

## “Cell ELISA” como ferramenta auxiliar no controle da adenite equina

[“Cell ELISA” as an auxiliary tool for the control of equine adenitis]

L.M. Ribas, M.C. Rosa, C.E.W. Nogueira, I.S. Finger, R.C. Cunha, F.P.L. Leite\*

Universidade Federal de Pelotas – Campus Capão do Leão – Pelotas, RS

### RESUMO

Este trabalho relata o desenvolvimento e a avaliação de um ensaio imunoenzimático (ELISA) como ferramenta auxiliar no controle da adenite equina. Foi avaliada a presença de anticorpos anti-*Streptococcus equi* subsp. *equi* em equinos com doença clínica de garrotilho, portadores assintomáticos e potros vacinados. Equinos doentes demonstraram absorvâncias médias superiores ( $P < 0,05$ ) às médias observadas nas demais categorias examinadas. Equinos portadores assintomáticos apresentaram valores médios de absorvância superiores ( $P < 0,05$ ) aos animais com cultura negativa. Logo após a vacinação, potros apresentaram elevação nos níveis de anticorpos, seguida de um decréscimo nos níveis 90 dias após a segunda vacinação. O “Cell ELISA” foi eficiente para a detecção de anticorpos em equinos expostos a antígenos de *S. equi*, diferenciando-se de infecções por *S. zooepidemicus*. O “Cell ELISA” mostrou-se uma alternativa clínica para o diagnóstico indireto da adenite equina, diferenciando-se, entre equinos assintomáticos, os potenciais portadores da infecção. Os resultados observados em potros vacinados confirmam o potencial de utilização desse teste como ferramenta em programas de vacinação contra garrotilho pelo monitoramento de rebanhos pós-vacinação. Esses resultados sugerem que o “Cell ELISA” é uma promissora ferramenta auxiliar no controle da adenite equina.

Palavras-chave: garrotilho, *Streptococcus equi*, ELISA, portador assintomático

### ABSTRACT

*This study reports the development and evaluation of the use of "Cell ELISA" as a tool for clinical interpretation for the control of strangles. The presence of anti-S. equi antibodies was evaluated in horses with strangles, in asymptomatic carriers and in vaccinated foals. Equine positive for strangle showed higher average of absorbance ( $P < 0.05$ ) when compared with the average for the other categories of horses studied. Asymptomatic S. equi equine carriers had higher average of absorbance ( $P < 0.05$ ) than equines with negative culture. After vaccination, foals presented an increase in antibody levels, followed by a decrease in antibody levels 90 days post the second vaccination. The "Cell ELISA" was efficient for the detection of antibodies in horses exposed to S. equi antigens, differentiating infections with S. zooepidemicus. Thus, the test might be a clinical tool for indirect diagnosis of the strangles, differentiating, between the asymptomatic horses, the potential carriers of infection. The results observed in vaccinated foals confirm the potential use of this test as an auxiliary instrument for strangles vaccination programs based in the serological monitoring of the herd after immunization. These results suggest that the "Cell ELISA" is a promising auxiliary tool in the control of equine adenitis.*

Keywords: strangles, *Streptococcus equi*, ELISA, Asymptomatic carriers

### INTRODUÇÃO

A adenite equina, também conhecida por “garrotilho”, é uma enfermidade causada pela bactéria *Streptococcus equi* subsp. *equi*,

sendo caracterizada por produzir secreção mucopurulenta das vias aéreas superiores, linfadenite retrofaringea e submandibular, com subsequente formação de abscessos (Timoney *et al.*, 1999).

---

Recebido em 7 de dezembro de 2016

Aceito em 5 de janeiro de 2017

\*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: fabio@leivasleite.com.br

O diagnóstico presuntivo é realizado de acordo com os sinais clínicos, sendo o padrão ouro a cultura bacteriana com a identificação do *S. equi* (Sweeney *et al.*, 2005). A utilização da sorologia por ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) no diagnóstico tem se tornando alvo de interesse como ferramenta auxiliar no controle da adenite equina (Kemp-Symonds *et al.*, 2008; Knowles *et al.*, 2010; Knowles, 2011). Para seu efetivo controle, as medidas profiláticas, especialmente as de cunho vacinal, são de fundamental importância para a proteção do rebanho (Sweeney *et al.*, 2005). Entretanto, as vacinas disponíveis são pouco eficientes, já que apenas aproximadamente 50% dos animais vacinados adquirem proteção satisfatória (Jacobs *et al.*, 2000).

As diversas vacinas em uso são constituídas, em sua maioria, por bacterinas ou subunidades de *S. equi* contendo proteína M ou outras proteínas extracelulares como antígeno vacinal (Flock *et al.*, 2006; Prescott e Timoney, 2007). Embora essas vacinas induzam respostas humorais qualitativa e quantitativamente similares àquelas encontradas em animais convalescentes, não adquirem uma resistência populacional aceitável. Entretanto, observa-se que animais vacinados respondem mais rapidamente e com níveis mais elevados de anticorpos (Jacobs *et al.*, 2000). O monitoramento do nível de proteção imunológica do rebanho a *S. equi* por meio de testes sorológicos parece ser uma alternativa para otimizar ao máximo os resultados da profilaxia vacinal. A técnica de ELISA pode ser utilizada no diagnóstico indireto da enfermidade, bem como ser útil para a determinação da necessidade de vacinação mediante a demonstração do baixo nível de anticorpos séricos (Knowles, 2011).

Um teste imunológico como o “Cell ELISA” de *S. equi* é uma alternativa prática para o diagnóstico da doença e, principalmente, para o monitoramento imunológico do rebanho. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar um “Cell ELISA” como ferramenta de controle do garrotilho.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os equinos utilizados neste trabalho estavam localizados nos municípios de Bagé e Aceguá (31°19'50.3"S; 54°06'03.4"W), Rio Grande do Sul, Brasil, no ano de 2014. Para os

experimentos relacionados ao diagnóstico, foram examinados 11 equinos com sinais clínicos de garrotilho, sendo cinco machos e seis fêmeas, com idades entre quatro meses e 20 anos, das raças Puro Sangue Inglês (PSI), Crioula, e equinos sem raça definida (SRD). Amostras de sangue dos 11 equinos enfermos foram coletadas entre 21 e 28 dias após o início dos sinais clínicos. As amostras de soro foram separadas, acondicionadas em microtubos e armazenadas a -20°C até a realização do ELISA. As secreções nasais dos 11 equinos foram coletadas durante a fase aguda da doença, caracterizada por febre e linfadenopatia. Para a coleta das secreções, foi utilizado *swab* estéril, seguindo-se a técnica descrita por Speirs (1999). As amostras dos equinos foram semeadas em meio ágar sangue base BHI (caldo infusão de cérebro e coração com 2% de ágar e 8% de sangue desfibrinado de ovino) e incubadas a 37°C por 24 horas. As colônias com características de *Streptococcus* foram submetidas ao teste de catalase e à bacterioscopia com coloração de Gram. As colônias catalase negativa constituídas por cocos Gram positivos foram semeadas em trealose, sorbitol e lactose, com adição de 10% de soro equino estéril inativado (60°C por 50min). Foram consideradas colônias de *S. equi* as que não fermentaram açúcares e as que fermentaram apenas trealose.

Para os experimentos de vacinação, foram utilizados 50 potros, entre quatro e cinco meses de idade (PSI), de ambos os sexos. Previamente ao início do protocolo vacinal, todos foram avaliados clinicamente quanto ao estado de saúde. Potros com suspeita clínica de doença foram descartados do trabalho. Em relação ao manejo sanitário, todos haviam recebido vacinação contra Influenza Equina aos dois meses de idade e antiparasitário.

A vacina foi preparada utilizando-se como antígenos três amostras de *S. equi* isoladas e pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), sendo coletadas mediante a punção de abscessos em linfonodos retrofaringeos de equinos com garrotilho. Para a produção da vacina, as cepas de *S. equi* foram cultivadas em meio BHI acrescido de 1% de peptona, a 37°C, durante 18 horas. Em seguida,

as culturas foram centrifugadas, e os sedimentos suspensos em salina estéril e titulados mediante a técnica de diluições seriadas e semeadura em ágar sangue. Para a elaboração da vacina, suspensões bacterianas contendo  $\sim 2,5 \times 10^8$  UFC/mL de culturas de cada cepa foram inativadas por formol (1:5.000), adsorvidas em hidróxido de alumínio a 10% como adjuvante e armazenadas em refrigeração até sua utilização. Os 50 potros foram divididos em dois grupos, vacinados (40 animais) e controles não vacinados (10 animais).

Os potros do grupo vacinado foram vacinados no dia zero (D0) com o volume de 3mL ( $7,5 \times 10^8$ UFC) da vacina pela via intramuscular, enquanto os potros do grupo controle receberam no D0 3mL de solução placebo pela mesma via. As coletas de sangue para aquisição do soro foram realizadas nos dias D0, D14, D21, D51, D111 e D365. No D21, logo após a coleta de sangue, foi realizada a vacinação de reforço. Todos os potros foram monitorados clinicamente quanto a efeitos colaterais da aplicação intramuscular. Os dados foram registrados em fichas individuais para posterior avaliação.

A presença de anticorpos anti-*S. equi* no soro dos equinos foi avaliada por “Cell ELISA”, utilizando-se como antígeno suspensões da cepa de *S. equi* ATCCC n. 9528 ou de um isolado de *S. zooepidemicus* contendo  $\sim 1 \times 10^8$  UFC/mL. Como controles negativos, foram utilizados os soros sanguíneos de 18 neonatos equinos hípidos, privados do colostro materno (30 minutos após o nascimento), da raça PSI. O soro sanguíneo foi separado e armazenado a  $-20^\circ\text{C}$  até a realização do ELISA.

Placas de poliestireno (Cral, Brasil) foram sensibilizadas adicionando-se 100 $\mu\text{L}$  do antígeno diluído 1:10 em tampão carbonato bicarbonato pH 9,6 ( $1 \times 10^6$ UFC) em cada poço, sendo incubadas por três horas a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T (solução salina fosfatada com 0,5% de Tween-20, pH 7,4). Em seguida, foram adicionados, em triplicata, 100 $\mu\text{L}$  de cada soro equino na diluição 1:250 em PBS (solução salina fosfatada, pH 7,4). As placas foram incubadas por uma hora e 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Após, as placas foram lavadas com PBS-T por três vezes e adicionaram-se 50 $\mu\text{L}$  de soro anti-IgG total de equino conjugado com peroxidase na diluição 1:5.000 (Sigma-

Aldrich). A placa foi incubada por 90 minutos a  $37^\circ\text{C}$  e lavadas novamente por três vezes. Para revelação, foram adicionados 100 $\mu\text{L}$  de solução de revelação (4,0mg de ortho-phenylene-diamine em 10mL de tampão fosfato citrato) e 10 $\mu\text{L}$  de água oxigenada 30 vol. A leitura da densidade ótica a 450nm ( $\text{DO}_{450\text{nm}}$ ) foi realizada em leitor de microplacas (Thermo Plate).

Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram  $\text{DO}_{450\text{nm}}$  superior ao ponto de corte determinado pela média de absorbâncias dos controles negativos somadas a três desvios-padrão (Gottstein, 1984). A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para a comparação das triplicatas, e o teste F para análise dos valores médios da  $\text{DO}_{450\text{nm}}$  no “Cell ELISA”. Os dados foram avaliados utilizando-se o *software* Statistix® 8.0 (2003), com o nível de significância de 5%. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Faculdade de Veterinária da UFPel, sob o número 2354-2014.

## RESULTADOS

Em nove equinos com os sinais clínicos característicos de garrotinho, foi possível isolar *S. equi* subsp. *equi*. Em outros dois equinos, foram isolados *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. Em nenhuma das amostras houve isolamento dos dois *Streptococcus* simultaneamente (Tab. 1).

Na avaliação sorológica, que usou os soros coletados entre 21 e 28 dias após o início da doença aguda, os soros dos 11 (100%) equinos enfermos reagiram aos antígenos de *S. equi* utilizado no “Cell ELISA”, com diferenças na densidade ótica em relação ao isolado bacteriano (*S. equi* e *S. zooepidemicus*). A densidade ótica de anticorpos anti-*S. equi* (Fig. 1) variou de 0,578 a 0,812, com média de 0,689 para os equinos com diagnóstico etiológico de *S. equi* (positivos). Em relação aos equinos com isolamento de *S. zooepidemicus*, a variação na densidade ótica foi de 0,423 e 0,432, com média de 0,427. Entretanto, ao se realizar a sorologia que utilizou como antígeno *S. zooepidemicus*, os valores das absorbâncias inverteram, sendo mais altos para o *S. zooepidemicus*. O valor de absorbância para o grupo negativo variou de 0,166 a 0,274, com média de 0,215. Observou-se que os valores médios de absorbâncias dos equinos positivos

“Cell ELISA” como ferramenta...

foram 1,6 e 3,2 vezes superiores ( $P < 0,05$ ) àqueles obtidos em equinos falsos positivos (positivos para *S. zooepidemicus*) e negativos, respectivamente. O “Cell ELISA” apresentou

sensibilidade de 100% e especificidade de 90%, não sendo registrados no teste, equinos falsos negativos.

Tabela 1. Resultados do teste bioquímico de fermentação de açúcares de 11 amostras positivas para *Streptococcus*.

Animal	Trealose	Sorbitol	Lactose	Cepa
Equino 1	-	-	-	<i>S. equi</i>
Equino 2	-	-	-	<i>S. equi</i>
Equino 3	+	-	-	<i>S. equi</i>
Equino 4	-	-	-	<i>S. equi</i>
Equino 5	-	-	-	<i>S. equi</i>
Equino 6	-	-	-	<i>S. equi</i>
Equino 7	-	-	-	<i>S. equi</i>
Equino 8	-	-	-	<i>S. equi</i>
Equino 9	-	-	-	<i>S. equi</i>
Equino 10	+	+	+	<i>S. zooepidemicus</i>
Equino 11	+	+	+	<i>S. zooepidemicus</i>

+: produção de ácido.

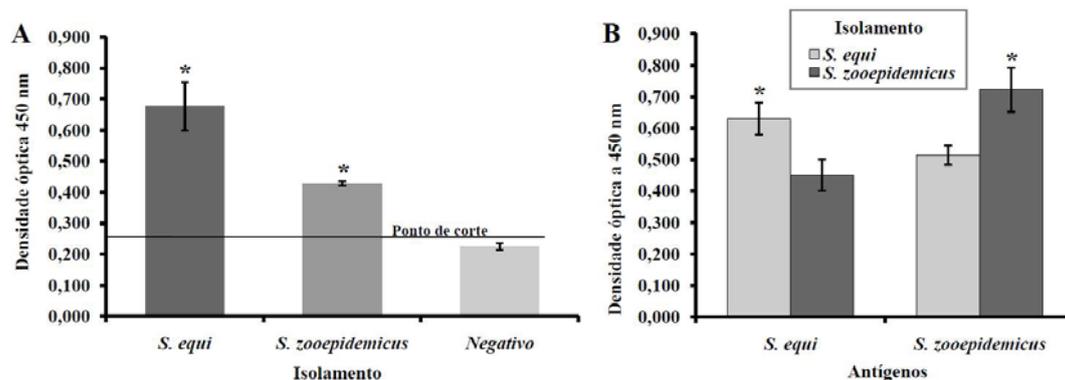


Figura 1. “Cell ELISA” para detecção de anticorpos anti-*Streptococcus*. A) Os dados representam as médias de valores de absorvâncias de equinos com diagnóstico clínico de garrotilho e isolamento de *S. equi* (*S. equi*), falsos positivos com isolamento de *S. zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) e sem sintomas com isolamento negativo para ambos *Streptococcus* (negativo). A linha representa o ponto de corte (média dos negativos mais três desvios-padrão). B) Os dados representam as médias de valores de absorvância de soros de equinos com isolamento de *S. equi* ou *S. zooepidemicus*, os quais utilizaram *S. equi* ou *S. zooepidemicus* como antígenos, e mostram a reatividade cruzada existente entre ambos. Asteriscos significam diferença entre os grupos com  $P < 0,05$ .

Os resultados da dinâmica de anticorpos anti-*S. equi* mediante “Cell ELISA” de potros dos grupos vacinado e controle estão demonstrados na Fig. 2. Foi possível observar que o grupo de potros vacinados apresentou aumento gradual de anticorpos após a primeira vacinação, com acréscimo no valor médio da densidade óptica ( $0,561 \pm 0,06$ ) significativamente superior

( $P < 0,05$ ) ao registrado no grupo controle ( $0,428 \pm 0,03$ ). Nos quatro períodos, D21, D51 e D111, houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) na média da densidade óptica entre os grupos. O valor médio máximo na densidade óptica ( $0,576 \pm 0,05$ ) do grupo vacinado foi registrado em D51, após duas doses da vacina (D0 e D21). Em D111, foi notada discreta queda na média da

densidade óptica ( $0,566\pm 0,04$ ) no grupo dos animais vacinados. Após um ano (D365), os valores médios da densidade óptica entre

vacinados e controles se aproximaram ( $0,413\pm 0,03$  e  $0,408\pm 0,02$ , respectivamente), não havendo diferença estatística entre ambos.

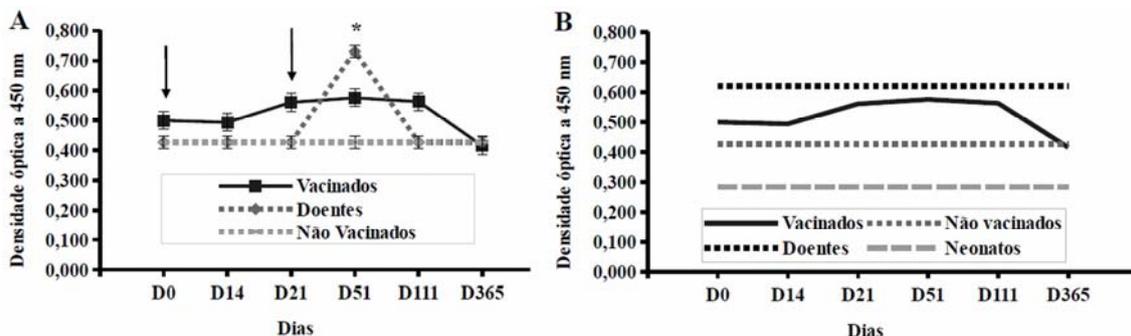


Figura 2. A) "Cell ELISA" de potros vacinados (vacinados, 40 animais), não vacinados que não adoeceram (não vacinados, sete animais) e não vacinados que adoeceram (doentes, três animais) contra *S. equi*. Os dados mostram a dinâmica de anticorpos anti-*S. equi* desses 50 animais. As setas indicam o momento da aplicação das vacinas. Asterisco (\*) mostra que houve diferença estatística entre as médias dos três grupos no dia 51 (D51). B) Tendência dos valores médios de absorvância, que utilizou equinos vacinados contra adenite equina (vacinados), não vacinados que não adoeceram (não vacinados), vacinados que adoeceram (doentes) e neonatos privados de colostro (neonatos).

Três dos 10 potros do grupo controle desenvolveram garrotinho entre D21 e D51. Os potros doentes apresentaram os sinais característicos da doença: febre, secreção nasal purulenta, tosse, linfadenopatia submandibular e retrofaríngea com formação de abscessos. O diagnóstico de certeza de adenite equina foi realizado mediante o isolamento de *S. equi* das secreções nasais. No grupo de vacinados, não foram registradas alterações clínicas compatíveis com garrotinho.

## DISCUSSÃO

O diagnóstico de adenite equina é geralmente realizado de acordo com os sinais clínicos, sendo confirmado pelo isolamento do agente (Timoney, 2004). Foi possível realizar o diagnóstico clínico presuntivo de adenite equina em 100% dos animais com base nos sinais característicos da doença. Entretanto, o diagnóstico etiológico foi confirmado com isolamento de *S. equi* em 82% (9/11) dos casos. O número de isolados de *S. equi* pode ser considerado satisfatório, principalmente quando comparado aos resultados de Moraes (2005), obtidos em amostras de equinos naturalmente infectados, que conseguiu isolar o agente em apenas 37,1% (13/35) dos casos.

A adenite equina pode ser facilmente confundida com outras doenças do trato respiratório superior de equinos, razão pela qual é difícil estimar a prevalência da doença (Schild, 2001). O diagnóstico diferencial deve ser realizado, especialmente para síndromes inespecíficas que cursam com descarga nasal purulenta, como no caso da infecção por *S. zooepidemicus* (Radostits et al., 2002). Esse agente também é frequentemente isolado de cavalos saudáveis, porém pode ser causador de pneumonias e outras enfermidades leves do trato respiratório superior dos equinos (Kowalski, 2000).

O *S. zooepidemicus* foi isolado em 18% (2/11) dos equinos. Esse resultado atenta para a presença do *S. zooepidemicus* em equinos com suspeita de adenite equina e alerta para a necessidade de confirmação laboratorial da etiologia da doença respiratória (Schild, 2001). *S. zooepidemicus* responde melhor que o *S. equi* a tratamentos adotados na rotina clínica equina (Timoney, 2004), entretanto Feary et al. (2005) demonstraram que isolados de *S. zooepidemicus* podem ser resistentes à associação de sulfadiazina e trimetoprim, em alguns casos, com o insucesso da terapia adotada.

A diferenciação fenotípica entre as subespécies de *Streptococcus* é tradicionalmente baseada na

capacidade do microrganismo em produzir ácido por meio da fermentação de açúcares, especialmente lactose, sorbitol e trealose (Kuwamoto *et al.*, 2001). Resultados negativos em todos eles confirmam a presença do *S. equi*, ainda que cepas atípicas possam produzir ácido por meio de alguns desses substratos (Grant *et al.*, 1993). O teste de fermentação de açúcares foi negativo em 73% (8/11) dos isolados que foram caracterizados como cepas típicas de *S. equi*. Em 9% (1/11), a trealose foi fermentada e o isolado caracterizado como cepa atípica de *S. equi*. As demais, 18% (2/11), fermentaram trealose, sorbitol e lactose, sendo classificadas como cepas de *S. zooepidemicus*.

A ocorrência de isolado atípico de *S. equi* no presente estudo ressalta os resultados descritos por diferentes autores. Grant *et al.* (1993) identificaram, entre sete isolados atípicos de *S. equi*, cinco fermentadores de trealose, um fermentador de lactose e um fermentador de lactose e trealose. Cepas atípicas também foram descritas por Moraes (2005) em 38,7% (5/13) das amostras de *S. equi* isoladas de equinos doentes.

Na avaliação sorológica que utilizou os soros coletados entre 21 e 28 dias após o início da doença aguda, observou-se que os equinos com isolamento de *S. equi* (positivos) apresentaram valores de ELISA significativamente superiores às aquelas obtidas pelos falsos positivos. Em geral, durante infecções naturais por *S. equi*, o pico de título sérico de IgG é detectado aproximadamente na terceira semana (Ainsworth, 2010) e permanece elevado durante pelo menos seis meses. Embora com base em um resultado negativo possa se admitir que o estado de portador é improvável, um resultado positivo no ELISA indica uma resposta sorológica à exposição, mas não necessariamente que exista uma infecção atual ou o estado de portador (Knowles, 2011; Ling *et al.*, 2011). Os dados observados no presente estudo corroboram os de Ainsworth (2010) e sugerem ser possível a utilização do ELISA no monitoramento imunológico do rebanho.

Mediante a utilização do ponto de corte como a média da densidade óptica dos controles negativos somada a três desvios-padrão, o teste apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 90%, sem registrar falsos negativos. Esses índices são semelhantes à

maioria dos testes de ELISA utilizados na rotina diagnóstica (Kemp-Symonds *et al.*, 2008). Entretanto, casos de falsos positivos podem ocorrer pela baixa sensibilidade dos testes de ELISA em distinguir respostas imunológicas às vacinas de respostas à infecção natural por *S. equi* (Waller e Jolley, 2007).

Os equinos examinados no presente estudo não foram vacinados nos 12 meses que antecederam as coletas de sangue. A ocorrência de dois casos positivos para *S. zooepidemicus* foi associada provavelmente à reação cruzada a aos antígenos comuns entre *S. equi* e *S. zooepidemicus*. Estes ocorreram, provavelmente, pelo uso de antígenos totais de *S. equi* no “Cell ELISA”; antígenos dessa natureza podem levar ao surgimento de reações cruzadas na presença de epitopos homólogos, especialmente com *S. zooepidemicus* (Chantter *et al.*, 2000; Timoney, 2004). Reações cruzadas entre *S. equi* subsp. *equi* e *S. equi* subsp. *zooepidemicus* são esperadas pelo fato de que os dois agentes são extremamente relacionados, pois partilham mais de 97% do DNA (Timoney, 2004). Entretanto, ao utilizar-se antígeno de *S. zooepidemicus*, foi possível diferenciá-los, com base nos valores médios de DO<sub>450nm</sub>. Dessa forma, a sensibilização de placas contendo os dois agentes facilitaria sua interpretação (Fig. 2).

A detecção de anticorpos anti-*S. equi* por meio de testes sorológicos, há décadas, é consenso como exame auxiliar para o monitoramento do estado imunológico dos rebanhos equinos à exposição ao *S. equi* (Srivastava e Barnum, 1981; Sweeney *et al.*, 2005; Knowles, 2011). No presente estudo, os resultados demonstraram a habilidade do “Cell ELISA” em detectar a condição sorológica natural de potros a campo (não vacinados) e a produção de anticorpos mediante vacinação experimental.

A situação sorológica natural de potros foi retratada com base na avaliação realizada mediante “Cell ELISA” no primeiro dia (D0) de aplicação dos tratamentos. Os potros em D0 apresentaram níveis baixos de anticorpos, todavia superiores aos controles negativos (soros de neonatos). Esse resultado parece ser a condição natural de equinos a campo que sofreram exposição prévia ao *S. equi* (Ainsworth, 2010).

O “Cell ELISA” foi capaz de mostrar a elevação significativa nos níveis de anticorpos anti-*S. equi* nos potros após a vacinação. Tais valores foram superiores ( $P<0,05$ ) aos observados no grupo controle. Esse resultado deve ser considerado porque, apesar de a vacinação comumente não resultar em desenvolvimento de resistência satisfatória à infecção, os equinos vacinados respondem muito mais rápido e com níveis mais altos de anticorpos circulantes que os não vacinados (Sweeney, 1993; Kowalski, 2000; Prescott e Wright, 2000).

No presente estudo, constata-se que os níveis de anticorpos alcançados com a vacinação foram suficientes para assegurar proteção imunológica aos potros durante o período de realização do trabalho, pois a doença não foi observada entre os animais do grupo vacinado. Embora a proteção local mediada por imunoglobulinas secretórias tenha sido considerada a principal defesa contra a infecção por *S. equi* (Sweeney, 1993), equinos resistentes ao garrotilho também devem possuir títulos elevados de anticorpos circulantes (Waller e Jolly, 2007).

Notou-se que os níveis superiores ( $P<0,05$ ) de anticorpos observados em alguns animais do grupo de potros não vacinados estavam associados ao desenvolvimento de garrotilho. Os casos dessa enfermidade, confirmados durante o presente estudo, ocorreram em três potros do grupo controle entre os D21 e D51. Os soros dos demais animais do grupo controle apresentaram médias de densidade óptica nesses períodos significativamente inferiores ( $P<0,05$ ) ao grupo dos animais vacinados. Assim, sugere-se que os potros do grupo controle estavam suscetíveis ao desenvolvimento da doença. Estudos anteriores descreveram a relação entre o baixo nível de anticorpos séricos e a suscetibilidade do rebanho devido ao inadequado grau de proteção imunológica (Srivastava e Barnum, 1985; Timoney, 1999). Consoante Sweeney *et al.* (2005), o ELISA pode ser indicado para monitorar o grau de proteção do rebanho e, assim, identificar o nível de anticorpos que tende a tornar os potros suscetíveis ao desenvolvimento da doença.

A curta persistência dos anticorpos circulantes é um fator limitante para as vacinas comerciais (Sweeney, 1993; Moraes, 2005). Foi observado início da perda de proteção imunológica aproximadamente entre D51 e D111 após a primeira dose da vacina. Na avaliação aos 365 dias, os valores médios de anticorpos séricos dos grupos avaliados se aproximaram, sem diferença significativa entre eles.

Os resultados mostraram que, em um programa de vacinação, deve ser considerada a necessidade de reforço vacinal trimestral para que sejam conferidos níveis de anticorpos protetores ao rebanho, especialmente em áreas de risco. Os programas de vacinação contra garrotilho não permitem um controle satisfatório em condições de campo, e isso se deve, em parte, à não duradoura persistência de anticorpos séricos induzidos pelas vacinas inativadas (Nally, 2000).

Os resultados do presente estudo demonstraram que o “Cell ELISA” pode ser um teste importante para avaliação de animais vacinados contra garrotilho. Com base na avaliação da dinâmica de anticorpos anti-*S. equi* em potros pós-vacinação, foi possível determinar o momento de maior produção de anticorpos, bem como o decréscimo nos níveis séricos. Os resultados obtidos neste estudo são bastante promissores, porém o número de animais utilizado representa uma limitação do estudo. Entretanto, esse resultado deve auxiliar as decisões nos programas de imunização contra a adenite equina.

## CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos neste estudo, demonstrou-se que, com a utilização do “Cell ELISA”, é possível a diferenciação de classes de animais, tais como: doentes, portadores, vacinados e negativos. O teste também foi eficiente no monitoramento vacinal dos animais, mostrando-se, dessa forma, como uma ferramenta auxiliar na rotina médica equina, que pode contribuir para as decisões de gestão em programas de controle da adenite equina.

## REFERÊNCIAS

- AINSWORTH, D.M. Caught in the middle of a strangles outbreak — review of the diagnostic and management procedures. In: PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS - FOCUS MEETING FOCUS ON UPPER AND LOWER RESPIRATORY DISEASES, 2010, Salt Lake City. *Proceedings...* Salt Lake City: [s.n.], 2010. p.49-53.
- CHANTER, N.; TALBOT, N.C.; NEWTON, R. *et al.* *Streptococcus equi* with truncated M-proteins isolated from outwardly healthy horses. *Microbiology*, v.146, p.1361-1369, 2000.
- FEARY, D.J.; TRAUB-DARGATZ, J.L.; HYATT, D. *et al.* Investigation of reported resistance of *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* to trimethoprim-sulfa in horses. In: PROCEEDINGS OF THE ANUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 51., 2005, Seattle. *Proceedings...* Seattle: AAEP, 2005. p.2623-1205.
- FLOCK, M.; KARLSTROM, A.; LANNERGARD, J. *et al.* Protective effect of vaccination with recombinant proteins from *Streptococcus equi* subspecies *equi* in a strangles model in the mouse. *Vaccine*, v.24, p.4144-4151, 2006.
- GOTTSTEIN, B. An immunoassay for the detection of circulating antigens in human echinococcosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.33, p.1185-1191, 1984.
- GRANT, S.T.; EFSTRATION, A.; CHANTER, N. Laboratory diagnosis of strangles and the isolation of atypical *Streptococcus equi*. *Vet. Rec.*, v.133, p.215-216, 1993.
- JACOBS, A.A.; GOOVAERTS, D.; NUIJTEN, P.J. *et al.* Investigations towards an efficacious and safe strangles vaccine: submucosal vaccination with a live attenuated *Streptococcus equi*. *Vet. Rec.*, v.20, p.563-567, 2000.
- KEMP-SYMONDS, J.; BUTCHER, N.; MITCHELL, Z. *et al.* Epidemiology of *Streptococcus equi* carriers and the development of diagnostic ELISAS for strangles: preliminary findings. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION, 10., 2008, Moscow, *Proceedings...* Moscow: WEVA, 2008. p.431.
- KNOWLES, E.J. Serological ELISA Test for *Streptococcus equi* (strangles). *Defra Equine Quart. Dis. Surveil. Rep.*, v.7, p.11-12, 2011.
- KNOWLES, E.J.; MAIR, T.S.; BUTCHER, N. *et al.* Use of a novel serological test for exposure to *Streptococcus equi* subspecies *equi* in hospitalised horses. *Vet. Rec.*, v.166, p.294-297, 2010.
- KOWALSKI, J.J. Mecanismo da doença Infeciosa. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. (Eds.). *Medicina interna equina*. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000. p.54-56.
- KUWAMOTO, Y.; ANZAI, T.; WADA, R. Microplate sugar-fermentation assay distinguishes *Streptococcus equi* from other streptococci of lancefield's group C. *J. Equine Sci.*, v.12, p.47-49, 2001.
- LING, A.S.G.; UPJOHN, M.M.; WEBB, K. *et al.* Seroprevalence of *Streptococcus equi* in working horses in Lesotho. *Vet. Rec.*, p.169-172, 2011.
- MORAES, C.M. *Caracterização fenotípica de Streptococcus equi e estimativa da reatividade cruzada de cepas isoladas de equinos da região sul do Rio Grande do Sul*. 2005. 40f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, RS.
- NALLY, J.E.; ARTIUSHIN, S.; SHEORAN, A.S. *et al.* Induction of mucosal and systemic antibody specific for SeMF3 of *Streptococcus equi* by intranasal vaccination using a sucrose acetate isobutyrate based delivery system. *Vaccine*, v.19, p.492-497, 2000.
- PRESCOTT, J.; WRIGHT, B. Strangles in horses. Ontario: Ministry of Agriculture and Food. 2000. Available in: <<http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/horses/facts/03-037.htm>>. Accessed in: 01 dez. 2016.

- PRESCOTT, J.F.; TIMONEY, J.F. Could we eradicate strangles in equids? *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.231, p.377-378, 2007.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. et al. (Eds.). *Doenças causadas por bactérias clínica veterinária – um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos*. Rio de Janeiro: Guanabara, 2002. p.632-636.
- SCHILD, A.L. Infecção por *Streptococcus equi* (Garrotilho). In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C.; LEMOS, R.A.A. (Eds.). *Doenças de ruminantes e equinos*. São Paulo: Varela, 2001. v.1, p.265-269.
- SPEIRS, V.C. (Ed.). *Exame clínico de equinos*. Porto Alegre: Artmed, 1999. 366p.
- SRIVASTAVA, S.K.; BARNUM, D.A. Studies on the immunogenicity of *Streptococcus equi* vaccines in foals. *Can. J. Comp. Med.*, v.49, p.351-356, 1985.
- SRIVASTAVA, S.K.; BARNUM, D.A. The serological response of foals to vaccination against strangles. *Can. J. Comp. Med.*, v.45, p.20-25, 1981.
- SWEENEY, C.R. *Streptococcus equi*. In: SMITH, B.P. *Tratado de medicina interna de grandes animais*. São Paulo: Manole, 1993. p.531-533.
- SWEENEY, C.R.; TIMONEY, J.F.; NEWTON, J.R. et al. Consensus Statement - *Streptococcus equi* infections in horses: Guidelines for treatment, control and prevention of Strangles. *J. Vet. Int. Med.*, v.19, p.123-134, 2005.
- TIMONEY, J.F. Equine Strangles. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS. 45., 1999, Lexington. *Proceedings...* Lexington: editora, 1999. p.31-38.
- TIMONEY, J.F. The pathogenic equine streptococci. *Vet. Res.*, v.35, p.397-409, 2004.
- WALLER A.S.; JOLLEY K.A. Getting a grip on strangles: recent progress towards improved diagnosis and vaccines. *Vet J.*, v.173, p.492-501, 2007.