

VACINA CONTRA ADENITE EQUINA UTILIZANDO PROTEÍNA SeM RECOMBINANTE

MORAES, C.M.^{1*}, ROCHA, A.S.R.¹, GONÇALVES JUNIOR, A.S.¹, CUNHA, R.C.¹, ROOS, T.B.², CONCEIÇÃO, F.R.¹, NOGUEIRA, C.E.W.³, LEITE, F.P.L.², GIL-TURNES, C.¹⁻⁴.

1. INTRODUÇÃO

A Adenite Equina, também conhecida como Garrotilho, é uma enfermidade contagiosa do trato respiratório superior dos eqüídeos causada por *Streptococcus equi* subsp. *equi* (*S. equi*), bactéria β hemolítica pertencente ao grupo C de Lancefield (BONNISTER *et al*, 1985; KUWAMOTO *et al*, 2001). A doença afeta animais de todas as idades, com maior freqüência em jovens e caracteriza-se por apresentar secreção mucopurulenta das vias aéreas superiores e linfadenite com formação de abscessos (SWEENEY, 1993; KOWALSKI *et al*, 2000).

O diagnóstico clínico e o tratamento são realizados sem dificuldade, mas há carência de kits comerciais de fácil aceso no país para o diagnóstico de certeza. Os programas de vacinação, por sua vez, não permitem um controle satisfatório em condições de campo (TIMONEY, 1993), já que não mais que 50% dos animais vacinados ficam imunes. Os baixos índices de proteção conferidos pelas vacinas em uso pode dever-se, em parte, à inadequada estimulação antigênica ou à curta persistência dos anticorpos bactericidas no soro, ou porque a proteção nos eqüinos não seja mediada por anticorpos bactericidas séricos, mas por imunoglobulinas secretórias da mucosa nasofaríngea produzidos localmente (SWEENEY, 1993).

S. equi sintetiza vários fatores de virulência, entre eles cápsula de ácido hialurônico, hialuronidase, streptolisina O, streptoquinase, receptores para Fc de IgG, peptidoglicano e proteína M. Dentre estes fatores, a proteína M de 58 kDa, codificada pelo gene *SeM*, tem especial importância, por ser uma proteína de membrana com capacidade antifagocítica e de aderência. Essa proteína vem sendo utilizada para diagnóstico e é uma candidata promissora a antígeno vacinal (TIMONEY *et al*, 1997; ANZAI *et al*, 1999; HARRINGTON *et al*, 2002).

Várias vacinas contra Garrotilho são utilizadas em diferentes partes do mundo. Entre as diversas vacinas atualmente em uso há bacterinas e vacinas de subunidades, contendo proteína M ou frações dela. As bacterinas utilizam geralmente cepas autóctones de *S. equi* subsp. *equi*, e hidróxido de alumínio com adjuvante. Algumas vacinas de subunidade utilizam proteína M obtida por extração com ácido quente ou por tratamento de células íntegras por mutanolisina, enzima hidrolítica da parede celular. Uma alternativa possível, com o advento da tecnologia de DNA recombinante, é a clonagem e expressão

¹ Centro de Biotecnologia, UFPel. Campus Universitário, CP 354, 96010-900, Pelotas/RS. * E-mail: carina_moraes@terra.com.br

² Instituto de Biologia, UFPel.

³ Hospital de Clínicas Veterinária, UFPel.

⁴ Faculdade de Veterinária, UFPel.

de proteínas específicas de um determinado agente, produzindo antígenos que podem ser utilizadas como vacinas.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma vacina contra Adenite Eqüina, utilizando proteína SeM recombinante de *S. equi*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

DNA cromossomal de uma cepa de *S. equi* isolada de secreção nasal de um animal doente foi extraído conforme SAMBROOK & RUSSEL (2001). O gene foi amplificado por PCR, purificado com o kit GFX (GE Healthcare, USA), digerido com as enzimas de restrição *BanHI* e *KpnI* e clonado nos plasmídeos pAE (Qiagen), previamente digeridos com *BanHI* e *KpnI*, mediante reação de ligação com a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen™). Cultura de *E. coli* TOP 10F (Invitrogen™) competente foi transformada por eletroporação com o produto da ligação. Os clones recombinantes foram selecionados em agar Luria Bertani *low salt* (LB) contendo 100 µg/mL de ampicilina. A triagem das colônias recombinantes foi feita com fenol clorofórmio segundo JOUGLARD *et al.* (2002). Os clones recombinantes foram repicados em LB com ampicilina, os plasmídeos extraídos conforme SAMBROOK & RUSSEL (2001) e identificados por digestão com as enzimas de restrição *BanHI* e *KpnI*.

E. coli BL21 *plyss* competente foi transformada com o gene da proteína SeM clonado em vetor pAE para expressão da proteína. Clones recombinantes foram cultivados em meio de cultura LB com ampicilina até a fase log ($DO_{600}=0,6-0,8$) e a cultura foi induzida com isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside 1mM (IPTG) durante 3 h a 37 °C, em agitação. A expressão foi confirmada por SDS-PAGE 12% e por Western blot com anticorpo monoclonal (MAb) anti-histidina conjugado à peroxidase (Sigma). Após, a proteína obtida foi purificada através de cromatografia de afinidade (his tag) no sistema AKTAPrime™ Plus (Amersham Bioscience, Alemanha) submetida à diálise por 24h em PBS pH 7,4 contendo 0,1% de N-lauroylsarcoside, e 24h em PBS pH 7,4.

Fêmeas Balb-c isogênicas com 4-6 semanas de idade foram divididas aleatoriamente em grupos de sete animais cada, inoculadas por via SC com 1/20 da dose vacinal estimada para cavalos, nos dias 0 e 21 do experimento. Um grupo foi vacinado com 12 µg mL⁻¹ de proteína recombinante sem adjuvante, outro com a vacina recombinante contendo 12 µg mL⁻¹ de proteína recombinante adicionada de 20% de hidróxido de alumínio, outros dois grupos foram vacinados com diferentes bacterinas comerciais contra Adenite Eqüina, e o grupo restante foi inoculado com salina estéril no mesmo volume das vacinas, sendo este grupo utilizado como controle.

Coletou-se sangue por punção do plexo venoso retro-ocular nos dias 0, 21 e 42. Os anticorpos foram titulados por ELISA utilizando a proteína SeM recombinante como antígeno. As absorbâncias foram divididas pelas absorbâncias no dia da primeira vacinação, e expressos como soroconversão. As médias das soroconversões de cada grupo e coleta foram submetidas à ANOVA no nível de $p<0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gráfico 1 mostra as soroconversões induzidas pelas vacinas testadas.

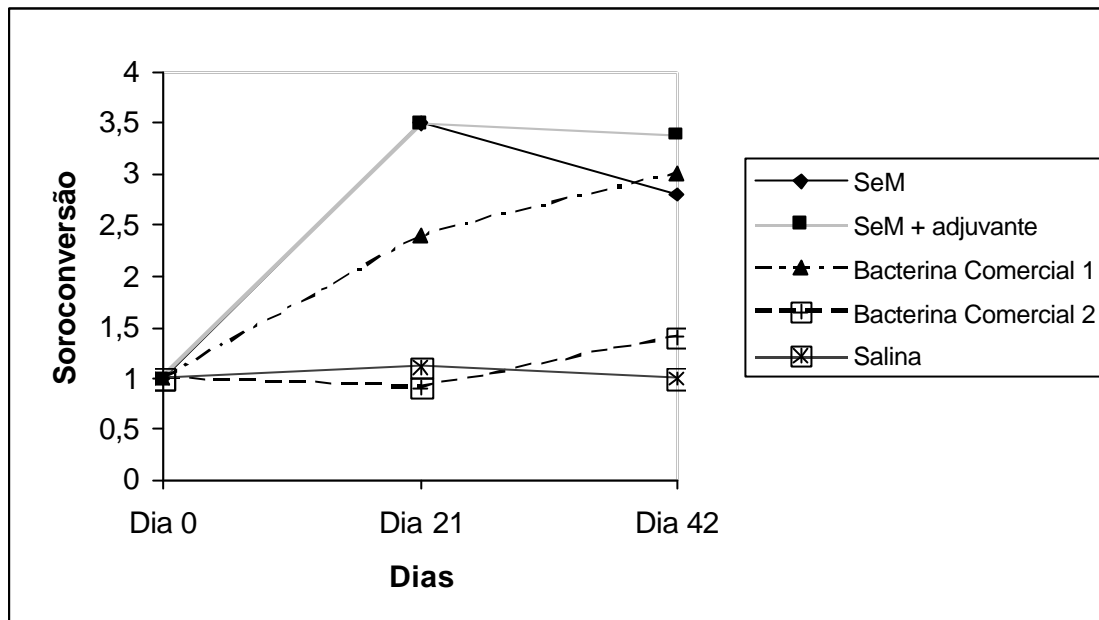


Gráfico 1: Soroconversões das vacinas contra Adenite Eqüina. O gráfico representa a soroconversões médias avaliadas por ELISA (* significa $p < 0.05$).

As soroconversões induzidas no dia 21 pelas vacinas produzidas com a proteína SeM (com e sem hidróxido de alumínio) não foram diferentes ($p > 0.05$). Mas, no dia 42, a soroconversão induzida pela vacina contendo hidróxido de alumínio foi 1,2 vezes superior, quando comparada à vacina sem adjuvante. Estes dados sugerem que a proteína recombinante é mais rapidamente metabolizada, fazendo-se necessário utilizar um adjuvante.

As vacinas contendo SeM recombinante apresentaram soroconversões médias 1,4 e 3,9 vezes superiores às vacinas comerciais testadas (bacterina comercial 1 e 2, respectivamente) no dia 21. Já no dia 42, as soroconversões induzidas pela bacterina comercial 1 e a SeM sem adjuvante não apresentaram diferenças. A soroconversão induzida pela vacina comercial 2 foi 2,4 vezes inferior quando comparada à da SeM com adjuvante e 2 vezes inferior a esse antígeno sem adjuvante.

Os resultados sugerem que a proteína SeM recombinante é um candidato idôneo para ser avaliado como vacina contra Adenite Eqüina. Os resultados demonstraram, também, que o uso do adjuvante hidróxido de alumínio juntamente com a proteína SeM induziu uma resposta imune mais duradoura em camundongos.

4. CONCLUSÃO

Concluiu-se que a proteína SeM apresenta potencial para utilização como antígeno na produção de uma vacina contra Adenite Equina, e que o adjuvante hidróxido de alumínio prolonga a resposta imune em camundongos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANZAI, T; TIMONEY, J.F; KUWAMOTO, Y; FUJITA, Y; WADA, R; INOUE, T. *In vivo* pathogenicity and resistance to phagocytosis of *Streptococcus equi* strains with different levels of capsule expression. **Veterinary Microbiology** v.67, p.277-286, 1999.

BONNISTER, M.F.; BENSON, C.E.; SWEENEY, C.R. Rapid species identification of group C streptococci isolated from horses. **Journal of Clinical Microbiology** v.21, p. 524-526, 1985.

HARRINGTON, D.J; SUTCLIFFE, I.C; CHANTER, N. The molecular basis of *Streptococcus equi* infection and disease. **Microbes and Infection** v.4, p.501-510, 2002.

JOUGLARD, S. D. D. ; MEDEIROS, M. A. ; VAZ, E. K. ; BASTOS, R. ; CUNHA, C. W. ; ARMOA, G. R. G. ; DELLAGOSTIN, Odir Antônio . An Ultra-Rapid and inexpensive Plasmid Preparation Method for Screening Recombinant Colonies. In: American Society for Microbiology - 102nd General Meeting, 2002, Salt Lake City - Utah. **Abstracts American Society for Microbiology** - 102nd General Meeting. Salt Lake City - Utah, 2002. 243 p.

KOWALSKI, J.J. Mecanismo da Doença Infecciosa. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. **Medicina Interna Equina**. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro : Rio de Janeiro, 2000, p.54-56.

KUWAMOTO, Y.; ANZAY, T.; WADA, R. Microplate sugar-fermentation assay distinguishes *Streptococcus equi* from other streptococci of Lancefield's group C. **Equine Veterinary Science**. Vol.12, n. 2, p. 47-49, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

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

TIMONEY, J.F; ARTIUSHIN, S.C; BOSCHWITZ, J.S. Comparison of the sequences and functions of *Streptococcus equi* M-like proteins SeM and SzPSe. **Infection and Immunity** n. 65, p. 3600-3605, 1997.

