

ELISA NO DIAGNÓSTICO DE THEILERIOSE EQUINA

GUILHERME BORGES WEEGE¹; ANA MUÑOZ VIANNA¹; RODRIGO CASQUERO CUNHA¹; YASMINE ALVES; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE¹

¹Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – gweege@gmail.com;
a.munozvianna@gmail.com; rodrigocunha_vet@hotmail.com;
yasminealves27@gmail.com; fabio@leivasleite.com.br

1. Introdução

A theileriose equina é uma doença causada por um protozoário intra-eritrocitário, *Theileria equi*, transmitido pelo carrapato. É uma das principais parasitoses em equídeos em consequência aos danos diretos e indiretos que pode causar na saúde desses animais (OTTER et al., 2004).

Esta doença debilita os animais, além de causar grandes despesas com tratamento, tempo de restabelecimento e queda no desempenho. Outro problema causado pela theileriose é que os animais acometidos são impedidos de entrar em países livres da doença, sendo assim uma enfermidade que afeta de forma importante a economia (MADEIRA et al., 2007). Com a aproximação dos jogos olímpicos no Rio de Janeiro, o trânsito de animais irá aumentar consideravelmente e com isso por lei todos os equinos deve ser testados em prova de imunofluorescência ou ELISA de competição para piroplasmose equina (*Babesia Caballi* e *Theileria equi*) em uma amostra tomada dentro dos 14 dias anteriores ao embarque (MAPA, 2015).

Os antígenos de superfície (EMAs – Equi Merozite Antigen) possuem importante papel na aderência e penetração da *T. equi* nos linfócitos e eritrócitos dos hospedeiros, tornando-se alvos para estudos de resposta imune contra este patógeno (KUMAR et al., 2003). A EMA-2 de *T. equi* é expressa em distintos estágios do seu ciclo, tanto no hospedeiro final (equídeos), como no vetor (carrapato) e também por ser uma proteína de superfície (UETI et al., 2008), torna-se um forte candidato como antígeno para a detecção de anticorpos contra este parasito. A proteína EMA-2 recombinante (rEMA-2) foi expressa na levedura *Pichia pastoris*, que apresenta crescimento em meios de cultura simples, facilitando a sua utilização em escala industrial (GELLESSEN et al., 2000).

O presente trabalho teve como objetivos a produção heteróloga da proteína EMA-2 de *T. equi* em levedura *Pichia pastoris* e sua utilização em testes de imunodiagnóstico para theileriose equina.

2. Metodologia

A levedura *P. pastoris* transformada para a produção da proteína rEMA-2 de *T. equi* e seu protocolo de fermentação foi usado como descrito na literatura (VIANNA et al., 2014).

No ELISA, a proteína foi utilizada na concentração de 200ng por poço e os soros equinos testados diluídos 1:100, concentração definida através de testes com variância nas diluições, sendo está a com melhores resultados apresentados. O total de soros testados foi de 356. As placas foram

sensibilizadas com proteína recombinante diluída em tampão carbonatobicarbonato pH 9,6, incubadas a 37 °C durante 90min e após lavada 3 vezes com PBS-T. A placa foi bloqueada com leite em pó a 5% em PBS-T (100µL por poço) e após incubação de 60min a 37°C lavou-se novamente com PBS-T. Adicionou-se à placa os soros desconhecidos diluídos conforme citado acima (1:100). Incubou-se a 37 °C e lavou-se com PBS-T 3 vezes. O soro anti-equino-igG conjugado com peroxidase (Sigma) foi diluído 1:6.000 conforme orientação do fabricante em PBS-T e adicionado às placas (100µL por orifício), incubou-se a 37 °C durante 90min. Após lavou-se 5 vezes com PBS-T e adicionou-se o cromógeno/substrato (tampão citrato/fosfato-TPS- 10mL, H₂O₂ 10µL e 0,004g de OPD-ortofenil-enodiamina–Sigma, 4mg). A placa foi mantida 15min no escuro, a reação interrompida pela adição de 50µL/orifício de ácido sulfúrico 1N. As placas foram lidas em espectrofotômetro TP-READER–Thermo Plate com filtro de comprimento de onda de 492nm.

3. Resultados

A leitura das placas foi feita em leitor de microplacas, Thermo Plate com comprimento de onda de 492nm, tendo um total de 8 placas usadas para análise. Feita a leitura de todos os soros e tabelados foi aplicado o gráfico de distribuição de pontos sobre os dados através do programa Graphpad Prism 6, obtendo o gráfico 1 como resultado. Dado o ponto de corte em 0,351 com desvio padrão (DP) de 0,055, feito através dos dados de 10 soros negativos e feito o cálculo através do excel, tivemos como resultado que 63 soros negativos (17,70%) e que 293 (82,30%) soros positivos para a theileriose equina no presente teste.

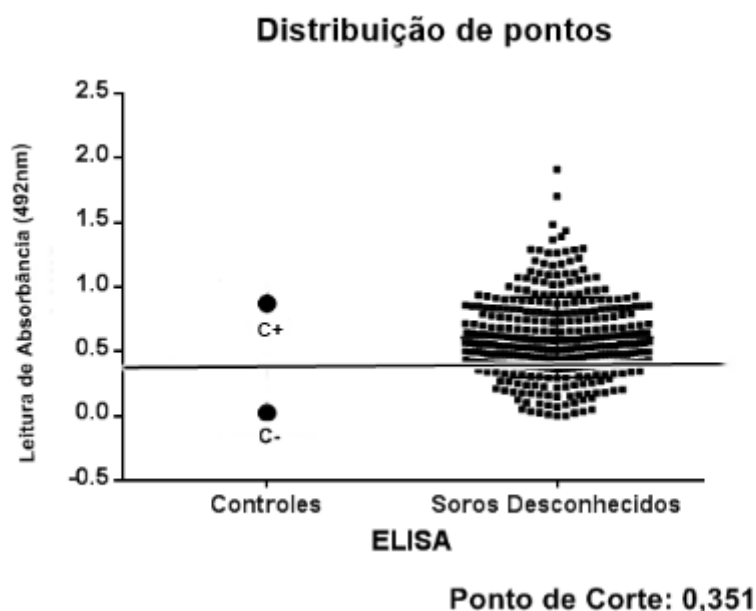


Gráfico 1. Gráfico obtido através da análise de dados, com ponto de corte. Observam-se os controles e a linha que delimita o ponto de corte, acima da reta são os soros positivos e abaixo os soros negativos.

4. Discussão

Com intenso trânsito de equinos mundialmente, observa-se a grande importância do desenvolvimento de testes específicos e sensíveis para a detecção de *T. equi* (BHOORA et al., 2009). Resultados altamente positivos fornecem um diagnóstico definitivo, enquanto resultados sorológicos negativos não excluem a infecção (SEVINIC, 2008).

Para diagnóstico da theileriose equina o ELISA é utilizado com diferentes antígenos como EMA-1 e EMA-2. As proteínas EMA-1 e EMA-2 são expressas em diferentes estágios do ciclo de vida do parasita, entretanto a EMA-2 é liberada no citoplasma e na membrana deste eritrócito sugerindo ser um dos primeiros antígenos a serem reconhecidos pelo sistema imune (KUMAR et al., 2008). A detecção de anticorpos específicos contra theileriose equina pode ser feita por diversos métodos sorológicos especialmente para estudos soroepidemiológicos. Atualmente o ELISA é o teste mais rotineiramente utilizado para detecção de anticorpos anti *T. equi*, sendo inclusive recomendada pela OIE (*World Organisation for Animal Health*) (SANTOS et al., 2009).

5. Conclusão

Demonstrou que o ELISA é importante ferramenta para o diagnóstico da theileriose equina, tornando uma opção valiosa no controle da doença e que a proteína EMA-2 expressa em *P. pastoris* é um promissor antígeno para a utilização em teste de imunodiagnóstico como ELISA.

6. Referencias Bibliográficas

BHOORA, R; FRANSSEN, L; COLLINS, N. **Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene within Theileria equi and Babesia caballi from horses in South Africa.** Veterinary Parasitology. v.11, 2009.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento.(MAPA) - Instrução Normativa nº 8, de 7 de Abril de 2015. Requisitos zoossanitários do Brasil específicos para a importação temporária de equinos em excelente estado sanitário que participarão dos XXXI Jogos Olímpicos Rio 2016, Jogos Paralímpicos Rio 2016 e do evento preparatório pré-olímpico em 2015. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília, seção 1. p 6.

GELLESSEN, G. **Heterologous protein production in methylotrophic yeasts.** Applied Microbiology Biotechnology. v. 54, p. 741-750, 2000.

KUMAR, S; KUMAR, R; GUPTA, A.K; DWIVEDI, S.K. **Passive transfer of Theileria equi antibodies to neonate foals of immune tolerant mares.** Veterinary Parasitology. v. 151, p. 80-85, 2008.

MADEIRA, A.M.B.N. **Introdução à Parasitologia Veterinária – Babesia,** Departamento de Parasitologia ICB/USP, 2007. Disponível em: <<http://www.coccidia.icb.usp.br/disciplinas/BMP222/aulas/Babesia.ppt>> Acesso em 27 de abril, 2015.

MORETTI, A; MANGILI, V; SALVATORI, R; MARESCA, C; SCOCCIA, E; TORINA, A; MORETTA, I; GABRIELLI, S; TAMPIERI, M.P. **Prevalence and**

diagnosis of Babesia and Theileria infections in horses in Italy: A preliminary study. The Veterinary Journal, 2009.

SANTOS, H.S; CAMPOS, H.C; PRADO, R.F.S; GUIMARRÃES, A; PIRES, M.S; MACHADO, R.Z; MASSARD, C.L. **Aspectos Epidemiológicos e Sorológicos de Theileria equi em Equinos de Uso Militar no Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.** Revista Brasileira de Medicina Veterinária. v.35, 2009.

SEVENIC, F; MADEM, M; SEVENIC, M; EKICI, O.D. **A comparative Study on the prevalence of Theileria equi and Babesia caballi infections in horse sub-populations in Turkey.** Veterinary Parasitology. v.156, p.173-177, 2008.

UETI, M.W; PALMER, G.H; SCOLES, G.A; KAPPMAYER L.S; KNOWLES, D.P. **Persistently infected horses are reservoirs for intrastadial tick-borne transmission of the Apicomplexan parasite Babesia equi.** Infection and Immunity. v. 76, n. 8, p. 3525-3529, 2008.

VIANNA, A.M; GONÇALES, R.A; LARA, A.P.S.S; PINTO, L.S; LEITE, F.P.L. **Heterologous expression of EMA-2 (equi merozoite antigen) of Theileria equi in Pichia pastoris with potential use in immunobiologics.** Ciência Rural. 44 (10), 1830 -1836.