

IMUNOGENICIDADE DE VACINA RECOMBINANTE PARA *Theileria equi* EM ÉGUAS GESTANTES E POTROS EM ÁREA LIVRE DE CARRAPATOS – DADOS PRELIMINARES

ALICE CORREA SANTOS¹; CARLOS EDUARDO WAYNE NOGUEIRA²; BRUNA DOS SANTOS SUÑE MORAES²; MARIANA ANDRADE MOUSQUER²; GUILHERME BORGES WEEGE²; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE³

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

²Universidade Federal de Pelotas

³Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A piroplasmose equina é causada por *Theileria equi* e *Babesia caballi* (WISE et al., 2014). A forma de transmissão mais comum da doença se dá através de carrapatos ixodídeos (WISE et al., 2014), também podendo ocorrer por transmissão iatrogênica (Rego, 2008) e transplacentária (ALLSOPP et al., 2007).

O principal carrapato envolvido na transmissão de *T. equi* é o *Rhipicephalus microplus* (GUIMARÃES et al., 1998), que é o mesmo vetor de *Babesia bovis*, causadora da Tristeza Parasitária Bovina (TPB). O município de Santa Vitória do Palmar, RS, localiza-se ao sul do paralelo 32°S, região considerada área livre da ocorrência de carrapatos, onde a TPB não ocorre. Nessas áreas todos os animais são susceptíveis e a doença pode ocorrer se houver entrada acidental de carrapatos em períodos de clima favorável (FARIAS, 2007). O que ocorre com TPB pode ser extrapolado para theileriose, tendo em vista a similaridade entre os parasitos e a forte associação de *T. equi* com a presença do carrapato (GUIMARÃES et al., 1998).

O objetivo deste estudo foi avaliar a dinâmica da resposta humoral a *T. equi* através de vacinação com EMA-2 recombinante em área livre de carrapatos (Santa Vitória do Palmar, RS), bem como sua imunogenicidade em éguas gestantes e potros.

2. METODOLOGIA

O experimento foi conduzido em uma propriedade rural particular, situada no município de Santa Vitória do Palmar, Rio Grande do Sul, com localização geográfica na latitude 33° 31' 08" Sul e longitude 53° 22' 05" Oeste. Foram utilizados 28 equinos da raça Crioula, todos mantidos em regime de criação extensivo.

Éguas gestantes: Foram utilizadas 14 éguas gestantes, com idades entre 6 e 11 anos, divididas em dois grupos: Éguas vacinadas (n=10) e Éguas controle (n=4). Aos 300 dias de gestação foi administrada a primeira dose de vacina rEMA-2, com dose de reforço aos 321 dias. Coletas de sangue para obtenção de soro sanguíneo em tubos sem anticoagulante foram realizadas com 300, 314, 321 dias de gestação e 07 e 30 dias pós-parto. Após esse período, as coletas foram realizadas mensalmente por 6 meses (até o desmame dos potros).

Potros: Os produtos das éguas avaliadas no experimento foram coletados aos 7 dias, 30 dias e após esse período mensalmente até o desmame. Foram divididos em dois grupos: potros provenientes de éguas vacinadas formaram o grupo de Potros vacinados (n=10) e potros de éguas controle, o grupo de Potros controle

(n=4). O esquema vacinal com rEMA-2 nos potros ocorreu no 2º mês de vida (D0), com reforço vacinal 21 dias depois (D21).

Os procedimentos realizados com animais neste experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEa-UFPe), número de protocolo 7896.

Preparo da vacina rEMA-2: Foi utilizada a proteína EMA-2 recombinante, conforme protocolo de clonagem e expressão descrito por Vianna et al. (2014). Para a produção da vacina, foram utilizados 200 µg de rEMA-2, acrescido de 200 µl de Hidróxido de Alumínio a 10% (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha), e tampão fosfato salino (PBS) 1x estéril, completando a dosagem de 2ml. Foram administrados 2 ml da vacina via intramuscular, na musculatura peitoral, mediante antisepsia.

Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

O ensaio de ELISA indireto para determinação de imunoglobulinas G totais foi realizado sensibilizando placas de poliestireno 96 orifícios com rEMA-2 na concentração de 200 ng/well, conforme protocolo descrito por VIANNA et al. (2014). Como controle positivo, utilizou-se soro de equino naturalmente infectado, confirmado através de imunofluorescência indireto, e controle negativo, o soro de um potro neonato antes da primeira mamada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos animais estudados não foram observadas reações adversas decorrentes da vacinação. No período em que os animais foram acompanhados, nenhum demonstrou sinal clínico compatível com theileriose equina. A escolha por realizar o estudo em zona livre de carrapatos favorece a avaliação da imunidade vacinal por reduzir as chances de infecções naturais durante o estudo.

Na avaliação da dinâmica de IgG total de éguas gestantes, observamos que houve resposta vacinal a rEMA-2, apresentando diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos a partir de D21. O pico de IgG total no grupo de Éguas vacinadas foi observado em D35, representando um aumento percentual de 170,1% da absorbância média observada em D0. Tanto no grupo de Éguas vacinadas como Éguas controle observamos queda na média de absorbância de IgG total em D7 (Figura 1).

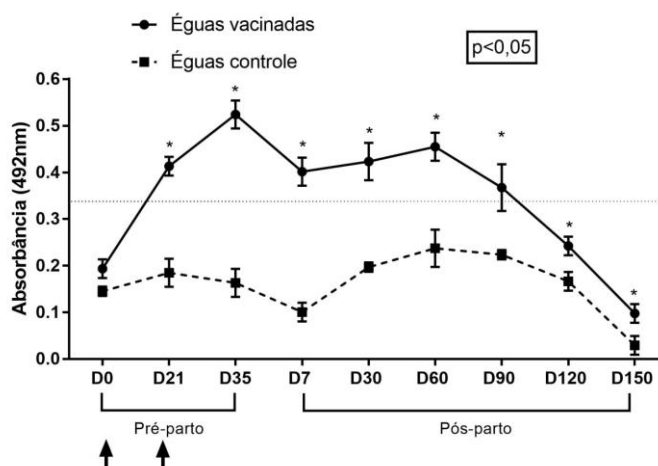


Figura 1 - Dinâmica de IgG total específica para *T. equi*. Os dados representam médias e erro padrão da média da absorbância em leitura óptica (492 nm) de Éguas vacinadas (n=10) e Éguas controle (n=4) em propriedade rural de Santa Vitoria do Palmar, RS, avaliadas

através de ELISA indireto. As vacinações ocorreram em D0 e D21. A linha pontilhada horizontal indica o *cut-off*. Asteriscos (*) indicam diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$).

Em éguas gestantes, em torno de 150 dias após a primeira vacinação já se observa queda próxima aos níveis basais. Este é um dado importante porque além de ser o primeiro relato da dinâmica de IgG total utilizando o antígeno rEMA-2 de *T. equi*, sugere-se a revacinação após esse período. A redução dos níveis séricos em torno de 7 dias pós parto decorre da mobilização de imunoglobulinas para o colostro, e posteriormente leite materno, tendo em vista que a IgG é a imunoglobulina predominante no leite equino até 15 dias pós-parto (Perkins & Wagner, 2015).

Observamos que potros provenientes de éguas vacinadas apresentaram aos sete dias de vida níveis de IgG total para rEMA-2 aproximadamente 3 vezes maiores que os controles, decorrente da imunidade passiva. Após a vacinação (2º mês), foi observado aumento dos níveis de IgG total, mantendo a diferença estatística entre os grupos de Potros vacinados e Potros controle (Figura 2).

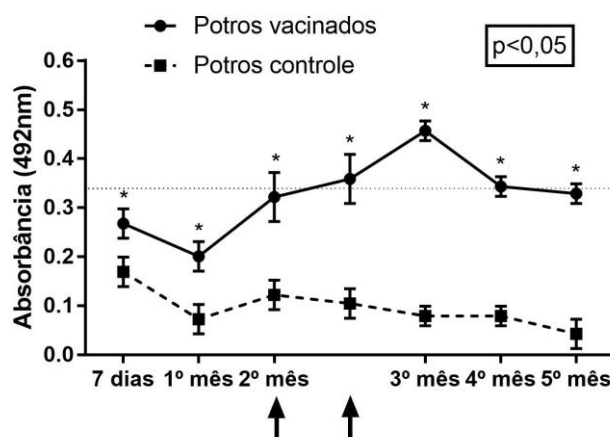


Figura 2 - Dinâmica de IgG total específica para *T. equi*. Os dados representam médias e erro padrão da média da absorbância em leitura óptica (492 nm) de Potros vacinados ($n=10$) e Potros controle ($n=4$) em propriedade rural de Santa Vitoria do Palmar, RS, avaliados através de ELISA indireto. As vacinações ocorreram no 2º mês com reforço após 21 dias. Asteriscos (*) indicam diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$).

Os títulos de potros provenientes de éguas vacinadas aos sete dias de vida sugerem transmissão de imunidade passiva quando comparados aos controles, ainda que a avaliação em nosso estudo seja tardia, tendo em vista que o pico de absorção de IgG ocorre com 12 horas de vida (Curcio & Nogueira, 2012). A vacinação dos potros com rEMA-2 aos 2 meses de vida promoveu incremento dos níveis de IgG totais, detectáveis pelo menos até o 5º mês de vida.

A vacinação no 2º mês de vida se deu em função de observamos em estudos anteriores (Kumar et al., 2008; Santos et al., 2018), que os anticorpos maternos no caso de rEMA-2 decaem neste período. Embora Van Oirschot et al. (1991) tenha descrito que potros com idade inferior a 6-8 meses tenham dificuldade em responder à vacinação em função de interferência da imunidade passiva, em nosso estudo observamos que potros vacinados mais precocemente elevaram os níveis de IgG total. Perkins e Wagner (2015) afirmam que a idade da primeira vacinação em potros depende do antígeno utilizado. Além disso, que a dificuldade na resposta vacinal pode estar mais relacionada à resposta imune celular nos primeiros meses de vida, e consequente reduzida estimulação de linfócitos B, do que a interferência de imunoglobulinas maternas.

4. CONCLUSÕES

Os dados preliminares obtidos neste estudo demonstram que os animais responderam à vacinação com rEMA-2, tanto na produção de anticorpos vacinais, como na transmissão via imunidade passiva. Os anticorpos vacinais mantiveram níveis séricos até por volta de 150 dias após a administração da primeira dose em equinos adultos e éguas gestantes. Em potros provenientes de éguas vacinadas, os anticorpos via imunidade passiva foram detectados no mínimo até o 5º mês de vida.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

CURCIO, B.R. & NOGUEIRA, C.E.W. Newborn adaptations and healthcare throughout the first age of the foal. **Animal Reproduction**. v. 9, n.3, p.182 – 187, 2012.

FARIAS, N.A. Tristeza parasitária bovina. In: RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de ruminantes e eqüídeos**. 3.ed. Santa Maria: Pallotti. V.1, cap.7, p.524-532, 2007.

GUIMARÃES, A. M.; LIMA, J. D.; RIBEIRO, M. F. B. Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*. **Parasitol Res**. v. 84. p. 323-327, 1998.

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.

PERKINS, G.A. & WAGNER, B. The development of equine immunity: Current knowledge on immunology in the young horse. **Equine Veterinary Journal**. v.47, p. 267 – 274, 2015.

SANTOS, A. C.; LEITE, F. P. L.; VIANNA, A. M.; WEEGE, G. B.; FINGER, I. S.; MÜLLER, V.; CURCIO, B. R.; NOGUEIRA, C. E. W. Dynamics of humoral immune response in pregnant mares and foals vaccinated with *Theileria equi* recombinant EMA-2. **Pesq. Vet. Bras**. v. 38(6). p. 1105-1109, 2018.

VAN OIRSCHOT, J.T., BRUIN, G., DE BOER-LUYTZE, E. AND SMOLDERS, G. Maternal antibodies against equine influenza virus in foals and their interference with vaccination. **Zentralbl. Veterinarmed**. v.38, p. 391-396, 1991.

VIANNA, A.M.; GONÇALVES, R.A.; 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.

WISE L.N., PELZEL-MCCLUSKEY A.M., MEALEY R.H. & KNOWLES D.P. Equine piroplasmosis. **Vet. Clin. N. Am., Equine Pract**. v.30, n.3, p. 677-693, 2014.