

III SEMANA DO CONHECIMENTO

Marque a opção do tipo de trabalho que está inscrevendo:

Resumo

Relato de Caso

Monitoramento sorológico de anticorpos anti *Actinobacillus pleuropneumoniae* em matrizes e leitões: uma ferramenta indispensável para a avaliação de vacinas e para definir estratégias de vacinação

AUTOR PRINCIPAL: Rafaela Luiza Klein.

CO-AUTORES: João Antônio Guizzo, Luciano Brandalise, Letícia Gressler, Luiz Carlos Kreutz e Rafael Frandoloso.

ORIENTADOR: Rafael Frandoloso.

UNIVERSIDADE: Universidade de Passo Fundo-UPF.

INTRODUÇÃO:

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) é uma bactéria Gram-negativa e agente etiológico da pleuropneumonia suína (PS), uma doença respiratória de distribuição mundial. App é classificado fenotipicamente em 16 sorotipos, e no Brasil, infecções produzidas por este patógeno ocorrem em todas as regiões produtoras de suínos, sendo endêmica na região sul, onde os sorotipos 1, 3, 5 e 7 são os mais prevalentes. Suínos com 6 a 12 semanas de idade são mais acometidos e a prevenção da PS é realizada através da vacinação de matrizes e de suínos acima de 15 kg. Uma das fragilidades da imunização consiste no desconhecimento do status imunológico específico do rebanho antes da vacinação, que pode comprometer a eficácia das vacinas. Diante deste cenário, avaliamos neste estudo, a capacidade imunogênica de uma bacterina comercial (Parapleuro Shield, Novartis) composta pelos sorotipos 1, 5 e 7 de App em matrizes e, também, a correspondente cinética de anticorpos maternos transferidos à leitões.

DESENVOLVIMENTO:

A avaliação da resposta de anticorpos anti App foi realizada mediante um teste de ELISA indireto. As cepas 4074 (SV1), K17 (SV5) e WF83 (SV7) de App foram cultivadas em caldo PPLO (suplementado com NAD e glicose) a 37°C, em agitação (300 rpm), até atingir uma densidade óptica de 0,7 medida a 600 nm. A seguir, o pellet bacteriano foi lavado 2 vezes com PBS, ressuspendido em tampão carbonato (TC) pH 9,6 e quantificado por citometria de fluxo. Sobre uma placa de poliestireno de 96 orifícios (Maxisorp®, NUNC) adicionou-se 5×10^4 bactérias/orifício ($\cong 15 \mu\text{g}$ de proteína) diluídas em 100 μl de TC. Após incubação overnight a 4°C, os poços foram lavados 2 vezes com 200 μl de TBS, e os espaços livres bloqueados com 3% de albumina séria bovina (BSA).

III SEMANA DO CONTECIMENTO

27 DE OUTUBRO
2016

Duzentos e oitenta e um (281) soros suínos foram analisados em três ELISAs independentes. Das amostras, 83 procediam de matrizes não imunizadas, 83 de matrizes vacinadas (14 dias após a segunda dose) e 115 de leitões de diferentes idades [14 dias ($n=30$), 28 dias ($n=30$), 42 dias ($n=30$) e 80 dias ($n=25$)] nascidos de mães vacinadas. As amostras foram diluídas 1:100 com TBS contendo 0,05% de Tween 20 e 1% de BSA (TBS-T) e adicionadas (100 μ l) em duplicada em cada placa. A reação foi incubada por 1 hora a 37^o C, e após, procedeu-se 2 lavados com TBS-T, e adicionou-se o anticorpo secundário de cabra anti IgG de suíno conjugado com peroxidase diluído 1:5.000 com TBSTB. A reação foi novamente incubada a 37^oC por 1 hora, e após eliminar-se os anticorpos não unidos, a reação foi revelada com um substrato contendo TMB. A leitura das placas foi realizada em um leitor de ELISA utilizando-se um comprimento de onda de 450 nm. Soros hiperimunes de suínos produzidos contra as cepas homólogas foram utilizados como controle positivo, e como controle negativo, utilizou-se PBS + 1% de BSA e soro suíno negativo para *App*.

Neste estudo, demonstramos que todas as matrizes, antes da vacinação, já apresentavam altos títulos de anticorpos contra os SV1, SV5 e SV7 de *App*, indicando a presença dos referidos sorovares na granja. Após a imunização, observou-se um aumento significativo nos títulos de IgG contra os SV1 e SV5, porém, não contra o SV7. Em relação aos títulos de anticorpos dos leitões, observou-se que os mesmos não diminuíam de acordo com a cinética natural de carboxilação das imunoglobulinas. Nos dias 14 e 28 após o nascimento, os títulos de IgG permaneciam altos e não diferiam estatisticamente. No entanto, no dia 42, um incremento significativo de IgG foi advertido em todos os animais em comparação com os títulos observados nos momentos anteriores, indicando a presença do patógeno nesta fase de produção. Duas hipóteses podem ser sugeridas para explicar o incremento de IgG específicas nos leitões: 1) o desafio natural estimulou a resposta celular de memória transferida pela mãe através do colostro; 2) os anticorpos maternos não conseguem neutralizar a infecção inicial e induz uma resposta específica ativa nos animais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

O monitoramento sorológico é um método pouco utilizada pelos Médicos Veterinários especialistas em suínos. Aqui, demonstramos a capacidade imunogênica da bacterina Parapleuro Shield em matrizes soropositivas para *App*. A análise sorológica dos leitões demonstra o momento do desafio clínico causado pelo *App*, auxiliando na adoção de medidas preventivas que antecedam o processo de infecção natural.

REFERÊNCIAS:

VAZ, Clarissa Silveira Luiz, et. al. *Aspectos recentes da patogênese e diagnóstico da pleuropneumonia suína*. Ciência Rural, Santa Maria, v.34, n.2, p.635-643, mar-abr, 2004.

BUNKA, S., FRANZ, B., JECKSTADT, S. A mixed antigen ELISA for the detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 3, 7 and 9. In:

III SEMANA DO CONHECIMENTO

Universidade e comunidade em transformação

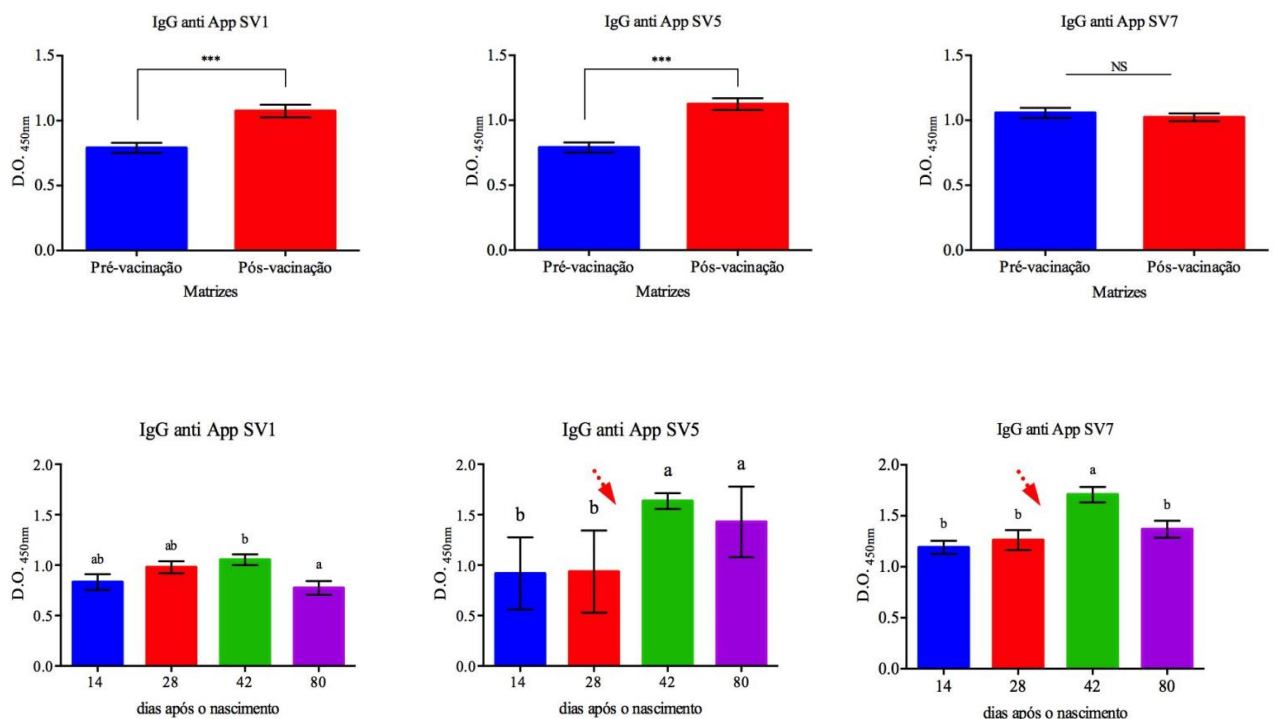
International Pig Veterinary Society, 12, 1992, The Hague. The Hague: International Pig Veterinary Society, 1992. p 221;

ZHOU, L. *Multiplex PCR That Can Distinguish between Immunologically Cross Reactive Serovar 3, 6, and 8 Actinobacillus pleuropneumoniae Strains.* Journal of clinical microbiology, Feb. 2008, vol 46, no 2. p. 800–803.

3 a 7 DE OUTUBRO DE 2016

NÚMERO DA APROVAÇÃO CEP OU CEUA (para trabalhos de pesquisa): Número da aprovação.

ANEXOS:



Leitões