayne⁴**

¹Acadêmica em Medicina Veterinária/FV/UFPel,²Mestranda em Medicina Veterinária /FV/UFPel;³Prof. MsC Universidade da Região da Campanha; ⁴Prof. Dr. Faculdade de Veterinária-UFPel.

*Campus Universitário/nº-Caixa Postal 354 CEP 96010-900.
mullervitoria@hotmail.com*

1. INTRODUÇÃO

Dentre as várias afecções respiratórias que acometem os equinos, a Adenite Equina tem destaque pela elevada morbidade. (WHELCHER & CHAFFIN, 2009). Entretanto, as vacinas disponíveis são pouco eficientes, já que apenas 50% dos animais vacinados adquirem proteção satisfatória (JACOBS et al., 2010).

Embora estas vacinas induzam respostas sorológicas, qualitativa e quantitativamente, similares àquelas encontradas em animais convalescentes, não há indução de resistência populacional aceitável. Entretanto observa-se que animais imunizados respondem mais rapidamente e com níveis mais altos de anticorpos (JACOBS et al., 2010).

A técnica de ELISA pode ser utilizada no diagnóstico indireto da enfermidade, demonstrando a presença de anticorpos anti-*S. equi*. O resultado do ELISA pode ser útil para a determinação da necessidade de vacinação a partir da demonstração do baixo nível de anticorpos séricos (KNOWLES, 2011).

O objetivo do trabalho foi avaliar o “Cell ELISA” como ferramenta de interpretação clínica em potros vacinados contra Adenite Equina a fim de auxiliar as decisões de gestão nos programas de vacinação no controle da doença.

2. METODOLOGIA

O trabalho foi realizado em um criatório de equinos da raça Puro Sangue Inglês, localizado no município de Aceguá/RS. Foram utilizados no estudo 50 potros, entre 4 e 5 meses de idade, sendo 24 machos e 26 fêmeas. Previamente ao início do protocolo vacinal todos os potros foram avaliados clinicamente. Potros com alterações no exame clínico foram retirados do trabalho. O “Cell

ELISA” foi realizado sete dias antes da primeira aplicação da vacina para divisão dos grupos.

A vacina foi preparada utilizando como antígenos três amostras de *S. equi* isoladas no Laboratório de Bacteriologia/FV/UFPel, sendo duas coletadas a partir da punção de abscessos em linfonodos retrofaringeos de dois eqüinos com garrotilho e uma isolada a partir do lavado da bolsa gutural de equino portador assintomático. Para a elaboração da vacina, 5 mL de salina estéril contendo $2,5 \times 10^8$ UFC de culturas de cada cepa, foram adicionadas de formol na concentração de 1:5000 e incubadas durante 24 horas a 37°C. Por fim, foi incorporado hidróxido de alumínio a 10% como adjuvante. A vacina foi envazada em frascos de 10 ml estéreis, lacrados e armazenados a 5°C até a aplicação nos potros.

Os 50 potros foram divididos em dois grupos, Vacinados (n=40) e Controles (n=10), sendo estes últimos não vacinados. Os potros do grupo vacinados foram imunizados no dia zero (D0) com o volume de 3 mL da vacina pela via intramuscular profunda. Os potros do grupo controle receberam no D0 3 ml de solução fisiológica pela via intramuscular profunda. As coletas de sangue para aquisição do soro foram realizadas nos dias D0, D21, D51, D81, D111 e D365. No D21 o respectivo tratamento foi repetido nos dois grupos.

A existência de anticorpos anti-*S. equi* no soro dos equinos foi avaliada a partir da densidade óptica mediante o “Cell ELISA”. A leitura da densidade ótica foi feita a 450 nm em leitor de ELISA (Thermo Plate), 15 minutos após a adição do revelador.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da dinâmica de anticorpos anti-*S. equi* mediante “Cell ELISA” de potros dos grupos vacinado e controle estão demonstrados na Figura 1. Foi possível observar que o grupo de potros vacinados apresentou desenvolvimento gradual de anticorpos após a primeira vacinação, com acréscimo no valor médio da densidade óptica ($0,561 \pm 0,06$) significativamente superior ($p < 0,05$) ao registrado no grupo controle ($0,398 \pm 0,03$).

Nos quatro períodos D21, D51, D81 e D111 houve diferença significativa ($p < 0,05$) na média da densidade óptica entre os grupos. O valor médio máximo na densidade óptica ($0,576 \pm 0,05$) do grupo vacinado foi registrado em D51, após duas doses da vacina (D0 e D21). Em D81 foi notada discreta queda na média da densidade óptica ($0,566 \pm 0,04$) no grupo de vacinados.

Após um ano (D365) os valores médios da densidade ótica entre vacinados e controles se aproximaram, $0,413 \pm 0,03$ e $0,408 \pm 0,02$, respectivamente. Três dos dez potros do grupo controle desenvolveram garrotilho entre D21 e D51. Os potros doentes apresentaram os sinais característicos da doença: febre, secreção nasal purulenta, tosse, linfadenopatia submandibular e retrofaríngea com formação de abscessos.

O diagnóstico de certeza de Adenite Equina foi realizado a partir do isolamento de *S. equi* das secreções nasais. No grupo de vacinados não foram registradas alterações clínicas compatíveis com garrotilho.

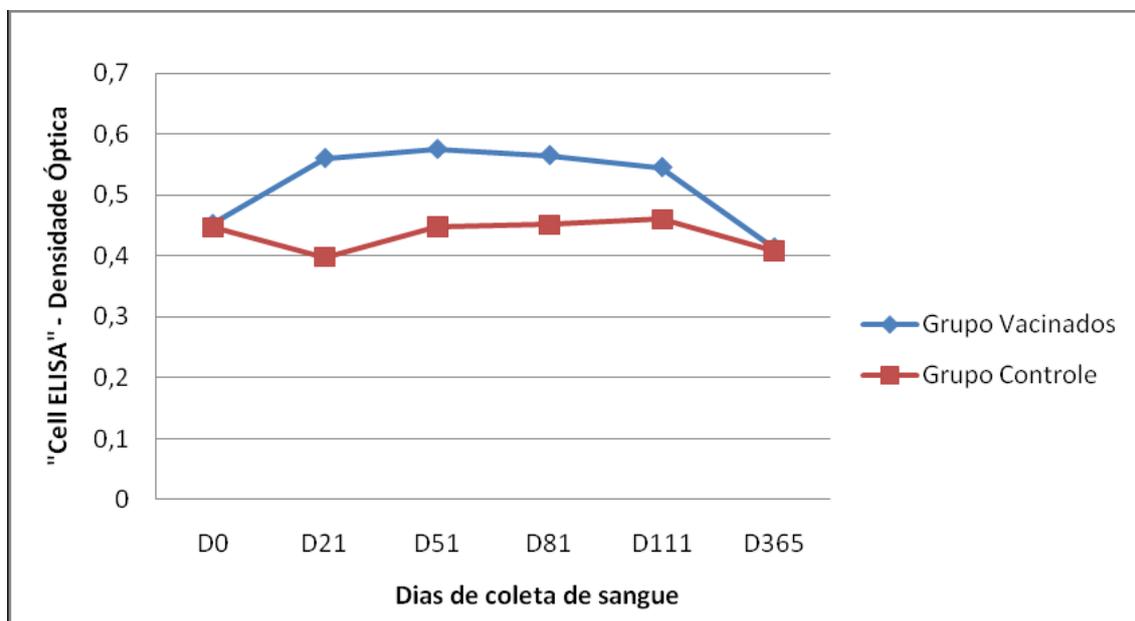


Figura 1 - Dinâmica de anticorpos anti-*S. equi* de potros imunizados com vacina experimental e potros controles realizada através do Cell ELISA.

A detecção de anticorpos anti-*S. equi* a partir de testes sorológicos é utilizada como exame auxiliar para o monitoramento do estado imunológico dos rebanhos equinos à exposição ao *S. equi* (SRIVASTAVA & BARNUM, 1981; SWEENEY et al., 2005; KNOWLES, 2011). Na presente investigação os resultados demonstraram a habilidade do “Cell ELISA” em detectar a condição sorológica natural de potros a campo (não vacinados) e a produção de anticorpos mediante vacinação experimental.

Os potros em D0 apresentaram níveis baixos de anticorpos, porém, superiores a controles negativos. Este resultado parece ser a condição natural de equinos a campo que sofreram exposição prévia ao *S. equi* (AINSWORTH, 2010).

O “Cell ELISA” foi capaz de mostrar a elevação significativa nos níveis de anticorpos anti-*S. equi* nos potros após a vacinação. Estes valores foram superiores ($p < 0,05$) aos observados no grupo controle. Este resultado deve ser considerado porque apesar da imunização comumente não resultar em desenvolvimento de resistência satisfatória à infecção, os equinos imunizados respondem muito mais rápido e com níveis mais altos de anticorpos circulantes que os não vacinados (SWEENEY, 1993; KOWALSKI, 2000; PRESCOTT & WRIGTH, 2000).

Notou-se que os níveis inferiores ($P < 0,05$) de anticorpos observados no grupo de potros não vacinados foram associados ao desenvolvimento de garrotilho. Assim, sugere-se que os potros do grupo controle foram suscetíveis ao desenvolvimento da doença devido ao baixo nível de anticorpos séricos, o que está descrito como um fator de suscetibilidade devido ao inadequado grau de proteção imunológica (SRIVASTAVA & BARNUM, 1985; TIMONEY, 2004).

Concordando com Sweeney et al. (2005), o teste de ELISA pode ser indicado para monitorar o grau de proteção do rebanho e assim identificar o nível de anticorpos que tende a tornar os potros suscetíveis ao desenvolvimento da doença.

Os resultados mostraram que em um programa de vacinação deve ser considerada a necessidade de reforço vacinal trimestral para que sejam conferidos níveis protetores de anticorpos ao rebanho, pois a vacinação não permite um controle satisfatório em condições de campo e isto se deve em parte a não duradoura persistência de anticorpos séricos induzidos pelas vacinais inativadas (NALLY, 2001).

4. CONCLUSÕES

Os resultados demonstrados no presente estudo sugerem que o uso do “Cell ELISA” em potros vacinados pode ser uma ferramenta auxiliar em programas de vacinação contra garrotilho. A partir do teste foi possível monitorar a dinâmica de anticorpos anti-*S. equi* em potros pós-imunização e assim ser estimada a produção de anticorpos vacinais bem como a necessidade de nova imunização devido à identificação do decréscimo nos níveis de anticorpos séricos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

WHELCHER D. D., CHAFFIN M. K., Sequelae and complications of *Streptococcus equi* subspecies *equi* infections in the horse. **Equine Veterinary Education**, v.21, n.3, p.135-141, 2009

JACOBS A. A. C., GOOVAERTS D., NUUTEN P. J. M., THELEN. R. P. H., HARTFORD O. M., Foster T. J., Investigation towards an efficacious and safe strangles vaccine: submucosal vaccination with a live attenuated *Streptococcus equi*. **Veterinary Record** v.147, p. 563-567, 2010.

KNOWLES, E.J. Serological Elisa Test for *Streptococcus equi* (strangles). In: **AHT / BEVA / DEFRA Equine Quarterly Disease Surveillance Report** V.7, n.2, 2011.

SRIVASTAVA, S.K., BARNUM, D.A. The serological response of foals to vaccination against strangles. **Canada Journal Compendium Medicine**, v.45, p.20-25, 1981.

SWEENEY, C.; TIMONEY, J.F.; RICHARD NEWTON, J.R.; HINES, M.T. Review of *Streptococcus equi* Infections in Horses: Guidelines for Treatment, Control, and Prevention of Strangles. In: **51° Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**. Seattle, 2005.

AINSWORTH, D.M. Caught in the Middle of a Strangles Outbreak — Review of the Diagnostic and Management Procedures. In: **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners - Focus Meeting Focus on Upper and Lower Respiratory Diseases Salt Lake** – Indianapolis, 2010.

SWEENEY, C.R. *Streptococcus equi*. In: SMITH, B.P. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**. Editora Manole LTDA, São Paulo, 1993, p.531-533.

PRESCOTT, J.; WRIGHT, T, B. **Strangles in horses**. 2000. Ontario Ministry of Agriculture and Food, Acessado em 02/10/2010. Disponível on-line <http://www.stranglesinhorse.html>.

KOWALSKI, J.J. Mecanismo da doença Infecçiosa. In: REED, S.M & BAYLY, W.M. (Eds.). **Medicina Interna Eqüina**. Rio de Janeiro:Guanabara, 2000. p.54-56.

NALLY, J.E. et al. Induction of mucosal and systemic antibody specific for SeMF3 of *Streptococcus equi* by isobutirate based delivery system. **Vaccine**, n.19, p.492-497, 2001.

TIMONEY, J.F. The pathogenic equine streptococci. **Veterinary Research**, v.35, p.397-409, 2004.