

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Utilização da proteína EMA-2 recombinante de *Theileria equi*, expressa em
Pichia pastoris, como imunobiológico**

Ana Muñoz Vianna

Pelotas, 2016

Ana Muñoz Vianna

**Utilização da proteína EMA-2 recombinante de *Theileria equi*, expressa em
Pichia pastoris, como imunobiológico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Fábio Pereira Leivas Leite
Co-orientador: Rodrigo Casquero Cunha

Pelotas, 2016

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz Vaggetti Vieira – CRB 10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

V617u Vianna, Ana Muñoz

Utilização da proteína EMA-2 recombinante de *Theileria equi* expressa em *Pichia pastoris* como imunobiológico / Ana Muñoz Vianna. – 82f. : il. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária. Pelotas, 2016. – Orientador Fábio Pereira Leivas Leite; co-orientador Rodrigo Casquero Cunha.

1.Veterinária. 2. *Theileriose equina*. 3.ELISA. 4.Proteína recombinante. 5.Imunodiagnóstico. I.Leite, Fábio Pereira Leivas. II. Cunha, Rodrigo Casquero. III. Título.

CDD: 636.1

Ana Muñoz Vianna

**Utilização da proteína EMA-2 recombinante de *Theileria equi*, expressa em
Pichia pastoris, como imunobiológico**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências,
Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária,
Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 25/02/2016

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (orientador)
Doutor em Sanidade Animal pela Universidade de Wiscosin – Madison (EUA)

Prof. Dr. Fabricio Rochedo Conceição
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Leandro Quintana Nizoli
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Luciana Farias da Costa de Avila
Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pelotas

**Dedico esse trabalho à minha família que com seu apoio
permitiu que eu conseguisse cumprir essa jornada.**

Agradecimentos

Agradeço ao meu marido Carlos e aos meus filhos, Nathalia e Rodrigo, pelo amor, companheirismo, incentivo e paciência. Aos meus pais, irmãos e demais familiares pelo incentivo e força que sempre me proporcionaram.

Muito obrigada ao meu Orientador Professor Dr. Fábio Pereira Leivas Leite pela confiança, compreensão, paciência e amizade e ao meu co-orientador Dr. Rodrigo Cunha pela paciência e ensinamentos e aos demais professores do programa, que sempre estiveram prontos para dar sugestões e explicações sobre o projeto.

Um agradecimento especial à amiga e colega Ana Paula e à professora Luciana Avila pelo companheirismo, auxílio e amizade e aos demais integrantes do laboratório de Parasitologia Molecular (Lab. XI) Jessica, Rômulo e Cleomar. Agradeço também ao agora mestrando Guilherme pelo auxílio prestado e a confiança em mim depositada ao me convidar para ser sua orientadora de estágio.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia (Lab.4 – Biotecnologia) Denis, Alceu, Renan, Lívia, Vitória, Yasmine, Jorge, Pedro, Iuri, Tábata, Carolina e Paulo Ricardo muito obrigado por sempre me atenderem e auxiliado.

Agradeço também às Professoras Elizabete Berne e Daniela e aos colegas dos respectivos laboratórios que me auxiliaram nas mais diversas etapas do trabalho. Aos professores Fabricio Conceição e Leandro Nizoli pelas participações em minhas bancas de qualificação e de defesa de tese e ao apoio dado sempre que necessitei.

Um agradecimento especial aos colegas do Hospital Veterinário pelo fornecimento de material e o auxílio no manuseio dos animais.

Muito obrigada!

“Se queremos progredir, não devemos repetir a história, mas fazer uma história nova” (Mahatma Gandhi).

Resumo

VIANNA, Ana Muñoz. **Utilização da proteína EMA-2 recombinante de *Theileria equi* expressa em *Pichia pastoris*, como imunobiológico**. 2016. 82f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

A theileriose, doença endêmica no Brasil, é uma piroplasmose causada pelo protozoário intraeritrocitário, *Theileria equi*. Provoca perdas associadas tanto a fatores clínicos como a restrição ao trânsito de animais soropositivos. A transmissão de *T. equi* ocorre principalmente no repasto do carrapato, o qual inocula suas formas infectantes (esporozoítos) nos equídeos, que são os hospedeiros vertebrados. O diagnóstico e a prevenção desta enfermidade se fazem necessários em áreas endêmicas e não endêmicas devido à disseminação dos vetores e do protozoário e de sua alta prevalência. Diferentes plataformas de ELISAs têm sido desenvolvidas com a utilização de antígenos recombinantes. A proteína de superfície de merozoíto EMA-2 é liberada no citoplasma e na membrana do eritrócito, sugerindo ser um dos primeiros antígenos reconhecidos pelo sistema imune. O objetivo desse estudo foi avaliar a proteína EMA-2 de *Theileria equi*, expressa em *Pichia pastoris*, como imunobiológico. Após expressão da glicoproteína EMA-2 foi desenvolvido um ELISA indireto. O ELISA demonstrou sensibilidade de 90,9% e especificidade de 83,3% quando comparado ao kit comercial de cELISA. A proteína também demonstrou imunogenicidade ao testarmos soros de camundongos imunizados com EMA-2 recombinante, por imunofluorescência. Sendo a proteína EMA-2 antigênica e imunogênica, poderá ser usada, além dos testes de diagnóstico, como antígeno para o desenvolvimento de vacinas de subunidade.

Palavras-chave: ELISA; imunodiagnóstico; proteína recombinante; theileriose equina

Abstract

VIANNA, Ana Muñoz. **Use of the recombinant EMA-2 protein of *Theileria equi* expressed in *Pichia pastoris*, as immunobiological.** 2016. 82f. Theses (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Theileriosis, endemic disease in Brazil, is a piroplasmosis caused by intra-erythrocytic protozoan, *Theileria equi*. Causes losses associated with both clinical factors and restriction on the movement of positive animals. Transmission of *T. equi* occurs mainly during tick feeding which inoculates their infective forms (sporozoites) in horses, which are the vertebrate hosts. The diagnosis and prevention of this disease is needed in endemic and non endemic areas due to the presence of vectors and protozoa. Different ELISAs platforms have been developed using recombinant antigens. EMA-2 is released into the cytoplasm and erythrocyte membrane, suggesting that one of the first antigens recognized by the immune system. The aim of this study was to evaluate the EMA-2 protein of *Theileria equi*, expressed in *Pichia pastoris*, as immunobiological. After expression of EMA-2 glycoprotein, an indirect ELISA was developed. The ELISA demonstrated sensitivity of 90.9% and specificity of 83.3% when compared to the commercial kit cELISA. The protein also showed immunogenicity when test the sera of immunized mice with recombinant EMA-2 by immunofluorescence. As the EMA-2 protein antigenic and immunogenic, it may be used diagnostic tests as well as a promising antigen for the development of subunit vaccines.

Keywords: ELISA; immunodiagnosis; recombinant protein; equine theileriose

Lista de Figuras

Artigo de Revisão

Figura 1	ELISA indireto com rEMA-2.....	29
----------	--------------------------------	----

Artigo 1

Figura 2	Análise ROC do ELISA, IFAT comparando com ELISA padrão.....	45
Figura 1	A- <i>Western Blot</i> da proteína rEMA com anticorpo anti-histidina.....	46
	B- <i>Western Blot</i> da proteína rEMA com soro equino positivo para theileriose equina.....	46

Artigo 2

Figura 1	rEMA-2 Dot blot of serum from positive horse (naturally infected) for theileriosis.....	64
Figura 2	A- rEMA-2 Western blot probed with serum from horse naturally infected with <i>Theileria equi</i>	65
	B- rEMA-2 Western blot probed with monoclonal antibody – anti-polyhistidine.....	65
Figura 3	rEMA-2 ELISA.....	66
Figura 4	Immunogenicity of rEMA-2 protein – mice serum	
	1- Indirect Immunofluorescence.....	67
	2- Indirect ELISA.....	67

Lista de Abreviaturas e Siglas

AOX	Álcool Oxidase
BFS	<i>Bovine Fetal Serum</i> (Soro Fetal Bovino)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina Sérica Bovina)
cELISA	<i>Competitive Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Ensaio Imunoenzimático competitivo)
CFT	<i>Complement Fixation Test</i> (Teste de Fixação de Complemento)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos
DO	Densidade Ótica
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Ensaio Imunoenzimático)
EMA	<i>Equi Merozoite Antigen</i> (Equi Merozoíto Antígeno)
His	Histidina
IFAT	<i>Indirect Immunofluorescence Test</i> (Teste de Imunofluorescência indireta)
LB	Luria Bertani
MAbs	<i>Monoclonal Antibodies</i> (Anticorpos monoclonais)
MUT ⁺	<i>Methanol utilization plus</i> (Utilização rápida de metanol)
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
qPCR	<i>Quantitative Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa)
rEMA-2	<i>Recombinant Equi Merozoite Antigen</i> (Equi Merozoíto Antígeno recombinante)
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Dodecilsulfato de sódio- <i>Polyacrylamide Gel electrophoresis</i>

Símbolos

KDa	kiloDaltons
mL	Mililitro
μ L	Microlitro
μ g	Micrograma
μ m	Micrometro
ng	Nanograma

Sumário

1 Introdução.....	12
2 Revisão de Literatura.....	16
2.1 Artigo de Revisão.....	16
3 Hipótese.....	39
4 Objetivos.....	40
4.1 Objetivo Geral.....	40
4.2 Objetivos Específicos.....	40
5 Artigos.....	41
5.1 Artigo 1.....	41
5.2 Artigo 2.....	49
6 Patente.....	68
7 Considerações Finais.....	70
Referências.....	71
Anexos.....	81

1 Introdução

O Brasil possui o maior rebanho de equinos na América Latina e o terceiro mundial. São 8 milhões de cabeças de equídeos, se somados aos muares (mulas) e asininos (asnos), movimentando R\$ 7,3 bilhões somente com a produção de cavalos (MAPA, 2015). Usado como meio de transporte durante muitos anos e atualmente tendo como principal atividade o trabalho agropecuário, os equídeos têm conquistado outras áreas de atuação como lazer, esportes e terapia (MAPA, 2015). Algumas enfermidades ainda causam grandes prejuízos à criação de equídeos no Brasil, mesmo com as constantes melhoras na sanidade. Entre estas enfermidades destacamos a theileriose equina, piroplasmose com alta morbidade e prevalência de até 82% em certas áreas (SANTOS et al., 2011) FRIEDHOFF, 1990). Há restrições importantes ao trânsito de animais soropositivos, havendo dificuldade na reunião de documentos legais para a exportação para países livres da doença ou a participação em provas equestres internacionais (FRIEDHOFF, 1990; RONCATI et al., 2011; MALEKIFARD et al., 2014).

A theileriose equina é ocasionada pelo protozoário intracelular *Theileria equi* e é considerada a mais importante doença dos equinos transmitida por carrapatos em regiões tropicais e subtropicais (SCHEIN, 1988; ALANAZI et al., 2014). A transmissão de *T. equi* ocorre no repasto do carrapato, inoculando suas formas infectantes (esporozoítos). Uma vez no hospedeiro, os esporozoítos penetram nos macrófagos e linfócitos antes de infectarem os eritrócitos (UILENBERG, 2006; RAMSAY et al., 2013). Infecções por *T. equi* caracterizam-se pelo desenvolvimento de anemia hemolítica progressiva nos animais infectados, sendo a patogenia da enfermidade determinada principalmente pela lise de eritrócitos durante a invasão e multiplicação do parasito (KNOWLES et al., 1994; LORDING, 2008). Os sinais clínicos variam de quadro assintomático a agudo. Neste último, os animais apresentam febre, anemia, hemoglobinúria, edema, dispneia, perda do desempenho atlético, aborto e até óbito (ZOBBA et al., 2008; RONCATI et al., 2011). Nos casos agudos a morte pode ocorrer de 1 a 4 semanas após o início dos sinais clínicos. Nos casos crônicos (assintomáticos) e sub crônicos, mesmo com aparência saudável,

equinos podem portar o parasito em seu sangue por muitos anos e são eles, juntamente com os vetores, os responsáveis pela manutenção da infecção (SCHEIN, 1988; BAHRAMI et al., 2014). Potros nascidos em áreas endêmicas recebem anticorpos maternos pelo colostro e à medida que os perdem desenvolvem forte imunidade ativa que dependerá da presença constante dos vetores e protozoários (RONCATI et al., 2011).

Theileria equi pode ser transmitida naturalmente por três diferentes gêneros de carrapatos da família Ixodidae (*Dermacentor* sp. *Rhipicephalus* sp. e *Hyalomma* sp.). A transmissão transplacentária também pode ocorrer o que se torna um sério problema devido às éguas infectadas serem portadoras por toda a vida (BAHRAMI et al., 2014.). A theileriose ainda pode ser transmitida iatrogenicamente, isto é, através do uso comum de seringas e agulhas contaminadas (DE WAAL & VAN HEERDEN 2004). Os carrapatos vetores encontram-se espalhados em diversos locais, assim como os equinos portadores de *T. equi*, por isso a prevenção e o diagnóstico dessa infecção se fazem necessários, tanto em áreas endêmicas como em não endêmicas (HUANG et al., 2003).

Animais infectados por *T. equi* desenvolvem uma imunidade que os protege contra a doença clínica no caso de re-exposições ao parasito. Esta proteção tem sido atribuída à contínua estimulação do sistema imune por parasitos que persistem no organismo durante a fase crônica da enfermidade (SCHEIN, 1988). Respostas imunes adquiridas são necessárias para controlar a parasitemia e, após a lise dos eritrócitos, os parasitos tornam-se acessíveis aos anticorpos e aos mecanismos imunes mediados por estes (KNOWLES et al., 1994; CUNHA et al., 2006). No entanto, somente elevados títulos de anticorpos não são capazes de protegerem contra infecções por *Theileria* (CUNHA et al., 2006).

Atualmente, não há vacina disponível para a theileriose equina e as opções de tratamentos não têm sido efetivas (BAHRAMI et al., 2014). Uma variedade de drogas não específicas a *T. equi* (imidocarb, tetraciclina, diminazeno e buparvaquone) são utilizados para o tratamento da theileriose. As drogas, no entanto, podem melhorar os sinais clínicos, mas não eliminam completamente o parasito (DE WAAL & VAN HEERDEN, 1994; BAHRAMI et al., 2014).

Theileriose pode ser diagnosticada por diversos métodos como: Esfregaços sanguíneos corados por Giemsa, CFT (Teste de Fixação do Complemento), IFAT (Teste de Imunofluorescência Indireta), PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e

ELISA (Ensaio Imunoenzimático) utilizando lisados do parasito (HUANG et al., 2006; ALAZANI et al., 2014). O CFT apresenta muitas limitações, incluindo baixa sensibilidade e quando comparado ao IFAT apresenta menor sensibilidade. Os soros mantêm-se positivos por IFAT por um período superior ao CFT (HUANG et al., 2006).

Animais portadores de *T. equi* são melhores identificados testando seus soros para a presença de anticorpos específicos (OIE, 2014), por isso outros métodos de diagnóstico têm sido propostos para aumentar a detecção de equinos portadores (BALDANI et al., 2011). Atualmente o diagnóstico de theileriose tem se baseado em métodos sorológicos que incluem: cELISA, IFAT (OIE, 2014) e métodos moleculares como qPCR (ALANAZI et al., 2014).

Animais infectados com *T. equi* respondem com altos títulos de anticorpos contra proteínas de superfície de merozoítos (KNOWLES et al., 1994). Os antígenos de superfície de merozoítos desempenham papéis importantes no reconhecimento e na penetração do parasito nos eritrócitos hospedeiros, o que os torna alvos das respostas imunes (KUMAR et al., 2004; NIZOLI et al., 2009). Baseado nessas afirmações os estudos de diagnóstico imunológico para theileriose concentram-se na obtenção de frações antigênicas dessas proteínas de superfície (KAPPMAYER et al., 1993; KNOWLES et al., 1994).

Em *T. equi* duas proteínas de superfície de merozoítos, equi merozoítos antígeno (EMAs): EMA-1 (34 kDa) e EMA-2 (30 kDa) foram identificadas como os antígenos imunodominantes (KAPPMAYER et al., 1993). EMA-1 e EMA-2 têm 52% de identidade entre os seus aminoácidos. Em estudo anterior Kumar et al. (2004) mostraram que tanto a proteína EMA-1 quanto EMA-2 são expressas em diferentes estágios do ciclo do parasito, extra e intraeritrocitário. Entretanto, EMA-2 está presente no citoplasma e na membrana dos eritrócitos, sugerindo ser um dos primeiros antígenos a serem reconhecidos pelo sistema imune (KUMAR et al., 2004). Não foi demonstrado, até o momento, que a proteína EMA-2 tenha diversidade genética em comparação com as sequências depositadas no GenBank (VIANNA et al., 2014), sendo considerada altamente conservada em todo o mundo (KUMAR et al., 2013).

A proteína EMA-2 de *T. equi* tem sido expressa em diferentes sistemas de expressão, como por exemplo, Baculovírus (TANAKA et al., 1999); *Escherichia coli* (HUANG et al., 2003; KUMAR et al., 2013); *Pichia pastoris* (VIANNA et al., 2014).

Por ser um organismo eucarioto simples, *P. pastoris* proporciona a expressão de proteínas com modificações pós-traducionais além de secretar as proteínas heterólogas de forma solúvel no meio, simplificando etapas de purificação. As proteínas são expressas sob controle de um promotor induzível, evitando danos celulares pela toxicidade de algumas proteínas e permitindo a obtenção de uma grande quantidade celular antes do início da expressão proteica (CEREGHINO & CREGG, 2000). Falhas no dobramento das proteínas podem esconder importantes epítomos o que irá interferir no uso dessas proteínas em testes de imunodiagnóstico e também como antígenos em vacinas recombinantes (FAISAL et al., 2008; PINHEIRO et al., 2013).

Nesse estudo a proteína EMA-2 foi expressa em *P. pastoris* e apresentou epítomos que foram reconhecidos por anticorpos presentes nos soros de equinos naturalmente infectados com *T. equi*. A partir desses resultados, um ELISA indireto foi desenvolvido e padronizado utilizando a proteína EMA-2 recombinante (rEMA-2) como ferramenta para o diagnóstico de theileriose equina. A proteína recombinante também demonstrou imunogenicidade ao apresentar imunofluorescência positiva no experimento realizado com o soro de camundongos imunizados com a rEMA-2.

2 Revisão de literatura

2.1 Artigo de Revisão

Theileriose equina: Revisão

**Ana Muñoz Vianna, Ana Paula de Souza Stori de Lara, Guilherme Borges
Weege, Rodrigo Casquero Cunha, Fábio Pereira Leivas Leite**

Manuscrito será submetido à Revista Ciência Rural

Theileriose equina: Revisão

Ana Muñoz Vianna, Ana Paula de Souza Stori de Lara, Guilherme Borges Weege,

Rodrigo Casquero Cunha, Fábio Pereira Leivas Leite

RESUMO

A theileriose equina é uma doença parasitária intraeritrocitária de equinos causada pelo protozoário Apicomplexa *Theileria equi* e está amplamente distribuída no mundo. Sua prevalência e endemia estão ligadas à presença dos carrapatos vetores e de equinos que se tornam portadores crônicos. O diagnóstico de theileriose tem se baseado em métodos sorológicos que incluem: cELISA (Ensaio Imunoenzimático competitivo), IFAT (Imunofluorescência indireta) e métodos moleculares como qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa). Em *T. equi* duas proteínas de superfície de merozoítos, equi merozoítos antígeno (EMA-1 e EMA-2) foram identificadas como os antígenos imunodominantes. Esses antígenos desempenham importante papel na penetração do merozoíto nos eritrócitos do hospedeiro e são alvos das respostas imunes contra o parasito. EMA-1 e EMA-2 são expressas na superfície dos merozoítos extraeritrocitários mas somente a EMA-2 é liberada no citoplasma e se insere na membrana dos eritrócitos pelos merozoíto intraeritrocitários. Em testes de diagnóstico imunológicos a especificidade e a sensibilidade dependem do antígeno utilizado. A proteína EMA-2 se torna um alvo interessante pois é altamente conservada e tem sido empregada em testes de imunodiagnóstico como antígeno recombinante.

PALAVRAS-CHAVE: ELISA, EMA-2, imunodiagnóstico, *Theileria equi*

ABSTRACT

Equine theileriosis is a parasitic intra-erythrocyte disease of horses caused by *Theileria equi* Apicomplexa protozoan and is widely distributed in the world. Its prevalence and endemic disease are linked to the presence of ticks vector and equines that become chronic carriers. The diagnosis of theileriosis has been based on serological methods that include: cELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay competitive), IFAT (indirect immunofluorescence) and molecular methods such as qPCR (Reaction quantitative Polymerase Chain). In *T. equi* two merozoites surface protein, equi merozoite antigen (EMA-1 and EMA-2), have been identified as immunodominant antigens. These antigens play an important role in merozoite penetration of the host erythrocytes and are targets of the immune responses against the parasite. EMA-1 and EMA-2 are expressed on the surface of merozoites extra-erythrocytic but only EMA-2 is released into the cytoplasm and it is inserted in the membrane of red blood cells by intra-erythrocytic merozoite. In immunological diagnostic tests specificity and sensitivity depend on the antigen used. EMA-2 protein becomes an attractive target because it is highly conserved and has been used in immunodiagnostic tests as recombinant antigen.

KEYWORDS: ELISA, EMA-2, immunodiagnostics, *Theileria equi*

INTRODUÇÃO

A piroplasmose equina causada por *Theileria equi* e *Babesia caballi*, protozoários intracelulares, é considerada a mais importante doença dos equinos transmitida por carrapatos (ALANAZI et al., 2014). O Brasil possui o terceiro rebanho mundial de equinos. Somados aos muare e asininos são 8 milhões de cabeças, movimentando R\$ 7,3 bilhões, somente com a produção de equinos (MAPA, 2015). A principal função dos equinos no Brasil é o trabalho nas atividades agropecuárias, onde aproximadamente 5 milhões de animais são utilizados, principalmente, para o manejo do gado bovino (MAPA, 2015). Mesmo com as melhorias na

sanidade certas enfermidades ainda causam enormes prejuízos à criação equina. Entre estas enfermidades destacamos a theileriose equina que provoca perdas associadas tanto a fatores clínicos como a restrição ao trânsito internacional de animais soropositivos (BALDANI et al., 2011; MALEKIFARD et al., 2014).

A transmissão de *T. equi* ocorre no repasto do carrapato, inoculando suas formas infectantes (esporozoítos). Uma vez no hospedeiro, os esporozoítos infectam os leucócitos (MEHLHORN & SCHEIN, 1998; RAMSAY et al., 2013) e após os eritrócitos (UILENBERG, 2006). No carrapato vetor são encontrados no intestino, hemolinfa, glândulas salivares e na saliva (MEHLHORN & SCHEIN, 1998). Dependendo do carrapato o período de incubação da infecção por *T. equi* pode variar de 2 a 10 dias até 21 dias. Após 2 dias da infecção os esquizontes de *T. equi* já infectam linfócitos, e por volta de 12 a 14 dias os merozoítos podem ser visualizados nos eritrócitos através de esfregaços sanguíneos (MEHLHORN & SCHEIN, 1998). A parasitemia atinge aproximadamente 7% dos eritrócitos, mas em animais imunodeprimidos, pode chegar a 80% (ALLSOPP et al., 1994).

Os sinais clínicos nos equinos variam de quadros assintomáticos a agudos. Devido à grande disseminação de ambos, *T. equi* e os diversos carrapatos vetores, o diagnóstico e prevenção desta enfermidade se fazem necessários tanto em áreas endêmicas como em não endêmicas (HUANG et al., 2003). A doença pode ser diagnosticada por sinais clínicos associados ao encontro do parasito nos esfregaços sanguíneos, no entanto há a necessidade de métodos moleculares e sorológicos para a confirmação dos animais com infecção crônica (ABUTARBUSH et al., 2012).

A maioria dos animais desenvolve a forma crônica da doença, no entanto, em situações que provoquem a diminuição na resposta imune, como o estresse ou grande exigência física, podem apresentar reagudizações. Esta condição provoca prejuízos diretos, representados principalmente pela queda de desempenho dos animais, inapetência e perda de peso.

Raramente animais criados a campo apresentam reagudizações, o que é mais comum ocorrer com animais de competição, que em geral vivem sob confinamento e são com frequência submetidos a estresse (DANTAS et al., 2008).

Os animais imunocompetentes que se recuperam de infecções agudas tornam-se portadores assintomáticos e permanecem como reservatórios de *T. equi* mantendo a doença endêmica, na presença do vetor. Esses animais desenvolvem uma imunidade protetora contra a doença clínica no caso de re-exposições ao parasito. Esta proteção tem sido atribuída à contínua estimulação do sistema imune por parasitos remanescentes (SCHEIN, 1988; MEALEY et al., 2012). Animais infectados com *T. equi* respondem com altos títulos de anticorpos contra proteínas de superfície de merozoítos (KNOWLES et al., 1994). Os antígenos de superfície de merozoítos desempenham papéis importantes na patogênese da doença devido ao seu papel de reconhecimento, ligação e na penetração nos eritrócitos hospedeiros. Essas proteínas são expressas na superfície dos eritrócitos e são reconhecidas pelo sistema imune do equino (KNOWLES et al., 1994; KUMAR et al., 2004; NIZOLI et al., 2009). Duas proteínas, Equi Merozoite Antigen 1 e 2, juntamente com um terceiro membro (EMA-3) foram demonstradas interagindo com o citoesqueleto de eritrócitos e são proteínas imunodominantes, utilizadas em testes de imunodiagnóstico (KAPPMAYER et al., 2012).

Considerando a prevalência da theileriose no Brasil e no mundo, esta revisão destaca aspectos importantes da doença e do protozoário, bem como métodos de diagnóstico utilizados, controle da doença e estudos biotecnológicos recentes.

ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA

O protozoário Apicomplexa, *Theileria equi*, anteriormente denominado *Babesia equi* (MEHLHORN & SCHEIN, 1998) é o causador de importante piroplasmose equina, denominada theileriose equina (RAMSAY et al., 2013; VIANNA et al., 2014). O Filo Apicomplexa compreende um grande grupo de organismos, incluindo a ordem Piroplasmida,

que parasitam de forma obrigatória, hospedeiros vertebrados e invertebrados (MANS et al., 2015). Esses organismos apresentam um complexo apical contendo organelas secretórias envolvidas na invasão e na permanência do parasito nos hospedeiros (MANS et al., 2015). *T. equi* é uma espécie de dimensões pequenas, 2-3µm de comprimento (LEVINE, 1985), pleomórfica com forma arredondada, ameboide ou piriforme nos eritrócitos e encontra-se isolado, em pares ou formando tétrades (Cruz de Malta) (MALEKIFARD et al., 2014). Dificilmente são visíveis ao microscópio quando a parasitemia é baixa e são facilmente confundidos com artefatos de técnica devido ao seu pequeno tamanho (KERBER, 2005).

A theileriose equina apresenta-se de forma endêmica em países tropicais e subtropicais e acomete equinos, asininos, muares e zebras (SCHEIN, 1988). Países como o Canadá, Nova Zelândia, Austrália, Japão, Alemanha, Reino Unido, Irlanda, Holanda e países Escandinavos são considerados livres da doença e o transporte de equinos para esses países sofre severas restrições (NANTES & ZAPPA, 2008; ALANAZI et al., 2014). O protozoário, *T. equi*, está amplamente distribuído por toda América Latina, com exceção do sul do Chile e sul da Argentina. No Brasil e Colômbia a prevalência da doença é bastante alta, atingindo índices de até 90% (AGUIRRE et al., 2004).

O parasito, *T. equi*, é transportado por carrapatos principalmente dos gêneros, *Anocentor* sp., *Amblyomma* sp., *Rhipicephalus* sp. e *Haemaphysalis* sp. (IKADAI et al., 2007). *Rhipicephalus microplus*, conhecido como carrapato do boi, é considerado o responsável pela infestação frequente em cavalos que compartilham pastos com bovinos (LABRUNA et al., 2001).

A transmissão de *T. equi* ocorre pelo repasto sanguíneo do carrapato contendo suas formas infectantes (esporozoítos) que invadem os leucócitos antes de penetrarem nos eritrócitos (UILENBERG, 2006). Na natureza os equídeos são os reservatórios de *T. equi* e a transmissão pode ocorrer de forma transtadiária (KERBER et al., 2009). Na transmissão

transestadial as larvas ao se alimentarem em equinos infectados se infectam mantendo os esporozoítos em suas glândulas salivares. Ao mudarem para ninfa, esta se tornará infectada disseminando o parasito. A ninfa dará origem a um adulto também infectado (URQUHART et al., 1996). Deste modo, larvas, ninfas e adultos que se alimentem num animal infectado, poderão transmitir o parasito a outro animal (KESSLER, 2001). O macho adulto de *R. microplus* realiza transmissão intraestadial, ou seja, adquire o parasito durante sua alimentação em animais infectados, tanto na fase aguda como na fase crônica da doença, e transmite a infecção para outros animais sãos (UETI, 2008). A transmissão transplacentária de *T. equi* já foi relatada no Reino Unido, Trinidad e Índia (PHIPPS & OTTER, 2004; GEORGES et al., 2011; CHHABRA et al., 2012) e pode resultar em abortos, natimortos ou o nascimento dos potros com theileriose neonatal (PHIPPS & OTTER, 2004; HEIM et al., 2007; ALLSOPP et al., 2007). Na theileriose neonatal os potros nascem com aparência saudável, entretanto 24-48 horas após nascimento começam a mostrar os primeiros sinais clínicos como fraqueza acentuada, icterícia intensa, temperatura elevada e também elevada parasitemia (CHHABRA et al., 2012). A falha reprodutiva das éguas, como resultado de uma infecção intrauterina do feto, particularmente com *T. equi*, é bastante comum em alguns países (DE WAAL, 1992; KERBER et al., 2009). Piroplasmose equina pode ainda ser transmitida iatrogenicamente através do uso comum de seringas e agulhas contaminadas (DE WAAL & VAN HEERDEN, 2004).

CICLO DE VIDA- *Theileria equi*

O ciclo de vida de *T. equi* é bifásico no hospedeiro mamífero, com uma fase de desenvolvimento intraleucocitária seguida de uma fase intraeritrocitária (RAMSAY et al., 2013). A fase intraleucocitária inclui a infecção de linfócitos B, e T e monócitos/macrófagos. No entanto, a fase pré-eritrocítica de *T. equi* não tem sido associada com a doença clínica em

equídeos assim como não é necessária para completar seu ciclo de vida (RAMSAY et al., 2013).

As formas infectantes, esporozoítos, penetram nos leucócitos do hospedeiro vertebrado (MEHLHORN & SCHEIN, 1998). Após, os merozoítos penetram nos eritrócitos e iniciam a divisão por fissão binária, originando as formas piriformes, que podem agrupar-se em quatro formando a “Cruz de Malta”. Depois da ruptura do eritrócito os merozoítos penetram em novos eritrócitos, no entanto, algumas destas formas tornam-se ovóides e são consideradas gametócitos. Na gametogonia após a ingestão dos eritrócitos pelo carrapato, os gametócitos crescem rapidamente e formam micro e macrogametas que se fundem formando o zigoto que se diferencia na forma móvel chamada oocineto. O oocineto é transportado através da hemolinfa até as glândulas salivares dos carrapatos. A esporogonia inicia-se com a penetração dos oocinetos nas glândulas salivares dos carrapatos dando origem aos esporoblastos e, por fim, os esporozoítos que serão inoculados juntamente com a saliva quando o carrapato iniciar seu repasto (MEHLHORN & SCHEIN, 1998).

SINTOMATOLOGIA

A theileriose equina, também denominada febre biliar, é uma afecção que pode ocorrer sob a forma aguda, subaguda ou crônica. Os casos agudos caracterizam-se por febre, anorexia, anemia, icterícia, hepatoesplenomegalia, hemólise intravascular, petéquias de superfícies de mucosas, hemoglobinúria, aborto e até óbito (SCHEIN, 1988; BALDANI et al., 2011; RONCATI et al., 2011).

Difícilmente estes sintomas são observados em animais oriundos de áreas endêmicas, já que os potros recebem da mãe a imunidade passiva e produzem os seus próprios anticorpos de forma progressiva à medida que entram em contato com o parasito. Nos casos subagudos os sintomas são os mesmos, mas de forma mais amena e intermitente. Os casos crônicos são os mais comuns e os sinais são inespecíficos e, na maioria das vezes, os animais são

assintomáticos (KERBER, 2009), mas podem apresentar inapetência leve, baixo desempenho e uma queda na massa corporal. A parasitemia é frequentemente ausente, mas pode reaparecer após imunossupressão (ROTHSCHILD & KNOWLES, 2007). Cavalos que se recuperam de infecções agudas podem permanecer reservatórios por toda vida e, uma vez presente os vetores, a transmissão da infecção para outros animais sensíveis é favorecida (HEIM et al., 2007).

RESPOSTA IMUNE

Os mecanismos precisos da imunidade adaptativa para controle da theileriose equina não são totalmente conhecidos, mas provavelmente, as respostas mediadas por células e as respostas humorais estão envolvidas. Segundo Maeley et al. (2012) é provável que a maior proteção contra a infecção por *T. equi* requeira anticorpos e respostas de células T dirigidas contra os merozoítos nos eritrócitos e também contra os esporozoítos em estágios anteriores.

Respostas imunes adquiridas são necessárias para controlar a parasitemia. Após a lise dos eritrócitos os parasitos tornam-se acessíveis aos anticorpos e aos mecanismos imunes mediados por estes (KNOWLES et al., 1994; CUNHA et al., 2006). No entanto, elevados títulos de anticorpos não são capazes de sozinhos protegerem contra infecções por *Theileria*. Os anticorpos neutralizam os parasitos bloqueando sua entrada nas células, fazem a opsonização dos eritrócitos infectados e por fim, a lise celular (CUNHA et al., 2006).

Em animais imunocompetentes há a produção de anticorpos IgG_a (IgG1) e IgG_b (IgG4,7) específicos de merozoítos durante a fase aguda da theileriose equina, enquanto a IgG (T) (IgG5) somente aparece após a resolução da parasitemia (fase crônica) (MEALEY et al., 2012). IgG1, IgG3, IgG4 e IgG7 ativam o complemento e interagem com receptores Fc e desempenham importante papel na resolução da parasitemia aguda (MEALEY et al., 2012).

Os títulos de anticorpos aumentam gradativamente após a infecção podendo ser detectados em 7-10 dias, dependendo da técnica utilizada, e atingem o máximo em 30-45 dias

para depois cair lentamente podendo alcançar níveis indetectáveis após alguns meses se não houver reinfecção (KERBER, 2005).

ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE – EQUI MEROZOITES ANTIGENS (EMAs)

Em *T. equi* duas proteínas de superfície de merozoítos, equi merozoítos antígeno EMAs: EMA-1 (34 kDa) e EMA-2 (30 kDa) foram identificadas como os antígenos imunodominantes (KNOWLES et al., 1991, 1992; KAPPMAYER et al., 1993). Essas glicoproteínas pertencem à família principal de proteínas de superfície de piroplasma (MPSP) e são conservadas entre o gênero *Theileria* (KNOWLES et al., 1997).

Os mecanismos moleculares envolvidos na interação celular entre os protozoários e as células hospedeiras não são totalmente conhecidos (KUMAR et al., 2012). Os parasitos Apicomplexa usam as proteínas de superfície para ligação á superfície do eritrócito, no entanto, os receptores envolvidos nesse processo são desconhecidos (PREISER et al., 2000; KUMAR et al., 2012).

Foi demonstrada a coexpressão de EMA-1 e EMA-2 na superfície dos merozoítos extraeritrocitários livres, entretanto, não expressas durante o estágio assexuado do merozoíto nos eritrócitos (KUMAR et al., 2004). EMA-1 e EMA-2 têm 52% de identidade entre os seus aminoácidos. Além disso, possuem uma âncora de fosfatidilinositol-glicosil (GPI) em sua sequência, sugerindo que essas proteínas possam ser expressas sobre a superfície do merozoíto, semelhante a outros antígenos de superfície de merozoítos de *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *Theileria annulata* e *T. sergenti* (KUMAR, et al., 2004). Os merozoítos liberam apenas EMA-2 no citoplasma do eritrócito e/ou insere na superfície da membrana, o que os caracteriza pelo seu comportamento eritrocitário obrigatório (KUMAR et al., 2004; KUMAR et al., 2012).

As sequências de nucleotídeos da glicoproteína EMA-1 utilizada no teste oficial para diagnóstico de theileriose (KNOWLES et al., 1992), mesmo em cepas isoladas no Brasil,

apresentou diferenças em comparação com outras já depositadas no GenBank (BALDANI et al., 2011). Essas diferenças poderiam alterar a especificidade e a sensibilidade de testes de diagnóstico. A glicoproteína EMA-2 de *T. equi*, até o presente momento, não apresentou essa diversidade genética em comparação com outras já depositadas no GenBank sendo altamente conservada (KUMAR et al., 2013; VIANNA et al., 2014).

DIAGNÓSTICO

As infecções por *T. equi* e *B. caballi* não podem ser diagnosticadas somente com base nos sinais clínicos, pois não podem ser distinguidas clinicamente, embora a diferenciação entre as duas infecções seja importante para o sucesso do tratamento e controle da doença (ROTHSCHILD & KNOWLES, 2007; FARKAS et al., 2013).

Theileriose pode ser diagnosticada pelos sinais clínicos associados a esfregaços sanguíneos corados por Giemsa para a visualização do parasito nos eritrócitos. Entretanto, esse método apresenta falhas como a não detecção do parasito no sangue de animais clinicamente normais e com baixa parasitemia (FARNAZ et al., 2014). Não diferencia o agente causador da piroplasmose, *T. equi* ou *B. caballi*, o que pode causar resultados falso-positivos (ABUTARBUSH et al., 2011). Devido ao pequeno tamanho, *T. equi* pode ser confundida com artefatos de técnica (KERBER, 2009).

Infecções por *T. equi* tem sido detectadas por ensaios moleculares e sorológicos (FARKAS et al., 2013). Ambos os testes, moleculares e sorológicos, são objetivos e acurados (ABUTARBUSH et al., 2011). PCR convencional tem sido feito utilizando-se a sequência 18S rRNA de *Piroplasma* spp. (ABUTARBUSH et al., 2011; FARKAS et al., 2013). Esse método molecular, no entanto, pode ser falho devido à baixa parasitemia em animais na fase crônica (ABUTARBUSH et al., 2011). Normalmente ensaios moleculares são feitos em conjunto com ensaios sorológicos como IFAT, cELISA (ABUTARBUSH et al., 2011; SANTOS et al., 2011; FARKAS et al., 2013) ou esfregaços sanguíneos (ABUTARBUSH et

al., 2011). Alazani et al. (2014) detectaram *T. equi* utilizando o PCR quantitativo (qPCR) em animais clinicamente saudáveis em uma área endêmica. O CFT foi muito utilizado no passado por alguns países e ainda o é em algumas regiões para qualificar cavalos para importação. É um método preciso para detectar infecções agudas, mas não identifica animais que foram tratados com drogas, além disso, a IgG (T), principal isotipo de imunoglobulina da fase crônica, apresenta incapacidade para fixar o complemento de cobraia (OIE, 2014).

Anticorpos direcionados contra as proteínas de superfície de merozoítos são importantes na imunidade às infecções por *T. equi* e, portanto, os estudos de diagnóstico imunológico para theileriose concentram-se na obtenção de frações antigênicas dessas proteínas (KAPPMAYER et al., 1993; KNOWLES et al., 1994). A sensibilidade e a especificidade em testes de diagnóstico imunológicos dependem do antígeno utilizado. Ao usarmos antígenos recombinantes, epítomos imunodominantes e específicos podem ser obtidos, diminuindo com isso as reações cruzadas e inespecíficas. Por isso, é bastante plausível o uso de antígenos recombinantes para detecção de *T. equi* (HUANG et al., 2003; NIZOLI et al., 2009; BALDANI et al., 2011; KUMAR et al., 2013; VIANNA et al., 2014).

O cELISA baseia-se na proteína EMA-1 e em um anticorpo monoclonal específico (MAb) para o epítopo da proteína de superfície do merozoíto (KNOWLES et al., 1992). O cELISA mostra-se superior na comparação com o IFAT e CFT (ALANAZI et al., 2014). No entanto, resultados discrepantes entre o cELISA e qPCR podem ser devido às sequências variáveis do gene da EMA-1, a existência de inibidores de PCR ou a parasitemia abaixo do limite de detecção dos ensaios (ALANAZI et al., 2014).

A EMA-2 de *T. equi* tem sido expressa em diferentes sistemas de expressão: Baculovírus (TANAKA et al., 1999); *Escherichia coli* (HUANG et al., 2003; KUMAR et al., 2013); *Pichia pastoris* (VIANNA et al., 2014). A proteína expressa em Baculovírus apresentou contaminação com proteínas excretadas pelas células Sf9 (TANAKA et al., 1999)

e também por proteínas produzidas pelo Baculovírus o que dificultaria o seu uso em ensaios de imunodiagnóstico (HUANG et al., 2003). Quando expressa em *E. coli* a proteína foi expressa na forma truncada (KUMAR et al., 2013) e por ser um sistema procarioto, a proteína não apresentou modificações pós traducionais. Falhas no dobramento das proteínas podem esconder importantes epítomos o que irá interferir no uso dessas proteínas em testes de imunodiagnóstico e também como antígenos em vacinas recombinantes (FAISAL et al., 2008; PINHEIRO et al., 2013).

Em estudos realizados por nosso grupo, Vianna et al. (2014), a EMA-2 foi expressa na levedura *P. pastoris* e apresentou epítomos que foram reconhecidos por anticorpos presentes nos soros de equinos naturalmente infectados com *T. equi*. A partir desses resultados, um ELISA indireto foi desenvolvido utilizando a proteína rEMA-2 como antígeno. Os resultados obtidos nesses experimentos foram promissores. Foram testados os soros 581 equinos (Figura 1) de diferentes procedências, raças, idade e sexo, alguns com quadro clínico de theileriose equina. Obtivemos nesse experimento 81,9% de animais positivos para theileriose equina (476 animais) e 18,1% (105 animais) considerados negativos. O ponto de corte (PC= 0,351) foi calculado a partir de 3 DP (Desvio Padrão) (HUANG et al., 2006) da média da leitura de 10 soros equinos sabidamente negativos e pré testados por IFAT. *Dot blot* foi realizado com 40 soros escolhidos aleatoriamente para a comprovação dos resultados obtidos no ELISA. Todos os 40 testes confirmaram os resultados do ELISA.

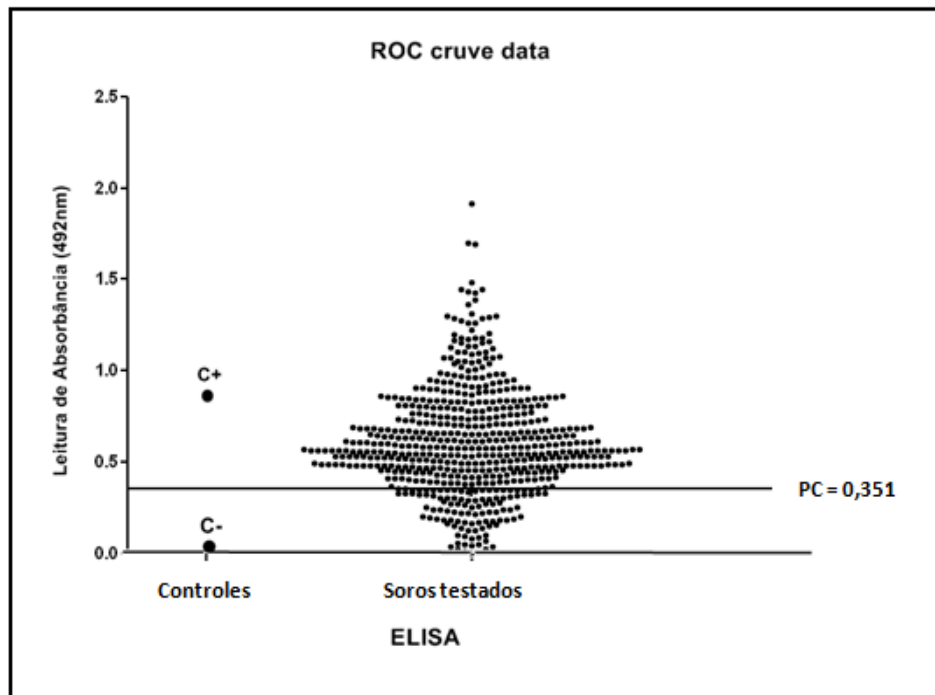


Figura 1 – ELISA indireto com rEMA-2. Soros de 581 equinos. 486 animais positivos (81,9%) e 105 animais negativos (18,1%). PC = 0,351.

TRATAMENTO

Atualmente não há vacinas disponíveis e nem medicamentos específicos capazes de eliminar as infecções crônicas por *T. equi* ou de prevenir completamente a infecção nos animais (KERBER et al., 1999; KERBER et al., 2009; BAHRAMI et al., 2014). Os medicamentos podem, no entanto, controlar a sintomatologia aguda nas infecções, mas não eliminam completamente o parasito (DE WAAL & VAN HEERDEN, 1994; KERBER et al., 2009; BAHRAMI et al., 2014).). Há uma grande variedade de fármacos não específicos (imidocarb, tetraciclina, diminazeno e buparvaquone) sendo utilizado no controle da theileriose equina o que dificulta estabelecer um protocolo de tratamento (DE WAAL & VAN HEERDEN, 2004; RADOSTITS et al., 2007).

CONCLUSÃO

Devido à prevalência e importância da theileriose equina em países endêmicos, torna-se cada vez mais importante a realização de estudos que visem o desenvolvimento de testes de imunodiagnóstico, mais sensíveis e específicos, e vacinas de subunidade.

Dessa forma, as perdas econômicas, ocasionadas com o impedimento do transporte internacional de equinos de países endêmicos para países considerados livres dessa enfermidade, possam ser minimizadas.

REFERÊNCIAS

- ABUTARBUSH, S.M.; ALQAWASMEH, D.M.; MUKBEL, R.M.; AL-MAJALI, A.M. Equine Babesiosis: Seroprevalence, Risk Factors and Comparison of Different Diagnostic Methods in Jordan. **Transbound Emerg Dis**, v. 59, p. 72-78, 2012.
- AGUIRRE, D.H.; CAFRUNE, M.M.; RADA, M.; ECHAIDE, T. Babesiosis Clínica em equinos de Cerrillos, Salta, Argentina. **Rev Invest Agropecuaria**, v. 33 (3), p. 123-133, 2004.
- ALANAZI, A.D.; SAID, A.E.; MORIN-ADELINE, V.; ALYOUSIF, M.S.; SLAPETA, J. Quantitative PCR detection of *Theileria equi* using laboratory workflows to detect asymptomatic persistently infected horses. **Vet Parasitol**, v. 206, p. 138-145, 2014.
- ALLSOPP, M.T.; CAVALIER-SMITH, T.; DE WAAL, D.T.; ALLSOPP, B.A. Phylogeny and evolution of the piroplasm. **Parasitology**, v. 108, p. 147-152, 1994.
- BAHRAMI, S.; GHADRAN, A.R.; MIRABDOLLAHI, S.M.; FAYED, M.R. Diagnosis of subclinical equine theileriosis in center of Iran using parasitological and molecular methods. **Trop Biomed**, v. 31, n.1, p. 110-117, 2014.

BALDANI, C.D.; HILARIO, E.; NAGAGHI, A.C.H.; BERTOLINI, M.C.; MACHADO, R.Z. Production of recombinant EMA-1 protein and its application for the diagnosis of *Theileria equi* using an enzyme immunoassay in horses from São Paulo State, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 20(1), p. 54-60, 2011.

CHHABRA, S.; RANJAN, R.; UPPAL, S.K.; SINGLA, L.D. Transplacental transmission of *Babesia equi* (*Theileria equi*) from carrier mares to foals. **J Parasit Dis**, v. 36 (1), p. 31-33, 2012.

CUNHA, C.W.; MCGUIRE, T.C.; KAPPMAYER, L.S.; HINES, S.A.; LOPEZ, A.M.; DELLAGOSTIN, O.A.; KNOWLES, D.P. Development of Specific Immunoglobulin G_a (IgG_a) and IgG_b Antibodies Correlates with Control of Parasitemia in *Babesia equi* Infection. **Clin Vaccine Immunol**, v. 13 (2), p. 297-300, 2006.

DANTAS, M.O.; DIAS, L.M.M.S.; MOURA, A.C.F.; SEIDEL, S.R.T.; VARGAS, C.R.; NETO, J.J.S. Search by hematozoa evaluation of smear and drop of blood clot in peripheral of riding horses. **Universidade Estadual do Maranhão**. Disponível em: <http://www.sovergs.com.br/site/38conbravet/resumos/105.pdf> Acesso em: 28 de dezembro de 2015.

DE WAAL, D.T. Equine piroplasmosis: a review. **Br Vet J**, v. 148, p. 6-14, 1992.

DE WAAL, D.T & VAN HEERDEN, J. Equine piroplasmosis. In: Coetzer, J.A.W and R.C. Tustin (Eds.), **Infectious Diseases of Livestock** (2° Ed). Oxford University Press, New York, p. 425-434, 2004.

FAISAL, S.M.; YAN, W.; CHEN, C.S.; PALANIAPPAN, R.U.; MCDONOUGH, S.P.; CHANG, Y.F. Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. **Vaccine**, v. 26, p. 277-287, 2008.

FARKAS, R.; TÁNCZOS, B.; GYURKOVSKY, M.; FÖLDVÁRI, G.; SOLYMOSI, N. Serological and molecular detection of *Theileria equi* infection in horses in Hungary. **Vet Parasitol**, v. 192, p. 143-148, 2013.

FARNAZ, M.; TAVASSOLI, M.; YAKHCHALI, M.; DARVISHZADEH, R. Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* using microscopic and molecular methods in horses in suburb of Urmia, Iran. **Vet Res Forum**, v. 5 (2), p. 12-133, 2014.

GEORGES, K.C.; EZEOKOLI, C.D.; SPARAGANO, O.; PARGASS, I.; CAMPBELL, M.; D'ABADIE, R.; YABSLEY, M.J. A case of transplacental transmission of *Theileria equi* in a foal in Trinidad. **Vet Parasitol**, v. 175, p. 363-366, 2011.

HEIM, A.; PASSOS, L.M.; RIBEIRO, M.F.; COSTA-JUNIOR, L.M.; BASTOS, C.V.; CABRAL, D.D.; HIRZMANN, J.; PFISTER, K. Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic areas of Brazil. **Parasitol Res**, v. 102, p. 63-68, 2007.

HUANG, X.; XUAN, X.; YOKOYAMA, N.; XU, L.; SUZUKI, H.; SUGIMOTO, C.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; IGARASHI, I. High-Level Expression and Purification of a Truncated Merozoite Antigen-2 of *Babesia equi* In *Escherichia coli* and its Potential for Immunodiagnosis. **J Clin Microbiol**, v. 41, p. 1147-1151, 2003.

HUANG, X.; XUAN, X.; YOKOYAMA, N.; KATAYAMA, Y.; ANZAI, T.; IGARASHI, I. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant antigens for the serodiagnosis of equine *Babesia* infections. **Vet Parasitol**. Short communication, 2006.

IKADAI, H; SASAKI, M; ISHIDA, H; MATSUU, A; IGARASHI, I; FUJISAKIK, T. Molecular evidence of *Babesia equi* transmission in *Haemaphysalis longicornis*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 76 (4), p. 694-697, 2007.

KAPPMAYER, L.S; PERRYMAN, L.E; KNOWLES, D.P. A *Babesia equi* gene encodes a surface protein with homology to *Theileria* species. **Mol Biochem Parasitol**, v. 62, p. 121-124, 1993.

KAPPMAYER, L.S; THIAGARAJAN, M.; HERNDON, D.R.; RAMSAY, J.D.; CALER, E.; DJIKENG, A.; GILLESPIES, J.J.; LAU, A.O.T.; ROALSON, E.H.; SILVA, J.C.; SILVA, M.G.; SUAREZ, C.E.; UETI, M.W.; NENE, V.M.; MEALEY, R.H.; KNOWLES, D.P.; BRAYTON, K.A. Comparative genomic analysis and phylogenetic position of *Theileria equi*. **BMC Genomics**, v. 13(603), p. 5-13, 2012.

KERBER, C.E.; FERREIRA F.; PEREIRA M.C. Control of equine piroplasmosis in Brazil. **Onderstepoort J Vet**, v. 66, p. 123-127, 1999.

KERBER, C.E. Piroplasmose 2005. **Paddock Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias**. Disponível em: <http://www.bichoonline.com.br/artigos/Xck0001.html> Acesso em: 28 de dezembro de 2015.

KERBER, C.E.; LABRUNA, M.B.; FERREIRA, F.; DE WAAL, D.T.; KNOWLES, D.P.; GENNARI, S.M. Relevance of equine Piroplasmosis and its association with tick infestation in the State of São Paulo, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet (Online)**, v. 18(4), Jaboticabal, 2009.

KESSLER, R.H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesq Vet Bras**, v. 21 (4), 2001.

KNOWLES, D.P.; PERRYMAN, L.E.; GOFF, W.L.; MILLER, C.D.; HARRINGTON, R.D.; GORHAM, J.R. A monoclonal antibody defines a geographically conserved surface protein of *Babesia equi* merozoítos. **Infect immune**, v. 59, p. 2314-2417, 1991.

KNOWLES, D.P.; KAPPMAYER, L.S.; STILLER, D.; HENNAGER, S.G.; PERRYMAN. L.E. Antibody to a recombinant merozoite protein epitope identified horses infected with *Babesia equi*. **J Clin Microbiol**, v. 30, p. 3122-3126, 1992.

KNOWLES, D.P. JR.; KAPPMAYER, L.S.; PERRYMAN. L.E. Specific immune responses are required to control parasitemia in *Babesia equi* infection. **Infect Immun**, v. 62, p. 1909-1913, 1994.

KNOWLES, D.P. JR.; KAPPMAYER, L.S.; PERRYMAN. L.E. Genetic and biochemical analysis of erythrocyte-stage surface antigens belonging to a family of highly conserved proteins of *Babesia equi* and *Theileria* species. **Mol Biochem Parasitol**, v. 90, p. 69-79, 1997.

KUMAR, S.; YOKOYAMA, N.; KIM, J.Y.; HUANG, X.; INOUE, N.; XUAN, X.; IGARASHI, I.; SUGIMOTO, C. Expression of *Babesia equi* EMA-1 and EMA-2 during merozoite developmental stages in erythrocyte and their interaction with erythrocytic membrane skeleton. **Mol Biochem Parasit**, v. 133, p. 221-227, 2004.

KUMAR, S.; YOKOYAMA, N.; KIM, J.Y.; BORK-MIMM, S.; INOUE, N.; XUAN, X.; IGARASHI, I.; SUGIMOTO, C. *Theileria equi* merozoite antigen-2 interacts with actin molecule of equine erythrocyte during their asexual development. **Exp Parasitol**, v. 132, p. 508-512, 2012.

KUMAR, S.; KUMAR, R.; GUPTA, A.K.; YADAV, S.C.; GOYAL, S.K.; KHURANA, S.K.; SINGH, R.K. Development of EMA-2 recombinant antigen based enzyme-linked immunosorbent assay for seroprevalence studies of *Theileria equi* in Indian equine population. **Vet Parasitol**, v. 198, p. 10-17, 2013.

LABRUNA, M.B; KERBER, C.E; FERREIRA, F; FACCINI, J.L.H; DE WAALD,T; GENNARI, S.M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 97, p. 1-14, 2001.

LEVINE, N.D. **Vet protozool**. Iowa State University Press, Iowa, USA. 414 pp, 1985.

MANS, B.J.; PIENAAR, R.; LATIF, A.A. A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology. **Int J Parasitol: Parasites and Wildlife**, v. 4, p. 104-118, 2015.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento) em <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>. Acesso em: 28 de dezembro de 2015.

MALEKIFARD, F.; TAVASSOLI, M.; YAKHCHALI, M.; DARVISHZADEH, R. Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* using microscopic and molecular methods in horses in suburb of Urmia, Iran. **Vet Res Forum**, v. 5 (2), p. 129-133, 2014.

MEALEY, R.H.; KAPPMAYER, L.S.; UETI, M.W.; WAGNER,B.; KNOWLES, D.P. Protective Effects of Passively Transferred Merozoite-Specific Antibodies against *Theileria equi* in Horses with Severe Combined Immunodeficiency. **Clin Vaccine Immunol**, v. 19 (1), p. 100-104, 2012.

MEHLHORN, H. & SCHEIN, E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. **Parasitol Res**, v. 84, p. 467-475, 1998.

NANTES J.H.; ZAPPA V. Nutaliose - Revisão de Literatura. **Rev Cient Elet Med V**, n. 10, 2008.

NIZOLI, L.Q.; CONCEIÇÃO, F.R.; SILVA, S.S.; DUMMER, L.A.; SANTOS JR, A.G.; LEITE, F.P.L. Immunogenicity and antigenicity of the recombinant EMA-1 protein of *Theileria equi* expressed in the yeast *Pichia pastoris*. Brazil. **J Vet Parasitol**, v. 18, 2009.

OIE, (Officer Internacional dês Epizooties). Terrestrial Manual 2014. Disponível em : http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.08_EQUINE_PIROPLA_SMOSIS.pdf. Acessado em 08de janeiro de 2016.

PHIPPS, L.P.; OTTER, A. Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom. **Vet Rec**, v. 154, p. 406-408, 2004.

PINHEIRO, A.F.; BORSUK, S.; BERBE, M.E.A.; PINTO, L.S.; ANDREOTTI, R.; ROOS, T.; ROLLOF, B.C.; LEITE, F.P.L. Expression of *Neospora caninum* NcSRS2 surface protein in *Pichia pastoris* and its application for serodiagnosis of Neospora infection. **Pathog Glob Health**, v. 103 (3), p. 116-121, 2013.

PREISER, P.; KAVIRATNE, M.; KHAN, S.; BANNISTER, L.; JARRA,W. The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. **Microbes Infect**, v. 2 (12), p. 1461-1477, 2000.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W. (Eds). **Vet Med – A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats**. (10° Ed). Philadelphia: Saunders, p. 673-762, 2007.

RAMSAY, J.D.; UETI, M.W.; JOHNSON, W.C.; SCOLES, G.A.; KNOWLES, D.P.; MEALEY, R.H. Lymphocytes and Macrophages are infected by *Theileria equi*, but T cells and B cells are not required to establish infection *in vivo*. **PLOS ONE**, v. 8 (10): e76996, 2013.

RONCATI, N.V.; BACCARIN, R.Y.A.; MASSOCO, C.O.; FERNANDES, W.R. Occurrence of congenital in *Theileria equi* Lusitano pure blood foals, diagnosed by RT-PCR. **Education Journal in Veterinary Medicine and Zootechny of CRMV-SP**. São Paulo, v. 9, n. 1, p. 46-52, 2011.

ROTHSCHILD, C.; KNOWLES, D. Equine Piroplasmosis. In: SELLON, D.C; LONG, M.T. Saunders (Eds.), Equine Infections Diseases. Elsevier, St Louis, MO, p. 465-473, 2007.

SANTOS, T.M.; ROIER, E.C.R.; SANTOS, H.A.; PIRES, M.S.; VILELA, J.A.R.; MORAES, L.M.B.; ALMEIDA, F.Q.; BALDANI, C.D.; MACHADO, R.Z.; MASSARD, C.L. Factors associated to *Theileria equi* in equids of two microregions from Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet (Online)**, v. 20 (3), Jaboticabal, 2011.

SCHEIN, E. Equine babesioses. In: RISTIC, M. (Ed.) Babesiosis of domestic animals and man. Florida: CRS Press, p. 197-208, 1988.

TANAKA, T.; XUAN, X.; IKADAI, H.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; MIKAMI, T.; SUZUKI, N. Expression of *Babesia equi* merozoite antigen-2 by recombinant baculovirus and its use in the ELISA. **Int J Parasitol**, v. 29, p. 1803-1808, 1999.

UILENBERG, G. *Babesia* – A historical overview. **Vet Parasitol**, v. 138, p. 3-10, 2006.

UETI, M.W., PALMER, G.H., SCOLES, G.A., KAPPMAYER, L.S., KNOWLES, D.P. Persistently infected horses are reservoirs for intrastadial tick-borne transmission of the Apicomplexan Parasite *Babesia equi*. **Infect Immun**, v. 76, p. 3525-3529, 2008.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. **Veterinary Parasitology**, 2º Ed. Oxford, UK: Blackwell Science Ltda, 1996.

VIANNA, A.M., GONÇALES, R.A., LARA, A.P.S.S., PINTO, L.S., NIZOLI, L.Q., LEITE, F.P.L. Heterologous expression of EMA-2 (*equi merozoite antigen*) of *Theileria equi* in *Pichia pastoris* with potential use in immunobiologics. **Cienc. Rural**. V. 44 (10), p. 1830-1836, 2014.

3 Hipótese

A glicoproteína recombinante EMA-2 de *T. equi* expressa no sistema eucarioto *P. pastoris* é capaz de ser antigênica e reconhecida por anticorpos presentes no soro equinos naturalmente infectados, podendo ser utilizada em testes de imunodiagnóstico para theileriose equina.

4 Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a proteína de superfície de *Theileria equi*, EMA-2 recombinante expressa em *Pichia pastoris*, como imunobiológico.

4.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver ELISA para diagnóstico de theileriose equina com a proteína rEMA-2;
- Comprovar a antigenicidade da proteína rEMA-2;
- Avaliar a resposta imune humoral gerada pela inoculação de rEMA-2 em camundongos.

5 Artigos

5.1 Artigo 1

Expressão heteróloga da EMA-2 (*equi merozoite antigen*) de *Theileria equi* em *Pichia pastoris* com potencial utilização em imunobiológicos

Ana Muñoz Vianna; Relber Aguiar Gonçalves; Ana Paula de Souza Stori de Lara;
Luciano da Silva Pinto; Leandro Quintana Nizoli; Fábio Pereira Leivas Leite

Publicado na Revista Ciência Rural

Expressão heteróloga da EMA-2 (*equi merozoite antigen*) de *Theileria equi* em *Pichia pastoris* com potencial utilização em imunobiológicos

Heterologous expression of EMA-2 (*equi merozoite antigen*) of *Theileria equi* in *Pichia pastoris* with potential use in immunobiologics

Ana Muñoz Vianna^{1,III*} Relber Aguiar Gonçalves^{II} Ana Paula de Souza Stori de Lara^{II}
Luciano da Silva Pinto^I Leandro Quintana Nizoli^{III} Fábio Pereira Leivas Leite^{1,III}

RESUMO

A piroplasmose equina causada por *Theileria equi* acomete os equinos de forma endêmica no Brasil e em diversos outros países tropicais e subtropicais. Considerada uma das mais importantes doenças de equinos, causa danos à saúde animal e perdas econômicas. A proteína equi merozoite antigen (EMA-2) é uma das principais proteínas de superfície, expressa nos diversos estágios do ciclo do parasita, estimula resposta imune em animais infectados, tornando-se um possível candidato para utilização em diagnóstico. O gene EMA-2 foi clonado e expresso na levedura *Pichia pastoris*. A proteína EMA-2 recombinante (rEMA-2) foi caracterizada antigenicamente por Western Blot e por ELISA indireto, utilizando-se soro de equino positivo para theileriose. O resultado do ELISA demonstrou uma especificidade de 90,9% e sensibilidade de 83,3%, quando comparado ao padrão, sendo superior à imunofluorescência (80,6% de especificidade e 75,0% de sensibilidade), o que sugere que a rEMA-2 expressa em *P. pastoris* é um promissor antígeno para ser utilizado como ferramenta no imunodiagnóstico de theileriose equina.

Palavras-chave: equinos, imunodiagnóstico, piroplasmose, theileriose.

ABSTRACT

Theileria equi, the causative agent of equine piroplasmosis, is endemic in Brazil and many other tropical and subtropical countries. It is considered one of the most important diseases of horses causing animal health problems and significant economic loss. The Protein equi merozoite antigen-2 (EMA-2) is a major surface protein that is expressed in different parasite cycle stages and induces immune response in infected animals, being a possible candidate to be used in diagnosis. EMA-2 gene was cloned and expressed in the yeast *Pichia pastoris*, and the recombinant protein EMA-2 (rEMA-2) was characterized by Western Blot and indirect ELISA using equine positive sera. The

ELISA results demonstrated a specificity of 90.9% and a sensitivity of 83.3% compared to the standard ELISA and being superior to immunofluorescence (80.6% of specificity and 75.0% of sensitivity) suggesting that the rEMA-2 expressed in *P. pastoris* is a promising antigen to be used as a tool in immunodiagnostic of theileriosis.

Key words: equines, immunodiagnostic, piroplasmosis, theileriosis.

INTRODUÇÃO

Theileria equi, anteriormente denominado *Babesia equi* (MEHLHORN & SCHEIN, 1998), é um protozoário hemoparasita e agente etiológico de piroplasmose equina (MEALEY et al., 2012). No Brasil, apresenta-se de forma endêmica, levando a significativas perdas econômicas (BALDANI et al., 2011).

A transmissão de *T. equi* ocorre no repasto do carrapato, inoculando suas formas infectantes (esporozoítos). Uma vez no hospedeiro, os esporozoítos infectam os leucócitos (MEHLHORN & SCHEIN, 1998) e posteriormente os eritrócitos (UILENBERG, 2006). A transmissão congênita de *T. equi* também pode ocorrer levando ao aborto ou morte peri natal (HEIM et al., 2007). Os sinais clínicos variam de quadros assintomáticos a agudos (febre, icterícia e anemia). Animais que se recuperam de infecções agudas deixam de apresentar os sintomas e permanecem como reservatórios de *T. equi*, mantendo a doença endêmica (HEIM et al.,

¹Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Capão do Leão, CP 354, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: a.munozvianna@gmail.com. *Autor para correspondência.

^{II}Laboratório de Parasitologia Molecular e Imunologia, UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

^{III}Faculdade de Veterinária, UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

2007). Devido à grande disseminação de ambos, *T. equi* e os diversos carrapatos vetores, o diagnóstico e prevenção desta enfermidade se fazem necessários tanto em áreas endêmicas como em não endêmicas (HUANG et al., 2003).

Theileriose tem sido diagnosticada por diversos métodos, tais como: Esfregaços sanguíneos corados por Giemsa, Teste de Fixação do Complemento (TFC), Teste de Imunofluorescência Indireta (IFAT), Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando lisados do parasito (HUANG et al., 2006), e ELISAs comerciais, utilizando proteínas recombinantes (KNOWLES et al., 1992). Entretanto, alguns destes métodos possuem suas limitações, incluindo baixa sensibilidade descrita para TFC, problema de subjetividade e baixa sensibilidade para o IFAT e preparações complicadas e laboriosas na utilização de antígenos lisados do parasito no ELISA (HUANG et al., 2006).

Segundo a OIE (2010), os métodos prescritos para que se obtenha a permissão para o transporte internacional de equinos são ELISA e o IFAT, sendo o TFC um substituto, portanto os testes sorológicos exercem um papel importante no trânsito desses animais. O IFAT, no entanto, necessita de profissionais experientes para sua realização e detecção da theileriose equina (RAMPERSAD et al., 2003). ELISAs tem sido realizados utilizando diferentes antígenos recombinantes, o que demonstra que pode ser um teste útil para identificação de theileriose em equinos (BALDANI et al., 2011).

Os antígenos de superfície (EMAs- *equi merozoite antigen*) exercem importante papel na aderência e penetração de *T. equi* nos eritrócitos dos hospedeiros (NIZOLI et al., 2009). São expressos durante os vários estágios do ciclo, tanto no hospedeiro definitivo como no vetor (UETI et al., 2003), tornando-se excelentes alvos na detecção de anticorpos contra este parasita.

Dentre as estratégias utilizadas para a produção de antígenos, utiliza-se a levedura *Pichia pastoris*, que concilia vantagens na manipulação genética, associada ao crescimento em meios de cultivo simples. Por ser um organismo eucarioto, *P. pastoris* proporciona a expressão de proteínas com modificações pós-traducionais, como glicosilação, além de secretar as proteínas heterólogas de forma solúvel no meio, simplificando etapas de purificação (CEREGRINO & CREGG, 2000). O presente trabalho teve por objetivo avaliar a proteína EMA-2 recombinante (rEMA-2), expressa em *P. pastoris*, e sua utilização como antígeno em ELISA indireto.

METODOLOGIA

Linhagens, cultivo e extração de DNA

O DNA de *T. equi* foi extraído conforme o método de MILLER et al. (1988) modificado, utilizando sangue de um equino infectado experimentalmente (cepa UFPel E15) e comprovado por IFAT pelo Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) (NIZOLI et al., 2009).

Amplificação e sequenciamento do gene que codifica EMA-2

A sequência do gene que codifica para a proteína EMA-2 foi amplificada por PCR como descrito: o total do PCR-Mix foi de 25µL, contendo 0,5µL de Taq DNA polimerase (5U/µL), 2,0µL 10x PCR tampão, 1,5µL 50mM MgCl₂, 0,5µL dNTPs, 0,5µL 10pmol µL⁻¹ oligoiniciadores anterógrado (5' - CAC CGC GGG GAA TGT TGA GCA A - 3') e oligoiniciadores retrógrado (5' - CCT CTAGAC GGT AGA ACA AAG CAA CGG CG - 3'), 1µL de DNA (~120ng), obtido como descrito e água estéril para completar o volume da reação. Os oligoiniciadores para EMA-2 foram desenhados utilizando-se o programa Vector NTI a partir das sequências depositadas no GenBank, acesso AB013725. O produto de PCR foi purificado usando-se o kit Real Genomics da Bio America - Hiyield™ Gel/PCR DNA Minikit. O sequenciamento do gene foi realizado por ACTGene Análises Moleculares Ltda (Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS), utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100.

Clonagem do gene EMA-2

Foi feita a digestão do vetor pPICZαB e do gene EMA-2 com as enzimas SacII (Biolabs 20.000U mL⁻¹) e XbaI (Invitrogen 20.000U mL⁻¹). Para a ligação do gene EMA-2 com o vetor pPICZαB, procedeu-se segundo o protocolo EasySelect™ *Pichia* Expression Kit-Catalog K1740-01 (Invitrogen). O vetor pPICZαB possui sítio para a adição de cauda de seis histidinas (6xHis) na porção carboxi-terminal da proteína (Invitrogen).

Seleção das colônias recombinantes e Expressão da proteína rEMA-2 em *P. pastoris*

Foram preparados os pré-inóculos das colônias transformadas seguindo o protocolo da EasySelect *Pichia* Expression Kit (Invitrogen) para colônias Mut⁺ com algumas modificações. Usou-se um volume de meio BMGY de 50mL e

após passou-se para 90mL do meio BMMY. As amostras foram induzidas com 450µL de metanol filtrado para a produção da proteína por 120h. Ao final da indução, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 10min, o precipitado foi despregado e o sobrenadante armazenado. No sobrenadante do cultivo, foi adicionado sulfato de amônio suficiente para atingir 80% de saturação. O sulfato de amônio foi adicionado ao sobrenadante sob agitação a 4°C e mantido por 18h. Após este período, foi novamente centrifugado a 6.000 x g 15min⁻¹ 4°C e o precipitado suspendido com 2mL de água destilada.

Purificação e quantificação da proteína

A purificação da proteína recombinante foi realizada por diálise. Utilizou-se uma membrana semipermeável com ponto de corte 12KDa (Viskase corporation Dry 21mm). A membrana foi acondicionada em frasco contendo 1L de água destilada e mantido a 4°C sob agitação durante 48h, sendo que, nas primeiras 12h, a água foi trocada a cada 2h. Após este período, o material dialisado foi mantido a -70°C para posterior liofilização (Liofilizador L101 – Liptop, Liobras).

Para a quantificação da proteína, seguiu-se o protocolo proposto por BRADFORD (1976). Uma amostra de 10mg da proteína liofilizada foi diluída em 1mL de água destilada. O método foi padronizado usando-se uma curva de diluição de Albumina Sérica Bovina 10% (BSA). A leitura das amostras foi feita em espectrofotômetro TP-READER – Thermo Plate

Western Blot

Realizou-se um *Western Blot* segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001). Após eletroforese no gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE), a proteína foi transferida para membrana de nitrocelulose (Amershan™ Hybond™- ECL GE Healthcare). Foi utilizado o marcador de proteínas BenchMark™ Prestained Protein Ladder 250µL (Invitrogen); 20µL da proteína EMA-2, BSA 10% (controle negativo). Após bloqueio, a membrana foi incubada com Anti-His C-terminal-HRP AB (Invitrogen), diluída 1:5000 (v/v) em PBS-T. Foi realizado um *Western blot*, segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001), com soro equino positivo para theileriose (IFAT) na concentração de 1:100 (v/v em salina isotônica com tampão fosfato contendo Tween-20 PBS-T) e, como anticorpo secundário, utilizou-se soro anti-equino conjugado com peroxidase (Sigma) 1:3000. O marcador utilizado foi *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (Bio Rad).

ELISA

Utilizou-se quarenta e um soros equinos de diferentes origens, porém todos pacientes do hospital da UFPel e testados por IFAT (4 positivos e 37 negativos por IFAT), um soro controle positivo de equino infectado experimentalmente e um soro controle negativo para *T. equi*, retirado de um potro pertencente a rebanho sem histórico para theileriose e testado por PCR, imunofluorescência e ELISA padrão.

O antígeno rEMA-2 foi aplicado às placas de Poliestireno (Nunc™-Placa imuno Polysorp – 96 orifícios) na concentração de 200ng mL⁻¹, diluído em tampão carbonato bicarbonato pH 9,6, por 18 horas a 4°C. Após três lavagens, bloqueou-se com leite em pó a 5% em PBS-T. Posteriormente, os controles positivos, negativos e os soros a serem testados foram diluídos em PBS-T na concentração de 1:100 e adicionados em duplicata à placa. Incubou-se a 37°C por 90min e, após três lavagens, adicionou-se o anti-IgG equino conjugado com peroxidase (Sigma), diluído 1:6000; a placa foi incubada a 37°C durante 90min. Após lavagem, o cromógeno/substrato tampão citrato/fosfato (TPS) foi adicionado e a placa mantida 15min no escuro. A reação foi interrompida pela adição de 50µL orifício⁻¹ de H₂SO₄ 1N. As absorbâncias foram medidas no leitor de micro placas (TP-READER – Thermo Plate), utilizando 492nm de comprimento de onda. Os mesmos soros equinos testados por ELISA com a proteína recombinante e por IFAT foram testados também com *kit* de ELISA padrão-ELISA competitivo (VMRD. Inc. *Babesia equi* Antibody Test Kit, cELISA).

Análise estatística

A análise ROC (Receiver Operating Characteristic) foi realizada pelo *software* estatístico MedCalc, versão 10.3.0.0, www.medcalc.be.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ELISAs têm sido utilizados no diagnóstico de *T. equi* com a utilização de diferentes antígenos recombinantes, tais como: EMA-1 (KNOWLES et al., 1992; BALDANI et al., 2011), EMA-2 (TANAKA et al., 1999; KUMAR et al., 2013), Be82 (HIRATA et al., 2002) e Be158 (HIRATA et al., 2005), expressos em *E. coli* e baculovírus, o que demonstra que estas proteínas recombinantes podem ser um teste útil para identificação de theileriose em equinos (OIE, 2008). Estudos anteriores mostraram que tanto a proteína EMA-1 quanto EMA-2 são expressas em diferentes estágios do ciclo do parasita extra e intra eritrocitário (KUMAR et al., 2004). Entretanto, EMA-2 é liberada no citoplasma e na membrana deste eritrócito,

sugerindo ser um dos primeiros antígenos a serem reconhecidos pelo sistema imune (KUMAR et al., 2004, 2013). Recentemente, BHOORA et al. (2010), MUNKHJARGAL et al. (2013), KUMAR et al. (2013) relataram diversidade genética em amostras baseadas no gene da EMA-1, o que poderia alterar a especificidade e sensibilidade de um teste de diagnóstico no qual o antígeno escolhido fosse a EMA-1. Esta diversidade genética ainda não foi reportada em relação à EMA-2. Estas observações nos levaram à escolha da proteína recombinante EMA-2 para o desenvolvimento de nossos estudos. Nossos resultados corroboram os de KUMAR et al. (2013), que, utilizando ELISA com antígeno de EMA-2, apresentaram uma correlação com o ELISA padrão.

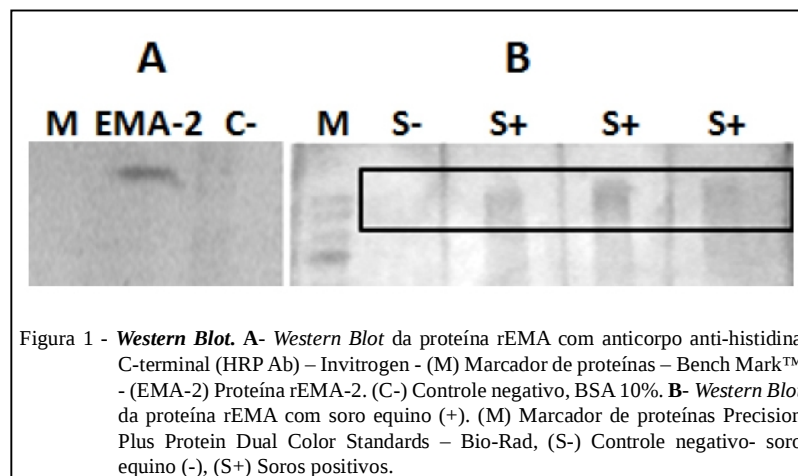
Neste trabalho, a proteína EMA-2 foi expressa em *P. pastoris* e apresentou epítomos (sequenciais e/ou conformacionais) que foram reconhecidos por anticorpos presentes nos soros de equinos naturalmente infectados. O sequenciamento do gene mostrou 99% de homologia com a sequência depositada no GenBank AB013725.

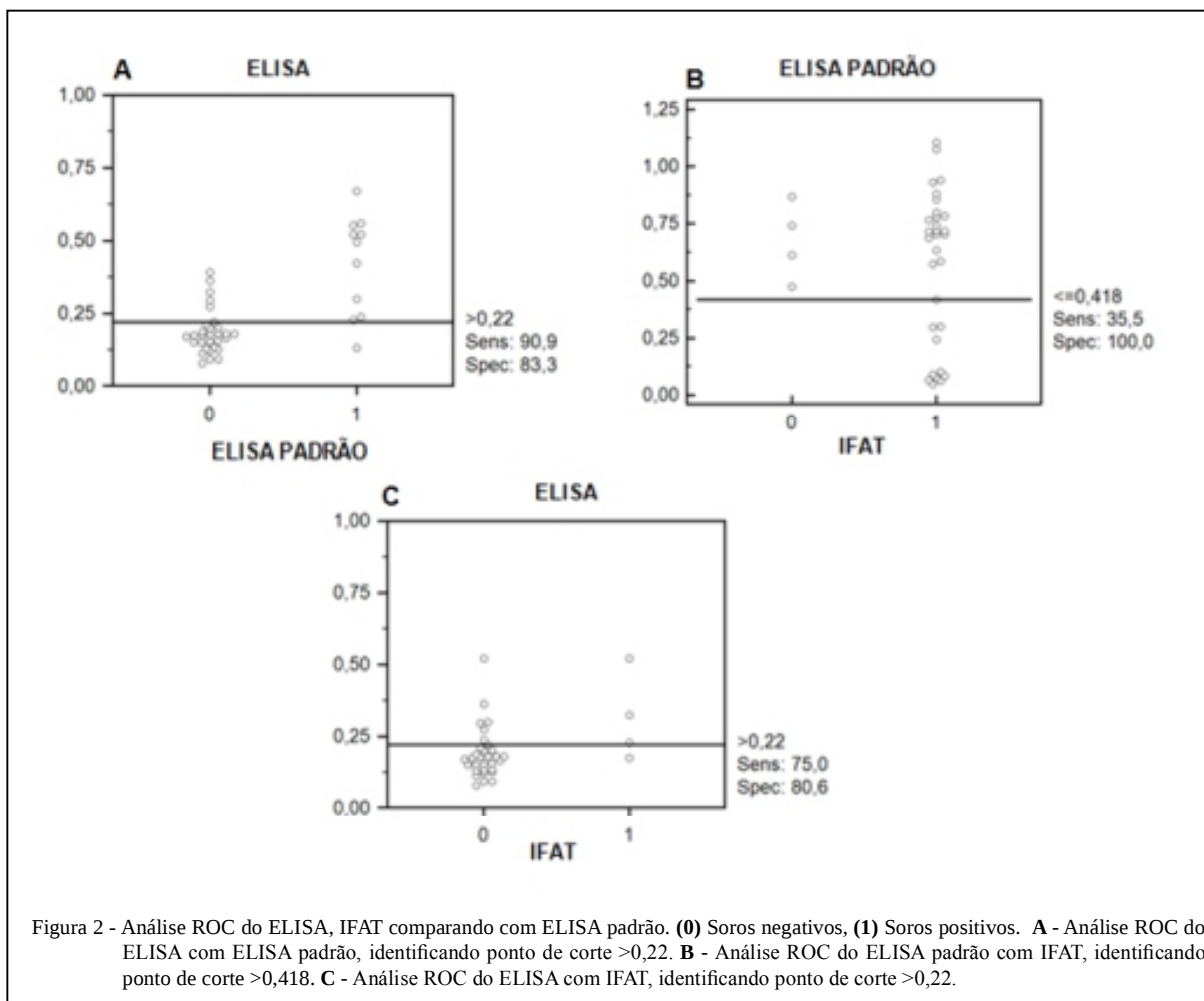
Segundo CEREGHINO & CREGG (2000), outras proteínas de superfície de protozoários também foram expressas em *P. pastoris* como *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP-1) e *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1). O sistema de expressão *P. pastoris* que foi utilizado para a expressão da proteína EMA-2 de *T. equi*, proporciona um aumento na produção da proteína, se comparada ao sistema *E. coli*, pois as proteínas são secretadas para o meio facilitando sua purificação (HARTWIG et al., 2010).

Western Blot, utilizando anticorpo anti-histidina (Figura 1A) e soro de equino naturalmente

infectado, (Figura 1B) reconheceram a proteína rEMA-2. A proteína foi avaliada por ELISA com soros de equinos controles (positivo e negativo por IFAT), e foi reconhecida por soros de equinos naturalmente infectados, demonstrando a sua antigenicidade. O kit de ELISA comercial (VMRD. Inc. *Babesia equi* Antibody Test Kit, cELISA) foi utilizado como padrão para avaliar os resultados com um teste semelhante (KUMAR et al., 2013). Usando-se a média da leitura de densidade ótica de ELISA e o ponto de corte estabelecido por análise ROC, os resultados sugerem a possibilidade de diferenciar animais positivos e negativos para theileriose. Na análise ROC, os pontos de corte basearam-se nos resultados do ELISA padrão. Quando se comparou ELISA teste (placa sensibilizada com a proteína rEMA-2) com ELISA padrão, obteve-se uma especificidade de 90,9% e sensibilidade de 83,3% (Figura 2A). KUMAR et al. (2013) obtiveram 97,0% de sensibilidade e 96,0% de especificidade ao compararem ELISA desenvolvido com o mesmo teste padrão usado neste trabalho. No presente trabalho, além de um número menor de animais, usou-se o teste estatístico ROC, enquanto KUMAR et al. (2013) analisaram utilizando desvio padrão o que tende a diminuir a acurácia na obtenção dos resultados. Ao se comparar os resultados da presente pesquisa com os de TANAKA et al. (1999), que, realizando ELISA com EMA-2 expressa em baculovírus, também demonstraram diferença entre amostras de soros positivos e negativos de equinos para *T. equi*. Entretanto, não estudaram especificidade e sensibilidade e não houve comparação com teste padrão.

Ao comparar ELISA padrão ao IFAT, obteve-se uma especificidade de 100%, mas





sensibilidade de apenas 35,5% (Figura 2B). O ELISA teste, ao ser comparado ao IFAT, apresentou especificidade de 80,6% e sensibilidade de 75% (Figura 2C). Os resultados obtidos nos apontam a subjetividade do teste de imunofluorescência e a possibilidade de reações cruzadas, devido à sensibilização da lâmina com eritrócitos de equinos infectados com o parasita (NIZOLI et al., 2009).

O presente trabalho ficou limitado pela não realização de testes cruzados com outros hemoparasitas e pelo número de animais estudados. Entretanto, TANAKA et al. (1999), KUMAR et al. (2013), utilizando rEMA-2 como antígeno, em amostras de soros positivas para *B. caballi*, *Trypanosoma evansi*, mormo, anemia equina e influenza equina não observaram reações cruzadas. Com um maior número de soros testados, seria possível obter resultados diferentes, quanto aos valores de especificidade e sensibilidade.

CONCLUSÃO

O estudo demonstrou que a proteína rEMA-2 expressa em *P. pastoris* é um promissor antígeno para utilização em testes de imunodiagnóstico para theileriose equina.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária (PPGV) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (CDTec) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsas para A.M.V.

REFERÊNCIAS

BALDANI, C.D. et al. Production of recombinant EMA-1 protein and its application for the diagnosis of *Theileria equi* using an enzyme immunoassay in horses from São Paulo State, Brazil. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária*, v.20, n.1, p.54-60, 2011. Disponível em: <www.scielo.br/pdf/rbvp/v20n1/

- a11v20n1>. Acesso em: 03 jun. 2013. doi: 10.1590/S1984-29612011000100011.
- BHOORA, R. et al. Sequence heterogeneity i the equi merozoite antigen gene (ema-1) of *Theileria equi* and development of na ema-1-specific Taq-Man MGB assay for the detection of *T. equi*. **Veterinary Parasitology**, v.172, n.1-2, p.33-45, 2010. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=EMA-1+and+Bhoora>. Acesso em: 04 fev. 2014. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.04.025.
- BRADFORD, M. **Analytical biochemistry**. v.72, p.248-254, 1976. Disponível em: <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generator/sites/lab-bioq-gen/archivos/Bradford%201976.pdf>. Acesso em: 10 out. 2013.
- CEREGHINO, J.L.; CREGG, J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, n.1, p.45-66, 2000. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10640598>. Acesso em: 20 maio 2013. doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x.
- HARTWIG, D.D. et al. High yield expression of leptospirosis vaccine candidates LigA and Lig32 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, v.9, p.98, 2010. Disponível em: <http://www.microbialcellfactories.com/content/9/1/98>. Acesso em: 04 fev. 2014. doi: 10.1186/1475-2859-9-98.
- HEIM, A. et al. Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic areas of Brazil. **Parasitology Research**, v.102, p.63-68, 2007. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17828553>. Acesso em: 03 jun. 2013. doi: 10.1007/s00436-007-0726.
- HIRATA, H. et al. Cloning of a truncated *Babesia equi* gene encoding an 82-kilodalton protein and its potential use in an enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.1470-1474, 2002. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 03 fev. 2014. doi: 10.1128/JCM.40.4.1470-1474.2002.
- HIRATA, H. et al. Cloning of a novel *Babesia equi* gene encoding a 158-kilodalton protein useful for serological diagnosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.12, n.2, p.334-338, 2005. Disponível em: <http://cvi.asm.org/content/12/2/334.short>. Acesso em: 03 fev. 2014. doi: 10.1128/CDLI.12.2.334-338.2005.
- HUANG, X. et al. High-Level expression and purification of a truncated Merozoite Antigen-2 of *Babesia equi* in *Escherichia coli* and its potential for immunodiagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.1147-1151, 2003. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12624044>. Acesso em: 03 jun. 2013. doi: 10.1128/JCM.41.3.1147-1151.
- HUANG, X. et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant antigens for the serodiagnosis of equine *Babesia* infections. **Veterinary Parasitology**, Short communication, 2006. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16621293>. Acesso em: 03 jun. 2013. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.03.013.
- KNOWLES, D.P. et al. Antibody to a recombinant merozoite protein epitope identifies horses infected with *Babesia equi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.3122-3126, 1992. Disponível em: <http://jcm.asm.org/content/30/12/3122>. Acesso em: 31 jan. 2013.
- KUMAR, S. et al. Expression of *Babesia equi* EMA-1 and EMA-2 during merozoite developmental stages in erythrocyte and their interaction with erythrocytic membrane skeleton. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.133, p.221-227, 2004. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14698434>. Acesso em: 08 out. 2013. doi: 10.1016/j.molbiopara.2003.10.010.
- KUMAR, S. et al. Development of EMA-2 recombinant antigen based enzyme-linked immunosorbent assay for seroprevalence studies of *Theileria equi* infection in Indian equine population. **Veterinary Parasitology**, v.198, p.10-17, 2013. Disponível em: <www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401713004949>. Acesso em: 01 fev. 2014. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.08.030.
- MEALEY, R.H. et al. Protective effects of passively transferred merozoite-specific antibodies against *Theileria equi* in horses with severe combined immunodeficiency. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.19, n.1, p.100-104, 2012. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22038847>. Acesso em: 20 maio 2013. doi: 10.1128/CDLI.05301-11.
- MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. **Parasitology Research**, v.84, p.467-475, 1998. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s004360050431#page-1>. Acesso em: 20 maio 2013. doi: 10.1007/s004360050431.
- MILLER, S.A. et al. A simples salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v.6, p.1215, 1988. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC334765/>. Acesso em: 3 maio 2013. doi: 10.1093/nar/16.3.1215.
- MUNKHJARGAL, T. et al. Prevalence and genetic diversity of equine piroplasms in Tov province, Mongolia. **Infection Genetic Evolution**, v.16, p.178-185, 2013. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23416256>. Acesso em: 04 fev. 2014. doi: 10.1016/j.meegid.2013.02.005.
- NIZOLI, L. Q. et al. Immunogenicity and antigenicity of the recombinant EMA-1 protein of *Theileria equi* expressed in the yeast *Pichia pastoris*. Brazil. **Journal Veterinary Parasitology**, v.18, n.2, p.1-4, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1984-2961200900200001&script=sci_arttext>. Acesso em: 15 abr. 2013. doi:10.4322/rbpv.01802001.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Equine piroplasmosis. In: **Manual of diagnostic and vaccines for terrestrial animals**, 2008. CHAPTER 2.5.8. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.08_EQUINE_PIROPLASMOSIS.PDF>. Acesso em: 05 fev. 2014.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). **Pruebas de diagnóstico prescritas y de sustitución para las enfermedades de la lista de la OIE**, 2010. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/2010/es_chapitre_1.1.3.htm>. Acesso em: 23 out. 2012.

- RAMBERSAD, J. et al. A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. **Veterinary Parasitology**, v.114, p.81-87, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12781470>>. Acesso em: 03 maio 2013. doi: 10.1016/S0304-4017(03) 00129-8.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning. **A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. p.9.16-9.17.
- TANAKA, T. et al. Expression of *Babesia equi* merozoite antigen-2 by recombinant baculovirus and its use in the ELISA. **International journal for Parasitology**, v.29, p.1803-1808, 1999. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10616926>. Acesso em: 15 abr. 2013. doi:10.1016/S0020-7519(99)00146-0.
- UILENBERG, G. *Babesia* – A historical overview. **Veterinary Parasitology**, v.138, p.3-10, 2006. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16513280>. Acesso em: 20 out. 2012. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.01.035.
- UETI, M.W. et al. Expression of Equi merozoite Antigen 2 during development of *Babesia equi* in the midgut and salivary gland of the vector tick *Boophilus microplus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.5803-5809, 2003. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14662988>. Acesso em: 3 maio 2013. doi: 10.1128/JMC.41.12.5803-5809.2003.

5.2 Artigo 2

Antigenicity and immunogenicity of the glycoprotein from *Theileria equi*, Equine Merozoite Antigen 2, expressed in *Pichia pastoris*

Ana Muñoz Vianna; Ana Paula de Souza Stori de Lara; Rodrigo Casquero Cunha; Lucas Bigolin Lorenzon; Guilherme Borges Weege; Luciano da Silva Pinto; Fábio Pereira Leivas Leite

O Manuscrito será submetido à Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

Antigenicity and immunogenicity of the glycoprotein from *Theileria equi*, Equi Merozoite Antigen 2, expressed in *Pichia pastoris*

Ana Muñoz Vianna^{1, *1}; Ana Paula de Souza Stori de Lara³; Rodrigo Casquero Cunha ²; Lucas Bigolin Lorenzon²; Guilherme Borges Weege³; Luciano da Silva Pinto²; Fábio Pereira Leivas Leite^{1, 2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Veterinária - Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

² Centro de Desenvolvimento Tecnológico - Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

³ Departamento de Microbiologia e Parasitologia – Instituto de Biologia (UFPel)

Abstract

Theileria equi is a protozoan hemoparasite and causative agent of equine theileriosis which occurs endemically in tropical and subtropical areas. Serological tests are used in several countries to officially diagnosis equine piroplasmosis. The antigen, *equi merozoite antigen-2* (EMA-2) is one of the principal surface proteins expressed in different stages of the parasitic cycle, and it is an excellent antigen for the detection of antibodies against *T. equi*. In the present study, the EMA-2 protein was expressed in *Pichia pastoris* as a soluble protein, and was recognized by Western blot and ELISA in serum from horses naturally infected with *T. equi*. By IFAT, we have demonstrated the immunogenicity of the protein using sera from mice immunized with 50 µg of rEMA-2. The EMA-2 protein expressed in *P. pastoris* demonstrated to be a promising antigen to use in equine theileriosis immunodiagnostic and subunit vaccines.

Keywords: ELISA; Equines; Immunodiagnostic, Theileriosis

Resumo

Theileria equi, é um protozoário hemoparasita e agente etiológico da theileriose equina. Apresenta-se de forma endêmica em áreas tropicais e subtropicais. Testes sorológicos são empregados em diversos países como testes oficiais para o diagnóstico da piroplasmose equina. O antígeno *equi merozoite antigen-2* (EMA-2) é uma das principais proteínas de superfície, expressa nos diversos estágios do ciclo do parasito, torna-se um excelente antígeno para a detecção de anticorpos contra *T. equi*. No presente estudo, a proteína EMA-2 foi

*Corresponding author: Ana Muñoz Vianna
Programa de Pós-Graduação em Veterinária
Universidade Federal de Pelotas - UFPel
Campus Capão do Leão, Caixa Postal 354,
CEP: 96010900, Pelotas, RS, Brasil, Tel: 55 (53) 32757350.
e-mail: a.munozvianna@gmail.com

expressa em *Pichia pastoris* como proteína solúvel e foi reconhecida no *Western blot* e em ELISA por soro de equinos naturalmente infectados por *T. equi*. Por IFAT, foi demonstrado a imunogenicidade da proteína usando-se soros de camundongos imunizados com 50 ug de rEMA-2. A proteína EMA-2 expressa em *P. pastoris* demonstrou ser um promissor antígeno para ser utilizado em testes de imunodiagnóstico de theileriose equina e vacinas de subunidade.

Palavras Chave: ELISA, Equinos, Imunodiagnóstico, Theileriose.

Introduction

Theileria equi, an intra-erythrocytic protozoan, is one of the etiological agents of equine piroplasmiasis (Kumar et al., 2012; Farkas et al., 2013). Transmission of *T. equi* occurs mainly during tick feeding which inoculates the host with sporozoites (infectious form). Transplacental transmission of *T. equi* has been reported (Phipps e Otter, 2004; Georges et al., 2011; Chhabra et al., 2012) and may result in abortion or perinatal death (HEIM et al., 2007; ALLSOP et al., 2007), but can also occur via fomites (blood-contaminated needles and surgical instruments) (Farkas et al., 2013). Widely distributed in tropical and subtropical regions, equine piroplasmiasis also causes great concern in the world's equine industry (Karatepe et al., 2009; Kumar et al., 2012; Farkas et al., 2013). Infection is typically characterized by fever, anemia, icterus, hemoglobinuria, depression, and edema (Karatepe et al., 2009; Santos et al., 2011). Deaths occur in acute infection cases, and the animals that survive become chronic carriers, contributing in the maintenance as endemic disease (Heim et al., 2007; Karatepe et al., 2009).

A diagnosis of equine theileriosis can be made based on clinical signs or detection of *T. equi* in blood smears (Rampersad et al., 2003; Abutarbush et al., 2012). Immunological tests, such as the Complement Fixation Test (CFT), Indirect Immunofluorescence Test (IFAT), and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) are used in several countries for official testing of equine piroplasmiasis (Huang et al., 2006). However, these serological methods are generally limited, because they sometimes give false negative diagnoses in the acute phase of the infection (Zaugg, 2002). A viable alternative in immunodiagnostic tests is the use of recombinant antigens for *T. equi* detection, since the specificity and sensitivity of these tests depend on the antigen used (Huang et al., 2003).

T. equi merozoites express surface proteins at molecular weights of 34 kDa (EMA-1; Equi-Merozoite Antigen 1), and 30 kDa (EMA-2) (Kumar et al., 2004). These proteins play

important roles in *T. equi* adhesion and penetration to the host erythrocyte, and are important targets of the host's immune response against the pathogen (Kumar et al., 2004; Nizoli et al., 2009). EMA-2 is expressed during all stages of the parasite life cycle, in both the host (equine) and the vector (tick) (Ueti et al., 2003). This makes it an excellent candidate antigen for detection of specific *T. equi* antibodies.

The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* has been highlighted as an alternative eukaryotic expression host that offers distinct advantages over bacterial and mammal expression systems in terms of simplicity, scalability and safety (Cereghino & Cregg, 2000; Gellessen, 2000). Thus, the aim of this study was to clone and express *T. equi* EMA-2 protein in *P. pastoris* for later use as antigen in immunodiagnostic tests for equine Theileriosis and subunit vaccines.

Materials and methods

1. DNA extraction

Theileria equi DNA was extracted according to the extraction protocol described by Miller et al. (1988). The biological material was extracted from horse blood experimentally infected with the UFPel E15 strain of *T. equi*, and confirmed by immunofluorescence; provided by the Parasitic Diseases Laboratory of the Federal University of Pelotas (UFPel) (Nizoli et al., 2009).

2. Amplification, purification, and sequencing of the *EMA-2* gene

The *EMA-2* gene was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) (Vianna et al., 2014). Purification of the PCR product was performed using Real-Kit Genomics Bio America - Hiyield™ Gel / PCR DNA Minikit. The sequencing of the gene was carried out by ACTGene Molecular Analysis Ltd. (Biotechnology Center, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS) using an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer automated sequencer.

2.3. Cloning of the *EMA-2* gene in pPICZαB

The purified PCR product, and the pPICZαB plasmid (Invitrogen) were digested with *Sac*II (Biolabs - 20,000 U × mL⁻¹), and *Xba*I (Invitrogen - 20,000 U × mL⁻¹) enzymes. After restriction, the digested PCR product and plasmid were subjected to ligation reaction with T4 DNA ligase enzyme (Promega), observing the reading frame for the addition of six histidine tags (6xHis) at the C-terminal portion of the recombinant EMA-2 protein (rEMA-2).

Escherichia coli TOP 10F eletro-competent were transformed with the ligation reaction product by electroporation using a Gene Pulser II Bio-Rad Laboratories Eletroporator, set to the following conditions: 25 μ F capacitance, 2.5 kV voltage, and 200 Ω of resistance. Immediately after electroporation, 500 μ L of Luria Bertani liquid medium (LB ; 1% tryptone, 1% NaCl; 5% yeast extract and H₂O) was added and incubated in an orbital shaker at 225 rpm for 1 h at 37 °C. After incubation, the transformed cells were seeded on agar plates containing LB agar plus Zeocin (at 25 μ g.mL⁻¹), and incubated for 18 h at 37 °C.

The selection of transforming colonies was done by the toothpick method. Briefly, a half colony was inoculated in 15 μ L of DNA buffer (bromophenol blue, w / v 25%, 30% glycerol, TE qs 100 mL), added to a 15 μ L solution of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (12:12:1), vortexed and further centrifuged at 13,000 $\times g$ for 30 s. The supernatant from the centrifugation was applied to 1% agarose gel and stained with ethidium bromide. The pPICZ α B vector was used as a marker. Selected colonies were confirmed by PCR with primer forward: 5'- CAC CGC GGG GAA TGT TGA GCA A- 3' and primer reverse 5'- CCT CTA GAC GGT AGA ACA AAG CAA CGG CG – 3' (Invitrogen).

Colonies confirmed by PCR were inoculated into LB medium with zeocin (25 μ g.mL⁻¹), and incubated at 37 °C with stirring for 18 h. Plasmid extraction was performed using the method described by Jouglard et al. (2002). Recombinant plasmids were confirmed by digestion with restriction enzymes *Sac*II and *Xba*I. The confirmed plasmids were subjected to sequencing with primers 3'AOX1 and α -factor (Invitrogen).

4. *Pichia pastoris* transformation

The recombinant plasmid pPICZ α B/EMA-2 was linearized with *Pme*I enzyme (New England Biolabs - 10,000 U.mL⁻¹) and subsequently 10 μ g was used to transform electro-competent *P. pastoris* cells by electroporation (Gene Pulser II Eletroporador Bio- Rad Laboratories 25 μ F of capacitance, 2.5 kV voltage, and 200 ohms of resistance). Immediately after electroporation, 1 mL of 1 M sorbitol was added to the cells, which were incubated for 2 h at 28 °C without agitation. The recombinant cells were selected in YPDS-agar medium plates (1% yeast extract, 2 % peptone, 2 % glucose, 1 M sorbitol, 2 % agar, and H₂O), with zeocin (100 mg $\times$ mL⁻¹) and incubated for 3 days at 28 °C. Recombinant colonies were inoculated in YPD medium (1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % glucose and H₂O) plus zeocin (100 mg.mL⁻¹), and then cultured at 28 °C, at 250 rpm for 18 h. The cultures were used for DNA extraction following the protocols of Jouglard et al. (2002). The presence of *T. equi*

EMA-2 gene in the *P. pastoris* yeast genome was confirmed by PCR using DNA as described elsewhere (Vianna et al., 2014).

5. Expression of EMA-2 protein and purification

Inocula of the recombinant colonies were prepared following the Invitrogen protocol (EasySelect Pichia Expression Kit) for Mut⁺ colonies with few modifications. It was used 160 mL of BMGY medium (1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate, 1.34% YNB, $4 \times 10^{-5}\%$ biotin, 1% glycerol). When the culture reached an OD = 2.0 we centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min, and the pellet was suspended in 400 mL of BMMY medium (1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate, 1.34% YNB, $4 \times 10^{-5}\%$ biotin, 0.5% methanol). The samples were induced with 4 mL of methanol filtered every 24 h for a period of 144 h. The cultures were centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min, and to the supernatant was added enough ammonium sulfate to achieve 80% of saturation. Afterwards it was centrifuged at $6,000 \times g$ for 15 min at 4 °C, and the pellet was suspended in distilled water, dialyzed with a 12 kDa cutoff membrane (Viskase Corporation Dry 21mm), and stored at -70 °C until further use.

6. Quantification of rEMA-2

The protein was quantified under the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific).

7. Dot Blot

To confirm the recombinant protein expression, dot blotting was performed as follows: 3 µL of supernatant was applied to a membrane (GE Healthcare). As a negative control we used a not methanol induced *P. pastoris* supernatant yeast culture. After blocking with skimmed powdered milk (5% in PBS-T), the membrane was washed three times with PBS-T, and incubated with theileriosis positive horse serum, diluted to 1:200, and kept under stirring for 1 h at 37 °C. The membrane was again washed three times with PBS-T. Then, it was added the secondary antibody (anti-horse conjugated with peroxidase; Sigma) diluted to 1:6,000, and kept stirring for 1 h at 37 °C. The membrane was again washed five times with PBS-T, and the revelation was made using a commercial DAB (3,3'-Diaminobenzidine, Sigma, catalog number D4418) w/co, and urea, H₂O₂/NaCl.

2.8 Western Blot

Western blotting was performed in accordance with Sambrook e Russell (2001). Briefly, after electrophoresis in 10% polyacrylamide gel (SDS-PAGE), proteins were transferred to nitrocellulose membrane (Amersham™ Hybond™- GE Healthcare ECL). We used: 6 µL of protein marker (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, BioRad); 20 µL of rEMA-2 protein; and 20 µL of *P. pastoris* culture supernatant non-transformed as a negative control. The membrane was blocked with 5% milk powder diluted in PBS-T during 1 h of stirring, and afterwards the membrane was incubated with monoclonal antibody anti-polyhistidine (HIS-1 clone, Sigma Aldrich) diluted to 1:6,000 in PBS-T. The membrane was washed three times with PBS-T and incubated with a polyvalent anti-mouse immunoglobulin conjugated with horseradish peroxidase (anti-mouse; Sigma Aldrich) with stirring for 1 h. Western blotting was carried out under the same aforementioned conditions. A horse serum positive for theileriosis in IFAT, naturally infected, was used at a concentration of 1:100 in PBS-T, and, as the secondary antibody, a rabbit serum anti-equine IgG conjugated with peroxidase (Sigma) diluted 1:3,000 in PBS-T was used. As a negative control we used a non-transformed *P. pastoris* culture supernatant. The protein marker used was Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BioRad).

9. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

We used sera from twenty horses from different sources tested by IFAT, of which ten were positive for theileriosis and ten were negative. We used a positive control serum obtained from an equine experimentally infected with *T. equi*, and a negative control serum taken from a foal belonging to a flock with no history for theileriosis, and tested with PCR and IFAT. ELISA was carried out according Vianna et al. (2014).

10. Indirect fluorescent antibody test (IFAT) and Indirect ELISA with serum from mice immunized

After approval by the Ethics Committee of the Universidade Federal de Pelotas (UFPEL; CEEA 4256-2014), BALB/c female mice of 6 to 8 weeks old were divided randomly into two experimental groups, with 5 animals each. The groups were ranked by the numbers 1 and 2 and received the following treatments: **Group 1** – 150 µL subcutaneous vaccine containing PBS 1x (10%) (pH = 7,0) **Group 2** – 150 µL subcutaneous vaccine containing 50 µg of rEMA-2 protein, 15 µL adjuvant aluminum hydroxide (10%) and PBS 1x (10%) (pH = 7,0), q.s. Mice were immunized on days 0 and 14. Blood samples were collected through submandibular puncture on days 0, 14 and 28. The sera of mice were tested

for immunogenicity by IFAT according to Tender & Friedhoff (1986) with some modifications using smears of a blood from an equine with high parasitaemia provide by Parasitic Diseases Laboratory of UFPEL. Briefly, we added 20 μL of the serum of the mice diluted 1:80 in PBS plus 1% of bovine fetal serum (BFS). After incubation for 1h at 37 °C, the slide was washed with PBS and then added the secondary polyvalent antibody anti-mouse FITC conjugate (Sigma) diluted 1: 800 in PBS 1x. It was incubated for 1h at 37 °C and, after washing and drying the slide, it was observed with a fluorescence microscope (Olympus B51) with objective 40 $\times$. The immunogenicity of rEMA-2 was also tested by ELISA. The plate was sensitized with 100 μL of rEMA-2, at 200 $\text{ng} \times \text{mL}^{-1}$, per well. We used the mice sera in a dilution of 1:50 and polyvalent anti-mouse immunoglobulins IgG, IgA, and IgM peroxidase conjugated (Sigma) diluted 1:4,000.

Results

1. Expression vector construction

Amplification of the *EMA-2* gene was performed by PCR, and size of approximately 832 bp was demonstrated by electrophoresis in 1% agarose gel. The presence of the *EMA-2* gene into pPICZ α B vector was confirmed by the release of the insert during the vector digestion pPICZ α B/*EMA-2* with *Sac*II and *Xba*I enzymes. The PCR realized with primers designed for *EMA-2* gene amplification confirmed the insertion of the pPICZ α B/*EMA-2* gene into the *P. pastoris* yeast genome.

2. Expression and quantitation of the recombinant protein

At 24 h of induction of *P. pastoris*, the rEMA-2 can already be detected. Protein expression continued increasing until 120 h. At 144 h of cultivation there was a decrease in expression, which was confirmed by dot blotting (Fig. 1). In the final measurement, after purification, the protein concentration was $\sim 2.05 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ measured using a Pierce TM BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific).

3. Western blot analysis

The expression of rEMA-2 was confirmed by Western blotting. The antigenicity of the rEMA-2 was demonstrated, since it was recognized by sera of horses naturally infected by *T. equi* (Fig. 2A). The rEMA-2 was expressed containing a poly-histidine (6-His) tag, and was recognized by anti-histidine antibodies (Fig. 2B). The gel migration of the protein gave it a higher position than expected for its molecular weight, suggesting the presence of

glycosylation. Through "in silico" analysis using the DictyOGlyc 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DictyOGlyc/>) and NetOGlyc 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc-3.1/>) prediction programs we observed O-glycosylation sites on the protein, suggesting this high gel localization result (data not shown).

4. ELISA

The ELISA using the rEMA-2 expressed in *P. pastoris* as antigen showed its antigenicity, since *T. equi* positive horse sera recognized the protein (Fig. 3). The protein was recognized, with significant readings only from positive sera, and without nonspecific reactions.

5. Mice immune serum IFAT and ELISA

At the figure 4 (1), sera from mice immunized with the rEMA-2 protein showed fluorescence demonstrating that protein is immunogenic and antibodies produced recognize the native equine antigens expressed in the blood smear slide (A) which did not occur with control mice sera (B). Similarly, at figure 4 (2), ELISA of the mice serum immunized with rEMA-2 protein showed immunogenicity with significant difference between the blood sample of the days 0 (first vaccination), 14 (boost) and 28.

Discussion

Merozoite surface proteins play important roles in both parasite recognition and cell penetration and are host immune response targets (Kumar et al., 2004; Nizoli, et al., 2009). The EMA-1 and EMA-2 proteins are mutually expressed on the merozoite surface; similar to other surface antigens from *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Theileria annulata* and *Theileria sergenti* (Kumar et al., 2004). The intra-erythrocytic merozoites release EMA-2 into the cytoplasm, or on the membrane surface of the infected erythrocytes (Kumar et al., 2004), suggesting that it is one of the first antigens to be recognized by the immune system (Kumar et al., 2004, 2013).

The EMA-2 gene was amplified by PCR using as a template the DNA extracted from *T. equi* infected equine cells (erythrocytes and leukocytes) which had been experimentally infected and confirmed by IFAT (Nizoli et al., 2009). Sequencing of the EMA-2 gene isolated from equine blood of southern Brazil region, deposited in the GenBank, access number [KM264373](#), presented 99% of homology with the EMA-2 gene previously deposited (access

number [AB013725](#)). This *EMA-2* gene homology (being from different areas) was also evidenced by Kumar et al. (2013). However, one might consider that there are few *T. equi* *EMA-2* GenBank sequences available for phylogenetic analysis (Kumar et al., 2013). Thus, the use of *EMA-2* as antigen does not restring its use in different endemic areas, since at moment no genetic diversity has been reported. However, studies of the *EMA-1* sequence reveal differences among strains isolated in other countries (Heuchert et al., 1999; Nicolaiewsky et al., 2001). Strains isolated in Brazil, in fact, present genetic diversity, which leads to antigenic differences between *T. equi* isolates from different regions (Baldani et al., 2011; Kumar et al., 2013), making its use as the antigen in immunodiagnostic tests questionable.

EMA-2 protein has already been expressed in systems such as *E. coli* (Huang et al., 2004) and Baculovirus (Tanaka, 1999). However, these systems have limitations (Makrides, 1996). Kumar et al. (2013) reported that when using *E. coli* to express *EMA-2*, it was expressed in a truncated form. Also, expression in a prokaryotic system such as *E. coli* may give low production yields, problems in protein folding, and absence of post-translational modifications in the expressed protein (i.e. glycosylation) (Faisal et al., 2008; Hartwig et al., 2010). The expression of *EMA-2* in Baculovirus showed contamination with proteins secreted by cells (Sf9) during cultivation, hampering its purification and enabling cross-reactions (Huang et al., 2003). Failures during protein folding can interfere when the proteins are used in diagnostic tests or recombinant vaccines (Faisal et al., 2008; Pinheiro et al., 2013) by omitting important epitopes.

The methylotrophic yeast *P. pastoris* is among the most widely used expression systems for biotech applications (Sarduy & Planes, 2013). This expression platform is an excellent tool for the production of a variety of intracellular and extracellular recombinant proteins (Sorensen, 2010). The use of this yeast provides the advantages of easy genetic manipulation, and post-translational modifications over and above other expression systems, as well as an efficient secretory pathway for exporting recombinant products, with low risk of passing pathogens on to humans (Cereghino et al., 2002; Sarduy & Planes, 2013). Therefore, as in other protozoan surface proteins studies using *P. pastoris* expression, such as *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP-1) (Morgan et al., 1999), *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1) (Kocken, et al., 1999), and *EMA-1* from *T. equi* (Nizoli et al., 2009), we used this expression system with success.

In this work, the *EMA-2* protein was expressed in *P. pastoris* maintaining antigenic determinants that are similar to the native protein. It was confirmed by its recognition by

serum from naturally infected equine (IFAT and clinical signs) in Western blot and ELISA. In ELISA, according to the tested sera diluted at concentrations of 1:100, significant positive sera readings were obtained, demonstrating the antigenicity and sensitivity of the protein as antigen. Kumar et al. (2004) have demonstrated the expression of the EMA-2 on the surface of intra- erythrocytic and extra-erythrocytic merozoites by IFAT with serum from mice immunized with truncated EMA-2 produced in *E. coli*. Likewise, by IFAT, we have demonstrated the immunogenicity of the rEMA-2 produced in *P. pastoris* using sera from mice immunized with the same 50 µg of protein used by Kumar et al. (2004) and slides with blood smears of horses who presented high parasitaemia of *T. equi* (figure 4.1). The immunogenicity of the rEMA-2 was also demonstrated by ELISA conducted with the mice immune serum (Figure 4.2). Baldani et al. (2012) determined the immunogenicity of EMA-1 expressed in *E. coli* by dot ELISA, but used different concentrations of protein and adjuvant (Freund's complete and incomplete) for immunization of mice.

According to Farkas et al. (2013) the difference in prevalence of equine theileriasis between countries may be due to differences in diagnostic test sensitivity, as well as to the presence of competent vectors, and varied control measures. A variety of serological tests have been developed to monitor theileriasis in horses during the latent stage when parasitemia is microscopically undetectable (Farkas et al., 2013). The results obtained in this study demonstrate that the rEMA-2 protein expressed in *P. pastoris* is a promising antigen for use in equine theileriosis immunodiagnostic tests.

Acknowledgements

Thanks to the Programa de Pós-Graduação em Veterinária (PPGV) and to the Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB) of the Universidade Federal de Pelotas for support, and to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the Vianna, A. M. scholarship.

References

- Abutarbush SM, Alqawasmeh DM, Mukbel RM, Al-Majali AM. Equine Babesiosis: Seroprevalence, risk factors and comparison of different diagnostic methods in Jordan. *Transbound Emerg Dis* 2012; 59: 72-78.
- Baldani CD, Hilario E, Nagaghi ACH, Bertolini MC, Machado RZ. Production of recombinant EMA-1 protein and its application for the diagnosis of *Theileria equi* using an

enzyme immunoassay in horses from São Paulo State, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20(1): 54-60.

Cereghino JL & Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Microbiol. Rev* 2000; 24: 45-66.

Cereghino LGP, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol* 2002; 13(4): 329-332.

Faisal SM, Yan W, Chen CS, Palaniappan RU, McDonough SP, Chang YF. Evaluation of protective immunity of Leptospira immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. *Vaccine* 2008; 26: 277-287.

Farkas R, Tánczos B, Gyurkovszky M, Földvári G, Solymosi N, Edelhofer RS. Serological and molecular detection of *Theileria equi* infection in horses in Hungary. *Vet Parasitol* 2013; 192: 143-148.

Gellessen G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000; 54: 741-750.

Hartwig DD, Oliveira TL, Seixas FK, Forster KM, Rizzi C, Harleben CP, McBride AJ, Dellagostin OA. High yield expression of leptospirosis vaccine candidates LigA and LipL32 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* 2010; 9: 98.

Heim A, Passos LM, Ribeiro MF, Costa-Junior LM, Bastos CV, Cabral DD, Hirzmann J, Pfister K. Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic areas of Brazil. *Parasitol Res* 2007; 102: 63-68.

Heuchert CM, de Giulli V Jr, de Athaide DE, Böse R, Friedhoff KT. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in Brazil. *Vet Parasit* 1999; 85(1): 1-11.

Huang X, Xuan X, Yokoyama N, Xu L, Suzuki H, Sugimoto C, Nagasawa H, Fujisaki K, Igarashi I. 2003. High-Level Expression and Purification of a Truncated Merozoite Antigen-2 of *Babesia equi* In *Escherichia coli* and its Potential for Immunodiagnosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1147-1151.

Huang X, Xuan X, Xu L, Zhang S, Yokoyama N, Suzuki N, Igarashi T. Development of an Immunochromatographic Test with Recombinant EMA-2 for rapid detection of antibodies against *Babesia equi* in horses. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 359-361.

Huang X, Xuan X, Yokoyama N, Katayama Y, Anzai T, Igarashi I. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant antigens for the serodiagnosis of equine *Babesia* infections. *Vet Parasitol* 2006; 140(1-2): 158-161.

Invitrogen, Manual, 2010. *Pichia* Expression Kit for Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZ α in *Pichia pastoris* Cat. N° K1740-01, Rev.

Jouglaard SD, Medeiros MA, Vaz EK, Bastos RG, Cunha CW, Armoa GRG, Dellagostin AO. An ultra-rapid and inexpensive plasmid preparation method for screening recombinant colonies. *Abstr Gen Meet Am Soc Microbiol* 2002; H-71: 234.

Karatepe B, Karatepe M, Çakmak A, Karaer Z, Ergün G. Investigation of seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Nigde province, Turkey. *Trop anim health prod* 2009; 41: 109-113.

Kocken CHM, Dubbeld MA, Van Der Wel A, Pronk JT, Waters AP, Langermans JAM, Thomas AW. High-Level Expression of *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1) in *Pichia pastoris*: Strong Immunogenicity in *Macaca mulatta* Immunized with *P. vivax* AMA-1 and Adjuvant SBAS2. *Infect immun* 1999; 67: 43-49.

Kumar S, Yokoyama N, Kim JY, Huang X, Inoue N, Xuan X, Igarashi I, Sugimoto C. Expression of *Babesia equi* EMA-1 and EMA-2 during merozoite developmental stages in erythrocyte and their interaction with erythrocytic membrane skeleton. *Mol Biochem Parasitol* 2004; 133: 221-227.

Kumar S, Yokoyama N, Kim JY, Bork-Mimm S, Inoue N, Xuan X, Igarashi I, Sugimoto C. 2012. *Theileria equi* merozoite antigen-2 interacts with actin molecule of equine erythrocyte during their asexual development. *Exp Parasitol* 2012; 132: 508-512.

Kumar S, Kumar R, Gupta AK, Yadav SC, Goyal SK, Khurana SK, Singh, RK. Development of EMA-2 recombinant antigen based enzyme-linked immunosorbent assay for seroprevalence studies of *Theileria equi* infection in Indian equine population. *Vet Parasitol* 2013; 198: 10-17.

Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 1996; 6: 512-538.

Morgan WD, Birdsall B, Frenkiel TA, Gradwell MG, Burghaus PA, Syed SEH, Uthaipibull C, Holder AA, Feeney J. Solution Structure of an EGF Module Pair from the *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1. *J Mol Biol* 1999; 289: 113-122.

Nicolaiewsky TB, Richter MF, Lunge VR, Cunha CW, Delagostin O, Ikuta N, Fonseca AS, da Silva SS, Ozaki LS. Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction. *Vet Parasitol* 2001; 101(1): 9-21.

Nizoli LQ, Conceição FR, Silva SS, Dummer LA, Santos Jr AG, Leite FPL. Immunogenicity and antigenicity of the recombinant EMA-1 protein of *Theileria equi* expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Rev Bras Parasitol Vet* 2009; 18(2): 1-4.

Pinheiro AF, Borsuk S, Berbe MEA, Pinto LS, Andreotti R, Roos T, Rollof BC, Leite FPL. Expression of *Neospora caninum* NcSRS2 surface protein in *Pichia pastoris* and its application for serodiagnosis of *Neospora* infection. *Pathog Glob Health* 2013; 103(3): 116-121.

Rampersad J, Cesar E, Campbell MD, Samlal M, Ammons D. A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. *Vet Parasitol* 2003; 114: 81-87.

Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning. *A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 2001; 9.16-9.17.

Santos TM, Roier ECR, Santos HA, Pires MS, Vilela JAR, Moraes LMB, Almeida FQ, Baldani CD, Machado RZ, Massard CL. Factors associated to *Theileria equi* in equids of two microregions from Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20(3): 235-241.

Sarduy ES & Planes MC. Efficient expression systems for cysteine proteases of malaria parasites. *Bioengineered* 2013; 4(2): 107–114.

Sorensen HP. Towards universal systems for recombinant gene expression. *Microb Cell Fact* 2010; 9: 27.

Tanaka T, Xuan X, Ikadai H, Igarashi I, Nagasawa H, Fujisaki K, Mikami T, Suzuki N. Expression of *Babesia equi* merozoite antigen-2 by recombinant baculovirus and its use in the ELISA. *Int J Parasitol* 1999; 29: 1803-1808.

Tender AM & Friedhoff KT. Serodiagnosis of experimental and natural *Babesia equi* and *B. caballi* infections. *Vet Parasitol* 1986; 20: 49-61.

Ueti MW, Palmer GH, Kappmeyer LS, Scoles GA, Knowles D. Expression of Equi Merozoite Antigen 2 during Development of *Babesia equi* in the Midgut and Salivary Gland of the Vector Tick *Boophilus microplus*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5803-5809.

Vianna AM, Gonçalves RA, Lara APSS, Pinto LS, Nizoli LQ, Leite FPL. Heterologous expression of EMA-2 (*equi merozoite antigen*) of *Theileria equi* in *Pichia pastoris* with potential use in immunobiologics. *Cienc Rural* 2014; 44(10): 1830-1836.

Zaugg JL, Babesiosis. In Smith, B.P., *Large Animal Internal Medicine*. St. Louis, Missouri, USA: Mosby Inc. 2002; 1051-1055.

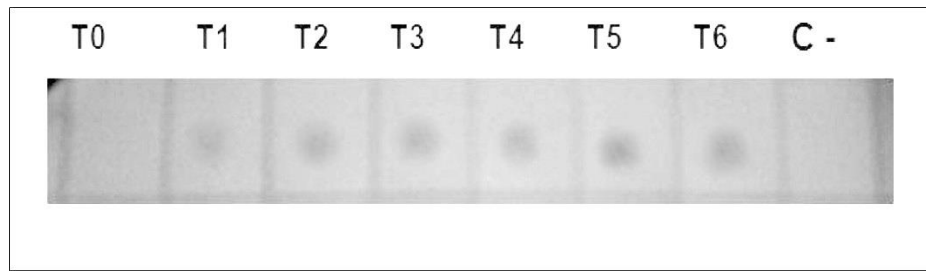


Figure 1. Dot blot. rEMA-2 Dot blot of serum from horse positive (naturally infected) for theileriosis. The dots are from supernatant of *Pichia pastoris* cultures induced with methanol in T0 (0 hours); T1 (24 h); T2 (48 h); T3 (72 h); T4 (96 h); T5 (120 h) and T6 (144 h). Negative control: *P. pastoris* culture supernatant not induced with methanol.

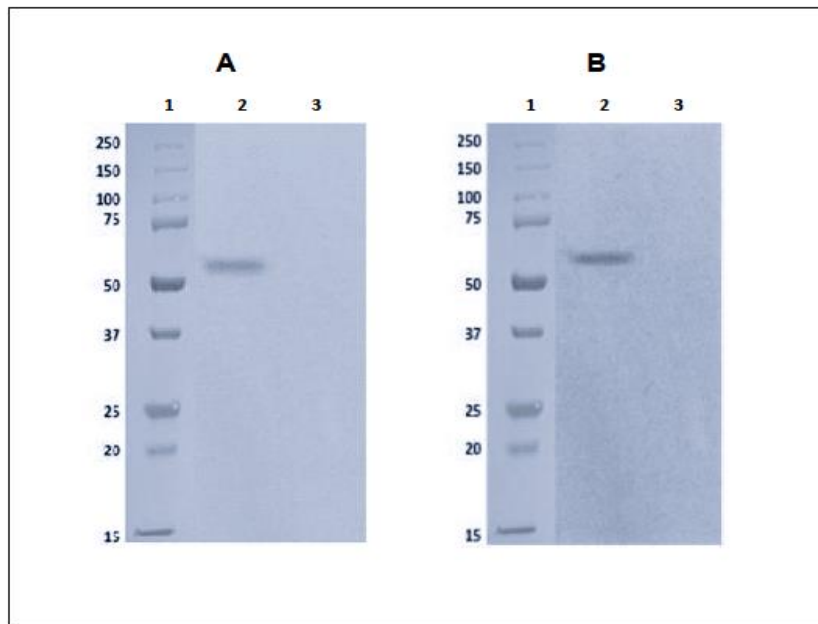


Figure 2. rEMA-2 Western blot. A. rEMA-2 Western blot probed with serum from horse naturally infected with *Theileria equi*. Lane 1: Marker Precision Plus Protein™ Standards Dual Color (Bio-Rad) 6 µL; Lane 2: rEMA-2 protein, 20 µL (80µL of rEMA-2 mixed with 20 µL of sodium dodecyl sulfate gel-loading buffer); Lane 3: *P. pastoris* culture supernatant non-transformed B. rEMA-2 Western blot probed with monoclonal antibody – anti-polyhistidine (HIS-1 clone). Lane 1: Marker Precision Plus Protein™ Standards Dual Color (Bio-Rad); Lane 2: rEMA-2 protein, 20 µL (80µL of rEMA-2 mixed with 20 µL of sodium dodecyl sulfate gel-loading buffer) Lane 3: *P. pastoris* culture supernatant non-transformed.

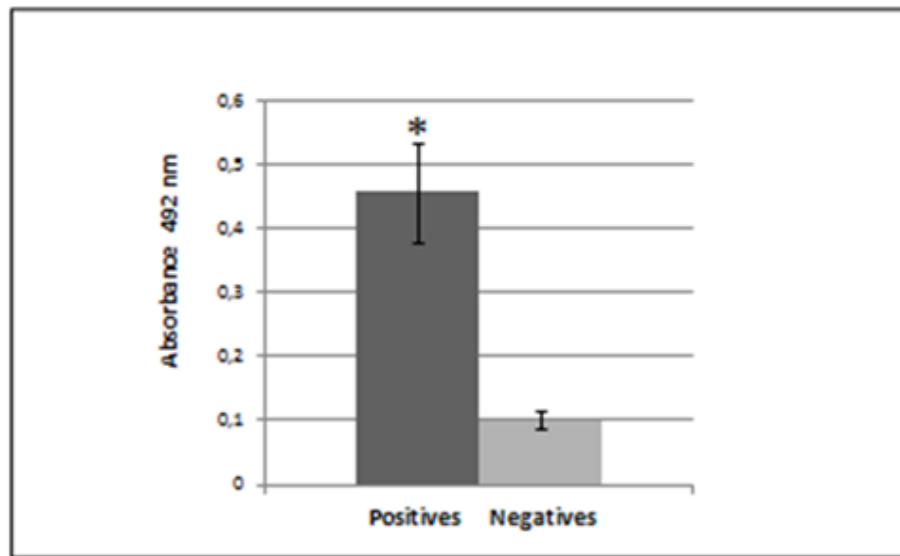


Figure 3. rEMA-2 ELISA. The data represents the absorbance reading mean at 492 nm from 20 horses serum, positives and negatives for equine theileriosis, previously tested by indirect immunofluorescence. Asterisk (*) means that the means of groups are statistically different ($p < 0.0001$).

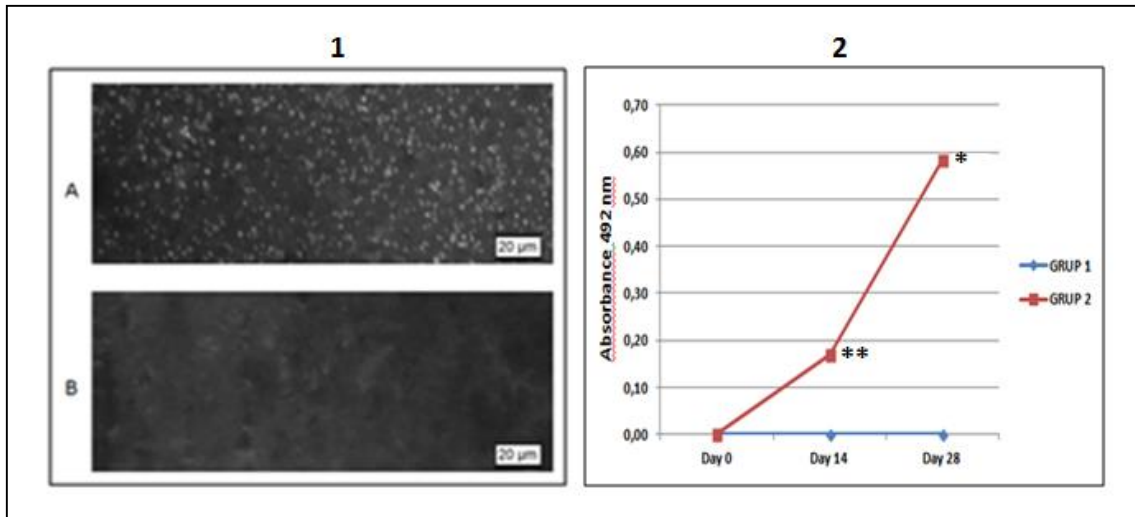


Figure 4. Immunogenicity of rEMA-2 protein. 1- Indirect Immunofluorescence. Slides with blood smears of horses containing high parasitaemia of *T. equi*. A) Mice serum immunized with 50 µg of rEMA-2. B) Mice serum immunized with PBS. 2- Indirect ELISA. The data represents the reading absorbance at 492 nm of mice serum immunized with rEMA-2. One asterisk (**) means statistic significance ($p < 0.0001$) between days 0 to 14 and (*) means statistic significance ($p < 0.005$) between days 14 to 28

6 Patente

6.1 Título

Processo de preparação de imunoterápicos para theileriose equina compostos pela proteína EMA-2 recombinante de *Theileria equi*.

6.2 Resumo

A presente invenção pertence ao campo dos imunoterápicos contra Theileriose equina mais especificamente a um processo de preparação de um kit de imunodiagnóstico de Theileriose equina, composto pela proteína EMA-2 da superfície do merozoíto de *T. equi* (rEMA-2) expressa em *Pichia pastoris*, empregada em testes de ELISA e Dot Blot. Esse invento pertence ao setor técnico na área de biotecnologia. Deste modo, a invenção provê por meio da utilização de rEMA-2 um processo de preparação e utilização de um kit de diagnóstico de *Theileria equi*. Os resultados também demonstram que a utilização da rEMA-2 como antígeno em um kit de imunodiagnóstico baseado em ELISA é viável devido à capacidade de discernir entre animais positivos e animais negativos para Theileriose, previamente diagnosticados por imunofluorescência, técnica esta, utilizada como padrão para sorologia de *Theileria equi*.

6.3 Reivindicações

- 1- Processo de preparação de imunoterápicos para Theileriose equina compostos pela proteína EMA-2 recombinante de *Theileria equi* é caracterizada por um processo de preparação, bem como da utilização da proteína recombinante (rEMA-2) em kits de imunodiagnóstico para Theileriose equina.
- 2- Processo de preparação de imunoterápicos para Theileriose equina compostos pela proteína EMA-2 recombinante de *Theileria equi* de acordo com a reivindicação 1, é caracterizado por um processo de preparação de um kit de diagnóstico de *Theileria equi*, utilizando a proteína recombinante rEMA-2.

3- Processo de preparação de imunoterápicos para Theileriose equina compostos pela proteína EMA-2 recombinante de *Theileria equi* de acordo com as reivindicações 1 e 2, é caracterizado por utilização da proteína recombinante rEMA-2 em um kit de diagnóstico de *Theileria equi*.

4- Processo de preparação de imunoterápicos para Theileriose equina compostos pela proteína EMA-2 recombinante de *Theileria equi* de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, é caracterizado por utilização do dito kit de diagnóstico de *Theileria equi*, utilizando a proteína recombinante rEMA-2.

7 Considerações Finais

- O gene *EMA-2* foi amplificado e clonado com sucesso.
- A proteína recombinante foi obtida de forma solúvel no meio e apresentou epítomos sequenciais e/ou conformacionais que foram reconhecidos por anticorpos presentes nos soros de equinos naturalmente infectados.
- ELISA indireto foi desenvolvido e ao compararmos ELISA rEMA-2 com cELISA comercial, obtivemos 90,9% de sensibilidade e 83,3% de especificidade.
- Camundongos imunizados com rEMA-2 produziram anticorpos contra a proteína que reagiram em ELISA indireto.
- Equinos imunizados com rEMA-2 produziram anticorpos contra a proteína que reagiram em ELISA indireto.
- A imunogenicidade foi avaliada por imunofluorescência indireta realizada com os soros dos camundongos em esfregaços sanguíneos de equinos positivos e com alta parasitemia para *T. equi*.
- A proteína rEMA-2 produzida nesse trabalho pode ser usada como ferramenta em testes de imunodiagnóstico e sugere ser um promissor antígeno a ser considerado em vacinas de subunidade para theileriose equina.

Referências

ABUTARBUSH, S.M.; ALQAWASMEH, D.M.; MUKBEL, R.M.; AL-MAJALI, A.M. Equine Babesiosis: Seroprevalence, Risk Factors and Comparison of Different Diagnostic Methods in Jordan. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.59, p.72-78, 2012.

AGUIRRE D.H.; CAFRUNE M.M.; RADA M.; ECHAIDE T. Babesiosis Clínica em equinos de Cerrillos, Salta, Argentina. **Revista Investigacion Agropecuaria**, v.33, n.3, p.123-133, 2004.

ALANAZI, A.D.; SAID, A.E.; MORIN-ADELINE, V.; ALYOUSIF, M.S.; SLAPETA, J. Quantitative PCR detection of *Theileria equi* using laboratory workflows to detect asymptomatic persistently infected horses. **Veterinary Parasitology**, v.206, p.138-145, 2014.

ALLSOPP, M.T.; CAVALIER-SMITH, T.; DE WAAL, D.T.; ALLSOPP, B.A. Phylogeny and evolution of the piroplasm. **Parasitology**, v. 108, p. 147-152, 1994.

BAHRAMI, S.; GHADRDAN, A.R.; MIRABDOLLAHI, S.M.; FAYED, M.R. Diagnosis of subclinical equine theileriosis in center of Iran using parasitological and molecular methods. **Tropical Biomedicine**, v.31, n.1, p.110-117, 2014.

BALDANI, C.D.; HILARIO, E.; NAGAGHI, A.C.H.; BERTOLINI, M.C.; MACHADO, R.Z. Production of recombinant EMA-1 protein and its application for the diagnosis of *Theileria equi* using an enzyme immunoassay in horses from São Paulo State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, n.1, p.54-60, 2011.

BHOORA, R.; QUAN, M.; MATJILA, P.T.; ZWEYGARTH, E.; GUTHRIE, A.J.; COLLINS, N.E. Sequence heterogeneity i the equi merozoite antigen gene (ema-1) of *Theileria equi* and development of na ema-1-specific Taq-Man MGB assay for the detection of *T. equi*. **Veterinary Parasitology**, v.172, n.1-2, p.33-45, 2010.

BRADFORD, M. **Analytical biochemistry**. v.72, p.248-254, 1976.

CHHABRA, S.; RANJAN, R.; UPPAL, S.K.; SINGLA, L.D. Transplacental transmission of *Babesia equi* (*Theileria equi*) from carrier mares to foals. **Journal of Parasitology Diseases**, v.36, n.1, p.31-33, 2012.

CEREGHINO, J.L & CREGG, J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Microbiology Reviews**, v.24, p.45-66, 2000.

CEREGHINO, L.G.P.; CEREGHINO, J.L.; ILGEN, C.; CREGG, J.M. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, n.4, p.329-332, 2002.

CUNHA, C.W.; MCGUIRE, T.C.; KAPPMAYER, L.S.; HINES, S.A.; LOPEZ, A.M.; DELLAGOSTIN, O.A.; KNOWLES, D.P. Development of Specific Immunoglobulin G_a (IgG_a) and IgG_b Antibodies Correlates with Control of Parasitemia in *Babesia equi* Infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.13, n.2, p.297-300, 2006.

DANTAS, M.O.; DIAS, L.M.M.S.; MOURA, A.C.F.; SEIDEL, S.R.T.; VARGAS, C.R.; NETO, J.J.S. Search by hematozoa evaluation of smear and drop of blood clot in peripheral of riding horses. **Universidade Estadual do Maranhão**. Disponível em: <http://www.sovergs.com.br/site/38conbravet/resumos/105.pdf>. Acesso em: 28 de dezembro de 2015.

DE WAAL, D.T. Equine piroplasmiasis: a review. **British Veterinary Journal**, v.148, p.6-14, 1992.

DE WAAL, D.T. & VAN HEERDEN, J. Equine piroplasmiasis. In: Coetzer, J.A.W and R.C. Tustin (Eds.), **Infectious Diseases of Livestock** (2^o Ed). Oxford University Press, New York, p.425-434, 2004.

FAISAL, S.M.; YAN, W.; CHEN, C.S.; PALANIAPPAN, R.U.; MCDONOUGH, S.P.; CHANG, Y.F. Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. **Vaccine**, v.26, p.277-287, 2008.

FARKAS, R.; TÁNCZOS, B.; GYURKOVSKY, M.; FÖLDVÁRI, G.; SOLYMOSI, N. Serological and molecular detection of *Theileria equi* infection in horses in Hungary. **Veterinary Parasitology**, v.192, p.143-148, 2013.

FARNAZ, M.; TAVASSOLI, M.; YAKHCHALI, M.; DARVISHZADEH, R. Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* using microscopic and molecular methods in horses in suburb of Urmia, Iran. **Veterinary Research Forum**, v.5, n.2, p.12-133, 2014.

FRIEDHOFF, K.T. Interaction between parasite and tick vector. **International Journal for Parasitology**, v.20, n.4, p.525-535, 1990.

GELLESSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.54, p.741-750, 2000.

GEORGES, K.C.; EZEOKOLI, C.D.; SPARAGANO, O.; PARGASS, I.; CAMPBELL, M.; D'ABADIE, R.; YABSLEY, M.J. A case of transplacental transmission of *Theileria equi* in a foal in Trinidad. **Veterinary Parasitology**, v.175, p.363-366, 2011.

HARTWIG, D.D.; OLIVEIRA, T.L.; SEIXAS, F.K.; FORSTER, K.M.; RIZZI, C.; HARLEBEN, C.P.; MCBRIDE, A.J.; DELLAGOSTIN, O.A. High yield expression of leptospirosis vaccine candidates LigA and LipL32 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, 9: 98, 2010.

HEIM, A.; PASSOS, L.M.; RIBEIRO, M.F.; COSTA-JUNIOR L.M.; BASTOS C.V.; CABRAL, D.D.; HIRZMANN, J.; PFISTER, K. Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic areas of Brazil. **Parasitology Research**, v.102, p.63-68, 2007.

HEUCHERT, C.M.; DE GIULLI, V. JR.; DE ATHAIDE, D.F.; BÖSE, R.; FRIEDHOFF, K.T. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.85, n.1, p.1-11, 1999.

HIRATA, H.; IKADAI, H.; YOKOYAMA, N.; XUAN, X.; FUJISAKI, K.; SUZUKI, N.; MIKAMI, T.; IGARASHI, I. Cloning of a truncated *Babesia equi* gene encoding an 82-kilodalton protein and its potential use in an enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal Clinical Microbiology**, v.40, p.1470-1474, 2002.

HIRATA, H.; YOKOYAMA, N.; XUAN, X.; FUJISAKI, K.; SUZUKI, N.; IGARASHI, I. Cloning of a novel *Babesia equi* gene encoding a 158-kilodalton protein useful for serological diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.12, n.2, p.334-338, 2005.

HUANG, X.; XUAN, X.; YOKOYAMA, N.; XU, L.; SUZUKI, H.; SUGIMOTO, C.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; IGARASHI, I. High-Level Expression and Purification of a Truncated Merozoite Antigen-2 of *Babesia equi* In *Escherichia coli* and its Potential for Immunodiagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.1147-1151, 2003.

HUANG, X.; XUAN, X.; XU, L.; ZHANG, S.; YOKOYAMA, N.; SUZUKI, N.; IGARASHI, I. Development of Immunochromatographic test with Recombinant EMA-2 for the Rapid Detection of Antibodies against *Babesia equi* in Horses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.359-361, 2004.

HUANG, X.; XUAN, X.; YOKOYAMA, N.; KATAYAMA, Y.; ANZAI, T.; IGARASHI, I. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant antigens for the serodiagnosis of equine *Babesia* infections. **Veterinary Parasitology**. Short communication, 2006.

IKADAI, H; SASAKI, M; ISHIDA, H; MATSUU, A; IGARASHI, I; FUJISAKI, T. Molecular evidence of *Babesia equi* transmission in *Haemaphysalis longicornis*. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v.76, n.4, p.694-697, 2007.

INVITROGEN, Manual, 2010. *Pichia* Expression Kit for Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZ α in *Pichia pastoris* Cat. N° K1740-01, Rev.

JOUGLARD, S.D.; MEDEIROS, M.A.; VAZ, E.K.; BASTOS, R.G.; CUNHA, C.W.; ARMOA, G.R.G.; DELLAGOSTIN, A.O. An ultra-rapid and inexpensive plasmid preparation method for screening recombinant colonies. **Abstracts American Society for Microbiology**, H-71: 234, 2002.

KAPPMAYER, L.S; PERRYMAN, L.E; KNOWLES, D.P. A *Babesia equi* gene encodes a surface protein with homology to *Theileria* species. **Molecular Biochemical Parasitology**, v.62, p.121-124, 1993.

KAPPMAYER, L.S; THIAGARAJAN, M.; HERNDON, D.R.; RAMSAY, J.D.; CALER, E.; DJIKENG, A.; GILLESPIES, J.J.; LAU, A.O.T.; ROALSON, E.H.; SILVA, J.C.; SILVA, M.G.; SUAREZ, C.E.; UETI, M.W.; NENE, V.M.; MEALEY, R.H.; KNOWLES, D.P.; BRAYTON, K.A. Comparative genomic analysis and phylogenetic position of *Theileria equi*. **BMC Genomics**, v.13, n.603, p.5-13, 2012.

KARATEPE, B.; KARATEPE, M.; ÇAKMAK, A.; KARAER, Z.; ERGÜN, G. Investigation of seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Nigde province, Turkey. **Tropical Animal Health and Production**, v.41, p.109-113, 2009.

KERBER, C.E.; FERREIRA F.; PEREIRA M.C. Control of equine piroplasmosis in Brazil. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.66, p.123-127, 1999.

KERBER, C.E. Piroplasmose 2005. **Paddock Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias**. Disponível em: <http://www.bichoonline.com.br/artigos/Xck0001.html>. Acesso em: 28 de dezembro de 2015.

KERBER, C.E.; LABRUNA, M.B.; FERREIRA, F.; DE WAAL, D.T.; KNOWLES, D.P.; GENNARI, S.M. Relevance of equine Piroplasmosis and its association with tick infestation in the State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Online)**, v.18, n.4 Jaboticabal, 2009.

KESSLER, R.H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.21, n.4, 2001. KNOWLES, D.P.; PERRYMAN, L.E.; GOFF, W.L.; MILLER, C.D.; HARRINGTON, R.D.; GORHAM, J.R. A monoclonal antibody defines a geographically conserved surface protein of *Babesia equi* merozoítos. **Infection and immunity**, v.59, p.2314-2417, 1991.

KNOWLES, D.P.; KAPPMAYER, L.S.; STILLER, D.; HENNAGER, S.G.; PERRYMAN, L.E. Antibody to a recombinant merozoíto protein epitope identified horses infected with *Babesia equi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.3122-3126, 1992.

KNOWLES, D.P. JR.; KAPPMAYER, L.S.; PERRYMAN, L.E. Specific immune responses are required to control parasitemia in *Babesia equi* infection. **Infection and immunity**, v.62, p.1909-1913, 1994.

KNOWLES, D.P. JR.; KAPPMAYER, L.S.; PERRYMAN, L.E. Genetic and biochemical analysis of erythrocyte-stage surface antigens belonging to a family of highly conserved proteins of *Babesia equi* and *Theileria* species. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 90, p. 69-79, 1997.

KOCKEN, C.H.M.; DUBBELD, M.A.; VAN DER WEL, A.; PRONK, J.T.; WATERS, A.P.; LANGERMANS, J.A.M.; THOMAS, A.W. High-Level Expression of *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1) in *Pichia pastoris*: Strong Immunogenicity in *Macaca mulatta* Immunized with *P. vivax* AMA-1 and Adjuvant SBAS2. **Infection and immunity**, v.67, p.43-49, 1999.

KUMAR, S.; YOKOYAMA, N.; KIM, J.Y.; HUANG, X.; INOUE, N.; XUAN, X.; IGARASHI, I.; SUGIMOTO, C. Expression of *Babesia equi* EMA-1 and EMA-2 during merozoite developmental stages in erythrocyte and their interaction with erythrocytic membrane skeleton. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.133, p.221-227, 2004.

KUMAR, S.; YOKOYAMA, N.; KIM, J.Y.; BORK-MIMM, S.; INOUE, N.; XUAN, X.; IGARASHI, I.; SUGIMOTO, C. *Theileria equi* merozoite antigen-2 interacts with actin molecule of equine erythrocyte during their asexual development. **Experimental Parasitology**, v.132, p.508-512, 2012.

KUMAR, S.; KUMAR, R.; GUPTA, A.K.; YADAV, S.C.; GOYAL, S.K.; KHURANA, S.K.; SINGH, R.K. Development of EMA-2 recombinant antigen based enzyme-linked immunosorbent assay for seroprevalence studies of *Theileria equi* in Indian equine population. **Veterinary Parasitology**, v.198, p.10-17, 2013.

LABRUNA, M.B.; KERBER, C.E.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.H.; DE WAALD, T.; GENNARI, S.M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.97, p.1-14, 2001.

LEVINE, N.D. **Veterinary Protozoology**. Iowa State University Press, Iowa, USA. 414 pp, 1985.

LORDING, P.M. Erythrocytes. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, Philadelphia, v.24, p.225-237, 2008.

MANS, B.J.; PIENAAR, R.; LATIF, A.A. A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology. **International Journal Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.4, p.104-118, 2015.

MAKRIDES, S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiology Review**, v.6, p.512-538, 1996.

MALEKIFARD, F.; TAVASSOLI, M.; YAKHCHALI, M.; DARVISHZADEH, R. Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* using microscopic and molecular methods in horses in suburb of Urmia, Iran. **Veterinary Research Forum**, v.5, n.2, p.129-133, 2014.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento) em <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>. Acesso em: 28 de dezembro de 2015.

MEALEY, R.H.; KAPPMAYER, L.S.; UETI, M.W.; WAGNER, B.; KNOWLES, D.P. Protective Effects of Passively Transferred Merozoite-Specific Antibodies against *Theileria equi* in Horses with Severe Combined Immunodeficiency. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.19, n.1, p.100-104, 2012.

MEHLHORN, H. & SCHEIN, E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. **Parasitology Research**, v.84, p.467-475, 1998.

MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simples salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v.16, n.3, p.1215, 1988.

MUNKHJARGAL, T.; SIVAKUMAR, T.; BATTSETSEG, B.; NYAMJARGAL, T.; ABOULAILA, M.; PUREVTSEREN, B.; BAYARSAIKHAN, D.; BYAMBAA, B.; TERKAWI, M.A.; YOKOYAMA, N.; IGARASHI, I. Prevalence and genetic diversity of equine piroplasms in Tov province , Mongolia. **Infection, Genetics and Evolution**, v.16, p.178-185, 2013.

NANTES, J.H.; ZAPPA, V. Nutaliose- Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 10, 2008.

NICOLAIEWSKY, T.B.; RICHTER, M.F.; LUNGE, V.R.; CUNHA, C.W.; DELAGOSTIN, O.; IKUTA, N.; FONSECA, A.S.; DA SILVA, S.S.; OZAKI, L.S. Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, v.101, n.1, p.9-21, 2001.

NIZOLI, L.Q.; CONCEIÇÃO, F.R.; SILVA, S.S.; DUMMER, L.A.; SANTOS JR, A.G.; LEITE, F.P.L. Immunogenicity and antigenicity of the recombinant EMA-1 protein of *Theileria equi* expressed in the yeast *Pichia pastoris*. Brazil. **Journal Veterinary Parasitology**, v.18, n.2, p.1-4, 2009.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Pruebas de diagnóstico prescritas y de sustitución para las enfermedades de la lista de la OIE, 2010.

Disponível em:

<http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/2010/es_chapitre_1.1.3.htm>. Acesso em: 23 out. 2012.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Equine piroplasmosis. In: **Manual of diagnostic and vaccines for terrestrial animals**, 2008. CHAPTE 2.5.8.

Disponível em:

http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.08_EQUINE_PIR_OPLASMOSIS.PDF. Acesso em: 05 fev. 2014.

[OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES \(OIE\). Terrestrial Manual 2014.](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.08_EQUINE_PIR_OPLASMOSIS.pdf)

Disponível em :

http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.08_EQUINE_PIR_OPLASMOSIS.pdf. Acesso em: 08 de janeiro de 2016.

PHIPPS, L.P. & OTTER, A. Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v.154, p.406-408, 2004.

PINHEIRO, A.F.; BORSUK, S.; BERBE, M.E.A.; PINTO, L.S.; ANDREOTTI, R.; ROOS, T.; ROLLOF, B.C.; LEITE, F.P.L. Expression of *Neospora caninum* NcSRS2 surface protein in *Pichia pastoris* and its application for serodiagnosis of Neospora infection. **Pathogens and Global Health**, v.103, n.3, p.116-121, 2013.

PREISER, P.; KAVIRATNE, M.; KHAN, S.; BANNISTER, L.; JARRA, W. The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. **Microbes and Infection**, v.2, n.12, p.1461-1477, 2000.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W. (Eds). **Veterinary Medicine – A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats**. (10° Ed). Philadelphia: Saunders, p. 673-762, 2007.

RAMPERSAD, J.; CESAR, E.; CAMPBELL, M.D.; SAMLAL, M.; AMMONS, D. A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. **Veterinary Parasitology**, v.114, p.81-87, 2003.

RAMSAY, J.D.; UETI, M.W.; JOHNSON, W.C.; SCOLES, G.A.; KNOWLES, D.P.; MEALEY, R.H. Lymphocytes and Macrophages are infected by *Theileria equi*, but T cells and B cells are not required to establish infection *in vivo*. **PLOS ONE**, v.8, n.10: e76996, 2013.

RONCATI, N.V.; BACCARIN, R.Y.A.; MASSOCO, C.O.; FERNANDES, W.R. Occurrence of congenital in *Theileria equi* Lusitano pure blood foals, diagnosed by RT-PCR. **Education Journal in Veterinary Medicine and Zootechny of CRMV-SP. São Paulo**, v.9, n.1, p.46-52, 2011.

ROTHSCHILD, C. & KNOWLES, D. Equine Piroplasmosis. In: SELLON, D.C; LONG, M.T. Saunders (Eds.), **Equine Infectious Diseases**. Elsevier, St Louis, MO, p. 465-473, 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning. **A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, v.9, p.9.16-9.17, 2001.

SARDUY, E.S. & PLANES, M.C. Efficient expression systems for cysteine proteases of malaria parasites. **Bioengineered**, v.4, n.2, p.107-114, 2013.

SANTOS, T.M.; ROIER, E.C.R.; SANTOS, H.A.; PIRES, M.S.; VILELA, J.A.R.; MORAES, L.M.B.; ALMEIDA, F.Q.; BALDANI, C.D.; MACHADO, R.Z.; MASSARD, C.L. Factors associated to *Theileria equi* in equids of two microregions from Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Online)**, v.20, n.3, Jaboticabal, 2011.

SCHEIN, E. Equine babesioses. In: RISTIC, M. (Ed.) Babesiosis of domestic animals and man. Florida: CRS Press, p.197-208, 1988.

SORENSEN H.P. Towards universal systems for recombinant gene expression. **Microbial Cell Factories**, v.9, p.27, 2010.

TANAKA, T.; XUAN, X.,; IKADAI, H.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; MIKAMI, T.; SUZUKI, N. Expression of *Babesia equi* merozoite antigen-2 by recombinant baculovirus and its use in the ELISA. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1803-1808, 1999.

TENDER, A.M. & FRIEDHOFF, K.T. Serodiagnosis of experimental and natural *Babesia equi* and *B. caballi* infections. **Veterinary Parasitology**, v.20, p.49-61, 1986.

UETI, M.W.; PALMER, G.H.; KAPPMAYER, L.S.; SCOLES, G.A.; KNOWLES, D. Expression of Equi Merozoite Antigen 2 during Development of *Babesia equi* in the Midgut and Salivary Gland of the Vector Tick *Boophilus microplus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.5803-5809, 2003.

UETI, M.W., PALMER, G.H., SCOLES, G.A., KAPPMAYER, L.S., KNOWLES, D.P. Persistently infected horses are reservoirs for intrastadial tick-borne transmission of the Apicomplexan Parasite *Babesia equi*. **Infection and Immunity**, v.76, p.3525-3529, 2008.

UILENBERG, G. *Babesia* – A historical overview. **Veterinary Parasitology**, v.138, p.3-10, 2006.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. **Veterinary Parasitology**, 2º Ed. Oxford, UK: Blackwell Science Ltda, 1996.

VIANNA, A.M.; GONÇALES, R.A.; LARA, A.P.S.S.; PINTO, L.S.; NIZOLI, L.Q.; LEITE, F.P.L. Heterologous expression of EMA-2 (*equi merozoite antigen*) of *Theileria equi* in *Pichia pastoris* with potential use in immunobiologics. **Ciência. Rural**, v.44, n.10, p.1830-1836, 2014.

ZAUGG, J.L. Babesiosis. In SMITH, B.P., Large Animal Internal Medicine. p.105-1055, St. Louis, Missouri, USA: Mosby Inc., 2002.

ZOBBA, R.; ARDU, M.; NICCOLINI, S.; CHESSA, B.; MANNA, L.; COCCO, R.; PARPAGLIA, M.L.P. Clinical and laboratory findings in equine piroplasmosis. **Journal of Equine Veterinary Science**, 28, 301-308, 2008.

Anexos



Pelotas, 17 de junho de 2014

De: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEE A)

Para: Professor Fábio Pereira Leivas Leite

Centro de Desenvolvimento Tecnológico

Senhor Professor:

A CEEA analisou o projeto intitulado: **“Utilização da proteína recombinante de *Theileria equi*, expressa em *Pichia pastoris*, como imunobiológico”**, processo nº23110.004256/2014-58, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer e assiná-lo, reenviar o processo à CEEA. Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 4256-2014).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da CEEA

Ciente em: 02/07/2014

Assinatura do Professor Responsável: