

AVALIAR A IMUNIDADE PASSIVA EM POTROS DESCENDENTES DE ÉGUAS VACINADAS CONTRA *LAWSONIA INTRACELLULARIS*

ANA VITÓRIA COSTA¹; NEIDA LÚCIA CONRAD²; VITÓRIA MÜLLER³;
CAROLINA PELLIZER DI GIACOMO⁴; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – anavitoriacost4@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – conradneida@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – mullervitoria@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – carolinapdigiacomo@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A equinocultura é um dos setores que regem de forma positiva ao agronegócio, sendo fundamental para a economia brasileira. Atualmente, estima-se que o rebanho equino seja de ~5,5 milhões de cabeças, sendo o quarto maior do mundo. O mercado movimenta R\$ 16 bilhões anualmente e emprega aproximadamente 600 mil trabalhadores diretos e 3 milhões indiretos (Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo, Esalq/SP).

A produtividade da pecuária está diretamente relacionada à saúde e bem-estar animal, sendo estes suscetíveis a doenças infecciosas. A baixa produtividade implica em perdas econômicas, restrições comerciais e redução do valor de mercado (DEHOVE et al., 2012). *Lawsonia intracellularis* é uma bactéria Gram-negativa intracelular obrigatória, que tem sido relatada em todo o mundo como um patógeno emergente em equinos (BOHLIN et al., 2019). Trata-se do agente causador da Enteropatia Proliferativa, doença que afeta potros. Os sinais clínicos da infecção são inespecíficos e incluem anorexia, febre, letargia, depressão e edema (LAVOIE et al., 2000).

A profilaxia é a melhor medida de controle contra a EP, contudo não há vacinas comerciais destinadas a equinos (VISSCHER et al., 2018; NIWA et al., 2022). As vacinas disponíveis no mercado são destinadas a suínos e possuem uma produção onerosa. Além disso, há estudos controversos quanto a eficácia das vacinas comerciais (RIBER et al., 2015; KRUSE et al., 2016).

Desta forma, as vacinas recombinantes vêm ganhando destaque como estratégia para superar as limitações de vacinas comerciais. Além da praticidade, segurança e reprodutibilidade (SANTOS & GASPAREL, 2015), esses antígenos podem ser previamente selecionados em domínios imunogênicos e expressos na forma de recombinantes capazes de proteger contra diferentes doenças (FERREIRA et al., 2016b). Em conjunto, existe a possibilidade de se adicionar adjuvantes para aumentar a imunogenicidade do antígeno vacinal, como o toxoide tetânico (TT) (TYMCIU et al., 2004; SANTOS et al., 2020).

A emergência de *L. intracellularis* em equinos pode ser explicada por fatores como o estresse pós-desmame e a redução da transferência de anticorpos maternos (LAVOIE et al., 2000; FRAZER, 2008). Estudos em éguas naturalmente infectadas, foi observado que anticorpos anti-*L. intracellularis* adquiridos passivamente foram detectáveis por entre 1-3 meses após o parto, conforme demonstrado pelo método de imunofluorescência indireta (PUSTERLA et al., 2009; PAGE et al., 2011).

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi de avaliar a imunidade passiva em potros descendentes de éguas vacinadas contra *L. intracellularis*.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção do antígeno recombinante

O plasmídeo contendo a sequência da proteína de *L. intracellularis* Li0902 fusionada ao epítipo T-helper derivado do toxoide tetânico (TT-Th) foi sintetizado e transformado em células de *Escherichia coli* BL21 Star. A proteína foi expressa, e caracterizada conforme descrito por SAMBROOK & RUSSEL (2012). A expressão da rLiTT foi confirmada através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15% e *Western blot*. A purificação e quantificação da proteína foram feitas utilizando coluna de cromatografia de afinidade ao níquel e Ensaio de Bradford, respectivamente.

2.2 Vacinação de equinos

A vacinação foi feita com a formulação experimental composta pela proteína recombinante purificada (400 µg/dose) adsorvida no adjuvante hidróxido de alumínio (10%), em um volume total de 2 ml por dose, aplicadas via intramuscular.

Foram utilizados 20 equinos (*Equus caballus*) fêmeas adultas, prenhas e sem raça definida, divididas de forma aleatória em 2 grupos. O primeiro grupo recebeu a vacina recombinante e os animais pertencentes ao segundo conjunto, o grupo controle, receberam inoculações de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e hidróxido de alumínio.

As éguas foram vacinadas no terço final da gestação, nos dias 0 e 14. Ao longo do estudo, amostras de sangue foram obtidas por punção da veia jugular externa em intervalos de 10 dias, totalizando seis coletas (do dia 0 ao dia 50). Os soros dos equinos foram utilizados para avaliar os níveis séricos de IgG total específicos anti-rLiTT por ELISA.

Após o parto, foram realizadas coletas de amostras sanguíneas dos potros nos dias 0, 10 e 30, para avaliar a imunidade passiva dos potros. Todas as etapas do experimento foram submetidas à análise e aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA nº 28134-2019) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).

2.3 Ensaio imunoenzimático

As placas foram revestidas com 200 ng/cavidade de rLiTT diluído em tampão carbonato bicarbonato (pH 8,0) e incubado por 18 h a 4 °C.

Os soros foram diluídos 1:100 em PBS e aplicados em duplicata nas placas. Em seguida, anticorpos anti-IgG de equino conjugados à peroxidase (Sigma-Aldrich), diluídos 1:4000 em PBS, foram adicionados. Entre cada etapa, as placas foram incubadas a 37 °C por 1 hora e lavadas 3 vezes com PBS-T. Posteriormente, 100 µl de uma solução de revelação (preparada com 10 ml de tampão fosfato-citrato, 0,004 g de Ortho-Phenylenediamine (Sigma-Aldrich), e 15 µl de H₂O₂) foram adicionados a cada cavidade, e a reação ocorreu no escuro à temperatura ambiente por 15 minutos. Para interromper a reação, 50 µl de solução de parada (H₂SO₄ 2N) foram adicionados por cavidade. As leituras de absorbância foram realizadas em um leitor de microplacas EZ Read 400 (Biochrom, Reino Unido) com filtro de 492 nm.

Os dados obtidos foram analisados utilizando o software estatístico GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software, Califórnia, EUA). As diferenças entre as médias foram avaliadas por meio do teste de Tukey, considerando uma diferença significativa quando $p < 0.05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteína rLiTT foi expressa na cepa *E. coli* Star, de maneira insolúvel, sendo solubilizada com adição de tampão contendo uréia (8M). O rendimento da expressão de rLiTT foi de 0.6 µg/µl. Os equinos vacinados apresentaram anticorpos contra o antígeno recombinante após uma única dose vacinal, sendo detectados já no dia 10 do experimento, com nível de anticorpos de aproximadamente 1.2 (absorbância). Após a segunda dose, dia 20 do experimento, um maior nível de anticorpos foi observado, com nível de 2.2 (absorbância).

A avaliação da resposta imune dos potros foi realizada a partir do soro coletado nos dias 0, 10 e 30 após o nascimento. Foi observada a presença de anticorpos anti-rLiTT nos potros, atingindo absorbância entre 1,0 e 2,0 (densidade óptica) no primeiro dia de vida (dia 0), sugerindo a transferência de anticorpos maternos. Os níveis de anticorpos se mantiveram significantes até a coleta final, no dia 30 do experimento. De forma geral, a avaliação das médias dos animais revelou que os animais responderam de forma homogênea (Figura 1).

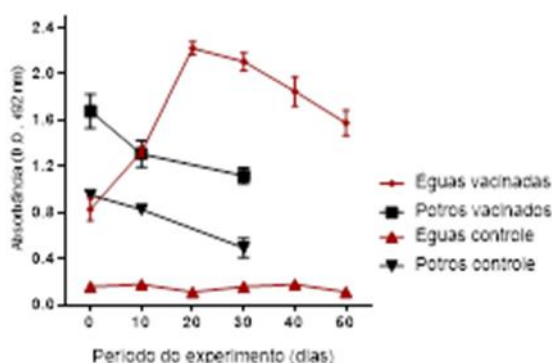


Figura 1. Avaliação da resposta IgG total específica anti-rLiTT em equinos e imunidade passiva em potros. O gráfico ilustra a média da análise individual dos soros dos animais ao longo do experimento. A resposta foi expressa em densidade óptica (D.O. 492 nm).

A imunidade passiva desempenha um papel fundamental na defesa contra infecções (BIGLER et al., 2022; Pusterla et al., 2012). Potros recém-nascidos têm um sistema imunológico ainda em desenvolvimento e dependem das imunoglobulinas transferidas pelo colostro materno para combater agentes patogênicos (BIGLER et al., 2022).

Apesar da transferência passiva de anticorpos contra *L. intracellularis* ter sido previamente documentada em suínos (HOLYOAKE et al., 1994; WENDT et al., 2000; GUEDES et al., 2002b), sabe-se que a disparidade nos níveis de anticorpos entre potros está relacionada com a quantidade de anticorpos específicos presentes no colostro, bem como a absorção variável de diferentes quantidades de colostro (PUSTERLA et al., 2012).

Os resultados sorológicos demonstraram que anticorpos contra *L. intracellularis* foram transferidos passivamente para potros. Embora testes de diagnóstico e métodos de tratamento para Enteropatia Proliferativa em equinos tenham sido estabelecidos e descritos, medidas preventivas para a doença permaneceram em grande parte não abordadas (PUSTERLA et al., 2012). Nesse contexto, a imunização materna mostra-se não somente como um componente

fundamental na prevenção da doença, como também torna o consumo de colostro um fator crucial para a transferência de imunidade.

4. CONCLUSÕES

As éguas prenhas vacinadas responderam a vacina, e foram capazes de transmitir anticorpos anti-rLiTT para seus potros através do colostro.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIGLER, N. A., BRUCKMAIER, R. M., & GROSS, J. J. Implications of placentation type on species-specific colostrum properties in mammals. **Journal of animal science**, 100, 2022.
- DEHOVE, A.; COMMAULT, J.; PETITCLERC, M.; TEISSIER, M.; MACÉ, J. Economic analysis and costing of animal health: A literature review of methods and importance. **Revue scientifique et technique**, v. 31, p. 604-605, 2012.
- Frazer, M.L. *Lawsonia intracellularis* infection in horses: 2005-2007. **J. Vet. Intern. Med.**, 22, 1243-1248, 2008.
- GUEDES, R.M., GEBHART, C.J., ARMBRUSTER, G.A., ROGGOW, B.D. Serologic follow-up of a repopulated swine herd after an outbreak of proliferative hemorrhagic enteropathy. **Can. J. Vet. Res.**, 66, 258-263, 2002b.
- Holyoake, P.K., Cutler, R.S., Caple, I.W., Monckton, R.P. Enzyme-linked immunosorbent assay for measuring ileal symbiont intracellularis-species immunoglobulin G response in sera of pigs. **J. Clin. Microbiol.** 32, 1980-1985, 1994.
- KRUSE, A. B.; DE KNEGT, L. V.; NIELSEN, L. R.; ALBAN, L. No Clear Effect of Initiating Vaccination against Common Endemic Infections on the Amounts of Prescribed Antimicrobials for Danish Weaner and Finishing Pigs during 2007-2013. **Frontiers in veterinary science**, v. 3, p. 120, 2016.
- LAVOIE, J.P., DROLET, R., PARSONS, D., LEGUILLETTE, R., SAUVAGEAU, R., SHAPIRO, J., HOULE, L., HALLÉ, G. AND GEBHART, C.J. Equine proliferative enteropathy: a cause of weight loss, colic, diarrhoea and hypoproteinaemia in foals on three breeding farms in Canada. **Equine Vet. J.**, 32, 418-425, 2000.
- NIWA, H., HIGUCHI, T., FUJII, S., KINOSHITA, Y., UCHIDA-FUJII, E., SUEYOSHI, M., NUKADA, T., & UENO, T. Prevalence of equine proliferative enteropathy in Hidaka district, Hokkaido, over five seasons. **Journal of equine science**, 33(4), 71-74, 2022.
- PAGE, A. E., SLOVIS, N. M., GEBHART, C. J., WOLFSDORF, K., MAPES, S. M., & PUSTERLA, N. Serial use of serologic assays and fecal PCR assays to aid in identification of subclinical *Lawsonia intracellularis* infection for targeted treatment of Thoroughbred foals and weanlings. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 238(11), 1482-1489, 2011.
- PUSTERLA, N., JACKSON, R., WILSON, R., COLLIER, J., MAPES, S. AND GEBHART, C. Temporal detection of *Lawsonia intracellularis* using serology and real-time PCR in Thoroughbred horses residing on a farm endemic for equine proliferative enteropathy. **Vet. Microbiol.**, 136, 173-176, 2009.
- PUSTERLA, N., VANNUCCI, F.A., MAPES, S.M., NOGRADI, N., COLLIER, J.R., HILL, J.A., DIFRANCESCO, M., WHITE, A.M., AKANA, N.K., SIMONEK, G. AND GEBHART, C.J. Efficacy of an avirulent live vaccine against *Lawsonia intracellularis* in the prevention of proliferative enteropathy in experimentally infected weanling foals. **Am. J. Vet. Res.**, 73, 741-746, 2012.
- RIBER, U.; HEEGAARD, P. M.; CORDES, H.; STÄHL, M.; JENSEN, T. K.; JUNGENSEN, G. Vaccination of pigs with attenuated *Lawsonia intracellularis* induced acute phase protein responses and primed cell-mediated immunity without reduction in bacterial shedding after challenge. **Vaccine**, v. 33, p. 156-162, 2015.
- SANTOS, F. D. S.; MAZZOLI, A.; MAIA, A. R.; SAGGESE, A.; ISTICATO, R.; LEITE, F.; IOSSA, S.; RICCA, E.; BACCIGALUPI, L. A probiotic treatment increases the immune response induced by the nasal delivery of spore adsorbed TTFC. **Microbial cell factories**, v. 19, p. 42, 2020.
- TYMCIU, S.; DURIEUX-ALEXANDRENNE, C.; WIJKHUISEN, A.; CRÉMINON, C.; FROBERT, Y.; GRASSI, J.; COURAUD, J. Y.; BOQUET, D. Enhancement of antibody responses in DNA vaccination using a vector encoding a universal T-helper cell epitope. **DNA and Cell Biology**, v. 23, n. 6, p. 395-402, 2004.
- VISSCHER, C.; MISCHOK, J.; SANDER, S.; VERSPOHL, J.; PEITZMEIER, EU.; VON DEM BUSCHE I.; KAMPHUES, J. Spread of an Experimental Salmonella Derby Infection in Antibiotic-Treated or *Lawsonia intracellularis* Vaccinated Piglets. **Animals**, v. 8, n. 11, p. 206, 2018.
- Wendt, M., Bonitz, A., McOrist, S. Prevalence of *Lawsonia intracellularis* in German breeding herds. **Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Cong.**, 16, 27, 2000.