

Evento: XXVII Seminário de Iniciação Científica - BOLSISTAS DE GRADUAÇÃO UNIJUI

**PADRONIZAÇÃO DE CULTIVO DE STREPTOCOCCUS EQUI SUBESPÉCIE
EQUI PARA POSTERIOR PRODUÇÃO DE UM IMUNÓGENO CONTRA
ADENITE EQUINA (GARROTILO): DADOS PARCIAIS¹
STANDARDIZATION OF STREPTOCOCCUS EQUI SUBSPECIES EQUI
CULTURE FOR SUBSEQUENT PRODUCTION OF AN IMMUNOGEN
AGAINST EQUINE ADENTITIS (BOTTLE): PARTIAL DATA**

Marcos Alexandre De Azevedo², Felipe Libardoni³

¹ Projeto de pesquisa de iniciação científica do curso de medicina veterinária da Unijuí.

² Estudante de Medicina Veterinária. Bolsista de Iniciação Científica PIBIC/UNIJUI.

³ Prof. Dr. do Departamento de Estudos Agrários. Orientador.

Introdução

A Adenite equina, popularmente conhecida como garrotilho, é a principal doença do trato respiratório superior de equinos (SLATER 2007), e é causada por uma bactéria Gram positiva (*Streptococcus equi* subsp. *S. equi*), b-hemolítica pertencente ao grupo C de Lancefield. *S. equi* está intimamente relacionado ao seu ancestral *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*), um comensal do trato respiratório dos equinos que pode ocasionar infecções oportunistas (HOLDEN et al 2009).

Equinos acometidos por essa doença apresentam sinais clínicos típicos de um processo infeccioso generalizado, tais como depressão, inapetência e febre. Associado a esses, os animais também apresentam secreção nasal, inicialmente serosa, que passa à muco purulenta e à purulenta em alguns dias, tosse com catarro, dor à palpação da região mandibular e aumento de volume de linfonodos, principalmente submandibulares e retrofaríngeos. Além disso, o pescoço permanece em posição estendida devido à dor na região da laringe e faringe e a dificuldade respiratória (SWEENEY, 1993; AINSWORTH & BILLER, 2000).

Dentre os fatores de virulência da bactéria, tem especial importância a proteína M, de 58 kDa, codificada pelo gene *seM* (HARRINGTON et al., 2002). A proteína M (*SeM*) é um antígeno fimbrial de superfície produzida por *S. equi* que caracteriza um importante incremento na sua virulência em relação a *S. zooepidemicus*. *SeM* se liga ao fibrinogênio e as imunoglobulinas G (IgG) inibindo a deposição de C3b do complemento na superfície da bactéria, resultando em uma ação antifagocítica (BOSCHWITZ 1994; MEEHAN 2001).

Estudos moleculares demonstram diferenças (mutações) na sequência do gene codificador da proteína M, localizadas na região N-terminal (CHANTER 2000; IJAZ et al., 2011). Esta região do gene *seM* já foi utilizada na diferenciação de isolados (ANZAI, 2005) e na identificação de fontes de surtos, inclusive no Brasil (LIBARDONI, 201X). Além disso, foram evidenciadas mudanças nas frequências alélicas entre cepas em um determinado período, indicando pressão de seleção nesses

Evento: XXVII Seminário de Iniciação Científica - BOLSISTAS DE GRADUAÇÃO UNIJUI

isolados e maior frequência de alguns em rebanhos de equinos, sugerindo que dentre essas diferentes cepas, pode-se ter falha de proteção de imunidade cruzada. (KELLY, 2006; IVENS et al., 2011 LIBARDONI, 201X). Portanto, essa ferramenta é considerada útil para a elucidação da epidemiologia de adenite a nível regional e nacional.

Devido à importância do melhor entendimento da adenite equina e do seu agente etiológico, associada à ausência de estudos referentes a variações de resposta imune associadas aos diferentes alelos da proteína M de isolados brasileiros, este estudo que demonstra resultados parciais e objetivou avaliar a padronização de cultivo de *Streptococcus equi* subespécie equi para posterior produção de uma vacina contra adenite equina (garrotilho) com cada um dos alelos, para posterior realização de testes de resposta imunológica cruzada entre os alelos.

Material e Métodos

Inicialmente foram ressuspensas amostras de cepas de *S. equi* que já foram isoladas de equinos com adenite equina da região sul do Brasil e que estavam liofilizadas e armazenadas a -80°C . Essas cepas já foram caracterizadas de acordo com os alelos do gene seM.

De acordo com a Instrução Normativa 31.2003 do Ministério da Agricultura (MAPA, 2003) que regulamenta a produção de vacinas autógenas, modelo utilizado no projeto, foi preparado um inóculo de *S. equi* diluído em 1mL solução salina estéril com concentração 0,5 na escala de McFarland (MACFADDIN, 2000) e adicionado ao meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB) para posterior incubação à 37°C sob agitação orbital de 30 rotações por minuto (RPM).

Foi acompanhado o crescimento dessa cultura bacteriana por 24 horas, onde foram realizados testes de densidade óptica (OD) a cada 4 horas com leitura em espectrofotômetro, e em paralelo, no mesmo momento, feito o cultivo microbiológico para contagem bacteriana em placas e caracterização da curva de crescimento de *S. equi*.

Resultados parciais e discussão

Os resultados desse trabalho são de dados parciais obtidos a partir do cultivo microbiológico e caracterização da curva de crescimento de *S. equi* em meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB). De acordo com os resultados obtidos, observou-se que entre as 4 e 8 horas de crescimento bacteriano, houve uma passagem da fase de crescimento denominada LAG, que representa o período necessário para adaptação das células ao novo ambiente de cultivo e as células aumentam no volume total em quase duas ou quatro vezes, mas não se dividem, para a fase de LOG, caracterizada por um crescimento exponencial de divisão das células a uma taxa geométrica constante até atingir um máximo de crescimento e entrar na fase denominada estacionária (QUINN et al., 2001).

De acordo com os dados obtidos, a entrada na fase estacionária ocorreu por volta das 16 horas de cultivo do *S. equi*, em que foram verificadas densidades óticas (OD) entre 0,8-0,9. Nessa fase, ocorre um rápido decréscimo na taxa de divisão celular, e o número total de células em divisão

Evento: XXVII Seminário de Iniciação Científica - BOLSISTAS DE GRADUAÇÃO UNIJUI

será igual ao número de células mortas, resultando na verdadeira população celular estacionária (QUINN et al., 2001). Essa população de células bacterianas, de acordo com as contagens ficou em $\log_{10} 9$ UFC/mL. Logo, para a produção de um imunógeno, de acordo com esses dados, recomenda-se que ele seja produzido com por volta de 16 horas de cultivo, e densidade ótica (OD) de 0,8-0,9.

Por tudo isso, os resultados parciais obtidos a partir do cultivo microbiológico e caracterização da curva de crescimento de *S. equi* em meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB), demonstrados nesse trabalho de padronização das curvas de crescimento são extremamente importantes para posterior produção de imunógenos de diferentes alelos a serem testados por reatividade sorológica cruzada, e elucidação da importância dessa região variável da proteína M do ponto de vista imunológico.

Conclusão

De acordo com os dados obtidos, entre 4-8 horas de cultivo em meio TSB líquido, *S. equi* entra em fase logarítmica de multiplicação, passando a fase estacionária com cerca de 16 horas de cultivo.

Palavras Chave: vacina; imunologia; Trato respiratório;

Keywords: vaccine; immunology; respiratory tract

Agradecimentos: Ao Programa de Iniciação Científica da Unijuí e ao professor Dr. Felipe Libardoni pelo apoio e orientação ao trabalho de pesquisa científica.

Referências bibliográficas

ANZAI, T. et al. Variation in the N-terminal region of an M-like protein of *Streptococcus equi* and evaluation of its potential as a tool in epidemiologic studies. *American Journal of Veterinary Research*, v. 66, p. 2167-2171, 2005.

BOSCHWITZ, J. S.; TIMONEY, J. F. Inhibition of C3 deposition on *Streptococcus equi* subsp. *equi* by M protein: a mechanism for survival in equine blood. *Infection and Immunity*, v. 62, n. 8, p. 3515-3520, 1994.

CHANTER, N. et al. *Streptococcus equi* with truncated M-proteins isolated from outwardly healthy horses. *Microbiology*, v. 146, p. 1361-1369, 2000.

HOLDEN, M. T. G. et al. Genomic evidence for the evolution of *Streptococcus equi*: host restriction, increased virulence, and genetic exchange with human pathogens. *PLoS Pathogens*, v. 5, n. 3, 2009.

KELLY, C. et al. Sequence variation of the SeM gene of *Streptococcus equi* allows discrimination of the source of strangles outbreaks. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 2, p. 480-486, 2006.

Evento: XXVII Seminário de Iniciação Científica - BOLSISTAS DE GRADUAÇÃO UNIJUI

MACFADDIN, J. F. Biochemical testes for identification of medical bacteria, 3ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 912p.

MEEHAN, M. et al. The fibrinogen-binding protein (FgBP) of *Streptococcus equi* subsp. *equi* additionally binds IgG and contributes to virulence in a mouse model. *Microbiology*, v. 147, p. 3311-3322, 2001.

QUINN, P. J., et al. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2ed. Wiley-Blackwell, 912p. 2011.

SLATER, J. Bacterial infections of the equine respiratory tract. In *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. Eds MCGORUM, B. C. et al. Saunders. P. 327-337, 2007.