

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ESQUEMAS VACINAIS CONTRA ROTAVÍRUS EQUINO DE UMA VACINA RECOMBINANTE

CAROLINA PELLIZZER DI GIACOMO¹; VITÓRIA MULLER²; NEIDA LUCIA CONRAD³; BEATRIZ BATISTA BRITES⁴; LEONARDO BRASIL FIGUEIREDO⁵; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – carolinapdigiacomo@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – mullervitoria@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – conradneida@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – beatriz.batista.brites@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – leonardo.brasil.08@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A Equinocultura é um importante setor do agronegócio visto que, segundo a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), movimentando ~ R\$ 30 bilhões por ano, empregando diretamente cerca 640 mil pessoas (Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo, Esalq/SP). O Brasil possui o 4º maior rebanho do mundo, com aproximadamente 5,8 milhões de animais, e o estado do Rio Grande do Sul possui rebanho de equinos de aproximadamente 500 mil animais (IBGE,2023). A produtividade na pecuária está diretamente associada à saúde e ao bem-estar dos animais, os quais são vulneráveis a enfermidades infecciosas. A queda na produtividade acarreta prejuízos econômicos, limitações no comércio e desvalorização no mercado (DEHOVE et al., 2012).

Os rotavírus são vírus RNA de fita dupla, não envelopados, classificados em grupos de A-J, de acordo com a composição do seu capsídeo intermediário (BÁNUAI et al., 2017). Os rotavírus do grupo A são os principais vírus entéricos que acometem mamíferos (CAROSSINO et al., 2024). Os denominados rotavírus equinos são considerados os principais enteropatógenos responsáveis por quadros de diarreia e altas taxas de morbidade e mortalidade em potros, resultando em prejuízos econômicos significativos e riscos à saúde animal (CARSTENS, 2010; BAILEY et al., 2013; CAROSSINO et al., 2018). Em relação ao grupo A e de acordo com a classificação pelos tipos G e P, seis tipos G e seis tipos P foram identificados em equinos (BAILEY et al., 2013). Contudo, os rotavírus G3P[12] e G14P[12] são os que predominam nas populações de equinos e, portanto, são comumente denominados de rotavírus equinos (PAPP et al., 2013).

A principal medida de prevenção do rotavírus em equinos é a vacinação. Atualmente, três vacinas inativas estão comercialmente disponíveis para equinos no mundo, porém, estas apresentam baixa eficácia na prevenção da doença. Um estudo demonstrou que ~83% dos potros infectados por rotavírus eram nascidos de éguas vacinadas com as vacinas comerciais (CAROSSINO et al., 2018).

Os抗ígenos vacinais, através da bioinformática, podem ser previamente selecionados e expressos na forma de recombinantes capazes de proteger contra diferentes doenças (FERREIRA et al., 2016). A utilização de vacinas recombinantes vem sendo apresentada como uma potencial estratégia, podendo superar as limitações das vacinas convencionais comercialmente disponíveis.

Desta forma, este projeto visou avaliar a resposta imune vacinal em equinos com a vacina experimental formulada com a proteína recombinante Rota10 de rotavírus equino G3P[12] e G14P[12].

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção do antígeno recombinante

O antígeno para o desenvolvimento da vacina foi previamente selecionado através de estudos de vacinologia reversa. A sequência selecionada foi sintetizada comercialmente e inserida no vetor pET-23a(+). As células de *Escherichia coli* foram transformadas com o plasmídeo e a expressão da proteína foi realizada conforme descrito por MULLER (2025) e patente BR 10 2024 003285 3. A expressão da proteína recombinante (Rota10) foi verificada através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% e *Western blot* utilizando anticorpo anti-histidina. A purificação e quantificação da proteína foram realizadas utilizando, respectivamente, coluna de cromatografia de afinidade ao níquel e Ensaio de Bradford, com base na curva de albumina do soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich).

2.2 Vacinação de equinos

Foram incluídos neste estudo 28 equinos da raça Crioula, que foram divididas em quatro grupos experimentais de acordo com o esquema vacinal: Grupo 1. Vacinados com uma única dose (dia 0, n=7); Grupo 2. Vacinados com duas doses nos dias 0 e 14 (n=7); Grupo 3. Vacinados com duas doses, dias 0 e 21 (n=7); Grupo 4.; Controle (n=7). Todas as vacinas foram formuladas com 400 µg de rRota10 + 10% de hidróxido de alumínio (Sigma-Aldrich), exceto do grupo controle que foi formulada com 400 µg de PBS + 10% de hidróxido de alumínio (Sigma-Aldrich). Os animais foram vacinados por via intramuscular. Foram realizadas coletas de sangue para obtenção de soro nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 60 e 90 do experimento. As amostras foram identificadas e armazenadas a -20 °C, sendo utilizadas para análise sorológica através de ensaio imunoenzimático ELISA indireto.

2.3 IgG total anti-Rota10

Para a avaliação da dinâmica de anticorpos anti-Rota10, foi realizado o ELISA indireto *in-house*. Placas de 96 cavidades foram revestidas com 200ng/cavidade da proteína Rota10 diluída em tampão carbonato bicarbonato (pH 8,0). As placas foram incubadas por 18 horas a 4 °C. Posteriormente, os soros diluídos (1:100) em tampão fosfato-salino (PBS) foram aplicados e as placas foram incubadas a 37 °C por 1 hora. O anticorpo monoclonal anti-equino conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich) (1:8000) foi adicionado e as placas foram incubadas novamente por um período de incubação de 1 hora a 37 °C. As placas foram lavadas com PBS-T entre todas as etapas, por fim, uma solução reveladora contendo OPD foi adicionada e incubada por 15 minutos. A reação foi interrompida com H₂SO₄ 2N, e as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 492 nm.

2.4 Análise estatística

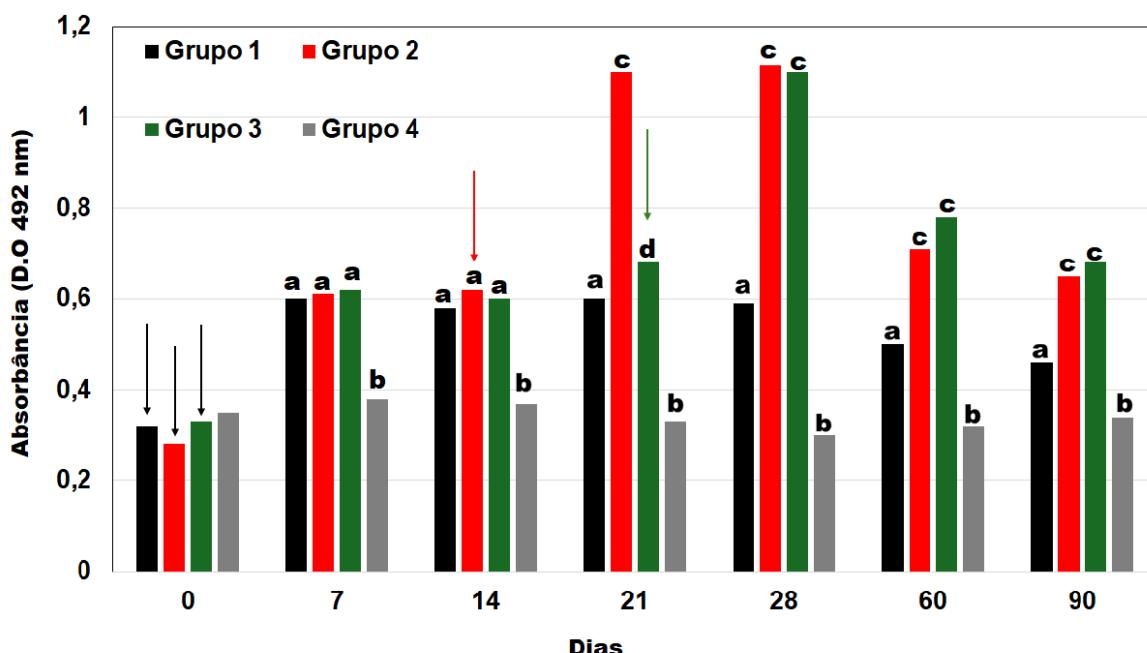
A avaliação estatística foi realizada com o GraphPad Prism v7. ANOVA bidirecional foi realizada para análise de variância, seguida por SIDAK para testes de comparação múltipla. A significância foi estabelecida em $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os equinos foram monitorados por veterinários após as vacinações para observar a presença de reações adversas.

Os resultados sorológicos demonstram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) na resposta imunológica dos animais submetidos aos diferentes esquemas vacinais. Os animais que receberam duas doses apresentaram uma resposta imune显著mente distinta ao longo dos dias experimentais quando comparados ao grupo que recebeu uma única dose (Figura 1).

Figura 1. Dinâmica de anticorpos específicos anti-Rota10 nos quatro grupos de equinos. Os dados representam as médias dos valores de absorbância dos anticorpos específicos anti-Rota10 dos soros coletados nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 60 e 90. As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas (SIDAK, $p < 0,05$) entre os grupos nos dias 7, 14, 21, 28, 60 e 90. As setas indicam os dias de vacinação, as setas pretas indicam uma dose de vacinação nos grupos 1, 2 e 3; a seta vermelha indica segunda dose da vacinação no grupo 2 e a seta verde indica segunda dose da vacinação no grupo 3



Comparando os dois esquemas de duas doses, dias 0 e 14 e dias 0 e 21, observou-se que a resposta anamnética foi a mesma. Verifica-se que a segunda dose no dia 14 gerou níveis (Valor de ELISA) sorológicos mais elevados que os demais grupos vacinados no dia 21. Já a segunda dose no dia 21 apresenta níveis sorológicos elevados no dia 28, apresentando níveis similares ao esquema vacinal

de duas doses dias 0 e 14 e níveis mais elevados que o grupo vacinado com uma dose no dia 0 e grupo controle. Porém, no esquema vacinal dias 0 e 14 vai se obter níveis de anticorpos elevados dias antes do esquema vacinal dias 0 e 21, podendo ser um esquema benéfico em casos de surto.

Entretanto, vale a pena salientar que apenas com uma dose da vacina no dia 0, os grupos vacinados apresentam níveis similares de anticorpos nos dias 7 e 14. No entanto, ambos os esquemas vacinais que utilizam duas doses apresentam níveis de anticorpos mais altos do que o esquema de apenas uma dose, isso corrobora que o reforço vacinal de vacinas não replicativas aumenta a produção de anticorpos específicos. Porém, cabe salientar que, com apenas uma dose os grupos vacinados já apresentam níveis de anticorpos significamente maiores que os animais do grupo controle. Entretanto, nosso estudo possui uma limitação, onde não foi realizada a avaliação da capacidade vírus neutralizante dos anticorpos obtidos tanto com uma dose ou com duas doses, sendo necessária, futuramente, a avaliação dessa resposta da vacina.

4. CONCLUSÕES

A proteína recombinante Rota10 apresentou antigenicidade e apresentou-se uma vacina promissora para o controle do rotavírus equino. Entretanto mais experimento se fazem necessários para a utilização dessa vacina no campo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, K. E., et al. Equine rotaviruses - Current understanding and continuing challenges. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n. 1–2, p. 135–144, 2013.
- BÁNUAI, K.. et al. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. **Infect Genet Evol** . v.48, p.19-26, 2017.
- CAROSSINO, M. et al. Detection, molecular characterization and phylogenetic analysis of G3P[12] and G14P[12] equine rotavirus strains co-circulating in central Kentucky. **Virus Research**, v. 255, p. 39–54, 2018.
- CAROSSINO, M. et al. Equine Rotavirus A under the One Health Lens: Potential Impacts on Public Health. **Multidisciplinary Digital Publishing Institute**, v. 16, n.130, p. 1-31, 2024.
- CARSTENS, E. B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). **Archives of Virology**, v. 155, n. 1, p. 133–146, 2010.
- DEHOVE, A., et al. Economic analysis and costing of animal health: A literature review of methods and importance. **Revue scientifique et technique**, v. 31, p. 604-605, 2012.
- FERREIRA, M. et al. Recombinant Alpha, Beta, and Epsilon Toxins of Clostridium perfringens: Production Strategies and Applications as Veterinary Vaccines. **Toxins**, v. 8, n. 11, p. 340–340, 2016.
- MULLER, V. **Desenvolvimento de uma vacina recombinante para rotavírus equino**. 2025. 79f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.
- PAPP, H. et al. Global distribution of group A rotavirus strains in horses: A systematic review. **Vaccine**, v. 31, n. 48, p.5627-5633, 2013.