



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



PROTEÇÃO DE BOVINOS CONTRA *Haemonchus placei* E
Haemonchus contortus APÓS IMUNIZAÇÃO COM ANTÍGENOS
ORIUNDOS DA MEMBRANA INTESTINAL DE *H. contortus*.

CÉSAR CRISTIANO BASSETTO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas e Microorganismos.

Prof. Adj. Alessandro Francisco Talamini do Amarante

Orientador

**BOTUCATU - SP
2011**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

PROTEÇÃO DE BOVINOS CONTRA *Haemonchus placei* E
Haemonchus contortus APÓS IMUNIZAÇÃO COM ANTÍGENOS
ORIUNDOS DA MEMBRANA INTESTINAL DE *H. contortus*.

César Cristiano Bassetto

Biólogo

Profº Adj. Alessandro Francisco Talamini do Amarante

Orientador

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas e Microorganismos.

BOTUCATU - SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Bassetto, César Cristiano.

Proteção de bovinos contra *Haemonchus placei* e *Haemonchus contortus* após imunização com antígenos oriundos da membrana intestinal de *H. contortus* / César Cristiano Bassetto. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista - Instituto de Biociências, Botucatu, 2011.

Orientador: Alessandro Francisco Talamini do Amarante

Capes: 21302006

1. Bovino – Parasito - Imunologia. 2. *Haemonchus contortus*.

Palavras-chave: Bovino; *Haemonchus contortus*; *Haemonchus placei*; Parasita gastrointestinal; Vacina;

Dedico

Aos meus pais Benedito M. Bassetto e Ana Terezinha Santi Bassetto e a minha irmã Silmara C.

Bassetto

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Santíssima Trindade e a Nossa Senhora da Conceição Aparecida, por me dar a oportunidade e a força para realizar mais um sonho na minha vida.

Agradeço meu pai Dito Bassetto e minha mãe Terezinha pelo apoio em todos os sentidos e a minha irmã Silmara, por ter me apoiado sempre.

Agradeço e agradecerei eternamente minha tia Lúcia e minha prima Rita por terem me acolhido em sua casa durante todo o período do mestrado, obrigado pela casa, comida, carro entre outras coisas e por terem me aguentado todo este tempo. Da mesma forma devo agradecer minhas tias Antônia e Zilda, pela força e ajuda nos finais de semana quando me ajudavam a alimentar os bezerros e limpar as baias, para que eu tivesse tempo de ver minha família, obrigado também, pela roupa lavada e os “docinhos”.

Agradeço também Bruna F. da Silva e sua família, por toda ajuda nesta minha caminhada. Vamos criar bezerros de novo Bruna?

Agradeço a todas as pessoas da minha família que de uma forma ou outra me deram forças e coragem para vencer este desafio na minha vida, não vou citar nomes, pois seriam mais ou menos uns 50 nomes e ficaria cansativo ler todos, porém em especial cito duas pessoas, Ivete Marioto e João Carnieto que já não se encontram junto de nós, que Deus os abençoe e obrigado pela força.

Agradeço a todos os meus amigos que disseram ou pelo menos pensaram que eu estava louco por não sair de casa e ficar estudando e a todos que sempre me deram forças para continuar os meus estudos.

Agradeço ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu – SP, em especial ao Prof. Dr. Alessandro F. T. do Amarante pela oportunidade de poder realizar no Laboratório de Helminologia de Veterinária, Estágio de Aprimoramento em 2007, Iniciação Científica em 2008 e o Mestrado em 2009 e 2010. Agradeço por tantas vezes ter-me feito ficar com as orelhas vermelhas, momentos que foram essenciais para o meu crescimento. Obrigado professor Alessandro pelos ensinamentos, pela forma que o senhor ensina... deixa quase tudo no ar para que possamos nos esforçar e buscar a resposta, seja ela a mais simples ou aquela a qual ninguém sabe a resposta ainda, pois na Biologia tudo é verdade até que se prove o contrário e no “nosso” laboratório o que mais se tem são dúvidas do

que respostas sejam elas as mais simples até a mais complicadas, do tipo “Porque os parasitas são específicos?”.

Obrigado a todos os amigos e amigas do Departamento de Parasitologia pela força e conhecimento transmitido, especialmente agradeço ao Valdir Ângelo Paniguel, Roberto Gonzales, Nilza Magnoni e a todos os docentes deste departamento.

Agradeço aos pós-graduandos do Laboratório de Helminologia Veterinária, Bruna F. da Silva, Camila O. de Carvalho, Fabiana A. Almeida, Daniel Cardia e Maurícia Brandão. Aproveito também para agradecer todos os estagiários que passaram por este laboratório e me ajudaram no experimento, são eles Maria Regina Lucas da Silva, Cássio do Nascimento Florêncio, Barbara O. Borges, Bruno Stéfano Lima Dallago, Jorge Konrado Xavier e Samir Moura Kadri e Michele C. dos Santos.

Agradeço também ao Dr. David William Smith por ter entrado em contato com o Prof. Alessandro Amarante em novembro de 2008 e sugerido fazer este experimento. Momento este que eu estava em dúvida qual experimento fazer no mestrado e o Prof. Alessandro sugeriu-me este também e na hora eu aceitei sem saber a trabalhadeira que ele seria, mas foi muito gratificante!

Jamais deixaria de agradecer aos proprietários das fazendas Fidenza e Campestre pelos bezerros que foram doados para a realização deste experimento. Sempre me lembrarei dos conselhos de Humberto e João Paulo proprietários da fazenda Fidenza, pois sem a ajuda deles eu não teria conseguido criar os bezerros.

Agradeço aos veterinários da Clínica de Grandes Animais e da Cirurgia de Grandes Animais do Hospital Veterinário da FMVZ de Botucatu, pela ajuda nos momentos em que precisei tratar alguns dos problemas de saúde dos bezerros.

Agradeço a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela bolsa que me foi concedida e pelo financiamento do projeto.

Desculpa se esqueci de alguém, mas de qualquer forma sinta-se agradecido, muito obrigado.

Agradeço a todos, que de uma maneira ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho, que Deus os abençoe!

SUMÁRIO

	Página
Resumo.....	1
Abstract.....	3
CAPÍTULO 1.....	4
1. Considerações iniciais.....	5
2. Utilização de vacinas contra helmintos de importância veterinária.....	8
2.1. Larvas irradiadas.....	8
2.2. Antígenos naturais e ocultos.....	8
2.2.1. H11.....	10
2.2.2. H-gal-GP.....	12
2.2.3. Associação de H11 e H-gal-GP.....	15
2.3. Imunização de bovinos.....	15
2.4. Proteção cruzada das vacinas.....	16
2.5. Casos de insucesso.....	17
3. Adjuvantes.....	18
4. Considerações finais.....	18
4. Referências bibliográficas.....	19
CAPITULO 2.....	27
Protection of calves against <i>Haemonchus placei</i> and <i>Haemonchus contortus</i> after immunization with gut membrane proteins from <i>H. contortus</i>	28
Abstract.....	29
1. Introduction.....	30

2. Materials and methods.....	30
2.1. Calves.....	30
2.2. Infective larvae (L3).....	31
2.3. Faecal examination and worm counts.....	31
2.4. ELISA.....	32
2.5. Preparation, formulation and administration of the vaccine.....	33
2.6. Design of the experiment.....	33
2.7. Statistical analyses.....	34
3. Results.....	34
4. Discussion.....	35
References.....	37
Acknowledgements.....	39

SUMÁRIO DE FIGURAS

Capítulo 2	Página
Figure 1 Mean serum antibody titre of calves after immunization (V) with gut membrane antigens of <i>Haemonchus contortus</i> . Control animals received only the vaccine adjuvant. Animals were challenged (Ch) with <i>H. contortus</i> or <i>Haemonchus placei</i> seven days after the last vaccination. Bars represent standard error of the mean.....	40
Figure 2 Group mean eggs per gram of faeces (EPG) by McMaster (A) and Willis (B) techniques in calves challenged with <i>Haemonchus contortus</i> or <i>Haemonchus placei</i> after	

immunization with gut membrane antigens of *H. contortus*. Control animals received only the vaccine adjuvant. Bars represent standard error of the mean.....41

Figure 3 Mean cumulative faecal egg counts (FEC - Willis technique) and worm burdens of calves challenged with *Haemonchus contortus* or *Haemonchus placei* after immunization with gut membrane antigens of *H. contortus*. Control animals received only the vaccine adjuvant. Bars represent standard error of the mean.....42

RESUMO

Neste estudo avaliou-se a eficácia de uma vacina constituída de glicoproteínas obtidas da membrana do intestino de *Haemonchus contortus* em bezerros desafiados com *H. contortus* ou *H. placei*. Bezerros holandeses machos, criados livres de infecções por helmintos, foram distribuídos em quatro grupos com nove animais cada. Dois grupos foram vacinados com 50 µg do imunógeno diluído no adjuvante QuilA, enquanto os outros dois grupos foram os controles, receberam apenas adjuvante. A vacina foi administrada três vezes com intervalo de 21 dias entre as aplicações. Os bezerros foram artificialmente infectados sete dias após a última imunização e sacrificados para contagem dos vermes 43 dias depois. Os bezerros de um dos grupos vacinados receberam 8000 larvas infectantes (L3) de *H. contortus* enquanto os do outro grupo foram infectados com o mesmo número de L3 de *H. placei*. Os controles foram infectados na mesma ocasião com o mesmo número de L3 de *H. contortus* ou *H. placei*. A vacinação reduziu significativamente a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e a carga parasitária ($P < 0,01$). A titulação de anticorpos nos animais controle permaneceu perto de zero enquanto nos animais vacinados verificou-se elevada titulação de anticorpos no soro. Os bezerros vacinados e desafiados com *H. contortus* não eliminaram ovos nas amostras de fezes, enquanto os controles apresentaram média máxima (\pm erro padrão) de 61,1 ($\pm 42,3$) OPG 31 dias após a infecção. A partir deste dia, a contagem de OPG diminuiu progressivamente neste grupo controle com apenas um animal eliminando ovos nas fezes 42 dias após a infecção. Nos controles de *H. placei*, o ápice na contagem de OPG ocorreu 35 dias após a infecção ($61,1 \pm 21,7$) e permaneceu relativamente constante até o final do estudo, enquanto no grupo vacinado apenas dois animais eliminaram ovos nas fezes, na última coleta. Os animais controle infectados com *H. placei* tiveram carga parasitária média de 551,1 ($\pm 93,7$) parasitas, enquanto os animais vacinados e

infectados com a mesma espécie apresentaram em média 174,4 ($\pm 56,3$) parasitas. A taxa de estabelecimento de *H. contortus* foi menor que a de *H. placei* ($P < 0,01$) com média de 163,9 ($\pm 39,4$) e 74,4 ($\pm 20,4$) espécimes no grupo controle e no vacinado, respectivamente. Em conclusão, a vacinação com antígenos obtidos de *H. contortus* protege bezerros contra a infecção por *H. placei* e *H. contortus*.

ABSTRACT

This study evaluated the efficacy of a vaccine containing integral membrane glycoproteins from the intestine of *Haemonchus contortus* in calves challenged with *H. contortus* or *Haemonchus placei*. Males Holstein calves, raised worm free, were distributed into four groups with nine animals each. Two groups were vaccinated with 50 µg of antigen diluted on QuilA adjuvant, while the others two groups were the controls and received only adjuvant. The vaccine was administered three times 21 days apart. Either vaccinated or not and challenged with either 8,000 *H. contortus* or *H. placei* infective larvae. The calves were challenged 7 days after the last immunization and killed for worm counts 43 days later. Vaccination significantly reduced faecal egg counts (FEC) and worm burdens ($P < 0.01$). Antibody titres in the calves control stayed close to zero meanwhile in the calves vaccinated was observed high antibody titres in the serum. Calves vaccinated and challenged with *H. contortus* did not shed eggs in faecal samples, while the controls showed a maximum mean (\pm standard error) FEC of 61.1 (± 42.3) at 31 days post infection. Then, FEC progressively declined in this group with only one animal shedding eggs in faeces 42 days post infection. With *H. placei* the controls FEC peaked at 35 days post infection (61.1 \pm 21.7) and remained relatively constant until the end of the study, while in the vaccinated group only two animals shed eggs and only on the last collection date. With *H. placei* the controls contained a mean of 551.1 (± 93.7) parasites, while the vaccinates had 174.4 (± 56.3) worms. The establishment rate of *H. contortus* was lower than that of *H. placei* ($P < 0.01$) with an average of 163.9 (± 39.4) and 74.4 (± 20.4) specimens in the control and vaccinated groups, respectively. It was concluded that vaccination of calves with antigens obtained from *H. contortus* conferred protection against both *H. placei* and *H. contortus*.

CAPÍTULO 1

1. Considerações iniciais

Um dos principais problemas sanitários dos rebanhos bovinos são as infecções por nematódeos gastrintestinais que afetam especialmente o desenvolvimento de animais jovens. Soutello et al. (2007) observaram que bovinos jovens sem tratamento com anti-helmíntico deixaram de ganhar em média 53 kg em um período de 18 meses, em comparação com animais tratados profilaticamente.

Várias espécies de nematódeos gastrintestinais parasitam os bovinos no Brasil. As principais são: *Haemonchus placei*, *Haemonchus similis*, *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus axei*, *Cooperia punctata*, *Cooperia spatulata*, *Cooperia pectinata*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Bunostomum phlebotomum*, *Oesophagostomum radiatum*, *Trichuris discolor* e *Trichuris globulosa* (CATTO et al., 1993; AMARANTE et al., 1997; LIMA, 1998; NICOLAU et al., 2002; BRICARELLO et al., 2007; ROCHA et al., 2008). Dessas, predominam numericamente as espécies de *Cooperia* spp., porém, *H. placei* é uma das que mais causa prejuízo devido ao seu hábito hematófago, o que acarreta em anemia e redução no ganho de peso dos animais (GENNARI et al., 1991). Santos et al. (2010) sugeriram diminuição na intensidade parasitária de *Cooperia* spp. e aumento na de *H. placei* em bovinos criados em Minas Gerais, o que demonstra a crescente importância desta última espécie, que no referido estudo apresentou prevalência de 100%.

Os nematódeos gastrintestinais em geral apresentam ciclo de vida direto, os sexos são separados, as fêmeas depositam ovos que são eliminados juntamente com as fezes dos animais e eclodem no ambiente (pastagem). Após a eclosão ocorrem quatro mudas, sendo os sucessivos estágios larvares denominados, L1, L2, L3 (infectante), estas duas primeiras mudas ocorrem no ambiente (pastagem), por isso são chamadas de larvas de vida livre. Após as larvas infectantes serem ingeridas pelo hospedeiro sofrem mais duas mudas passando para L4 e finalmente L5, que representa o adulto imaturo (TAYLOR et al., 2010).

Quando bovinos e ovinos compartilham pastagens, infecções cruzadas podem ocorrer envolvendo algumas espécies de nematódeos. Amarante et al. (1997) verificaram que *H. similis* é fortemente adaptado aos bovinos, *H. placei* é mais adaptado aos bovinos do que aos ovinos, enquanto que *H. contortus* é mais adaptado aos ovinos, porém, esta última espécie pode também infectar bovinos. Estes resultados foram corroborados em estudo recente realizado na região oeste do Estado de São Paulo, onde bezerros foram naturalmente infectados pelas três espécies de *Haemonchus*. Neste estudo, a espécie predominante nos bovinos foi *H. placei*, seguido de *H. contortus* e *H. similis* (CONDI et al., 2009). O parasitismo de bovinos por *H. contortus* também foi relatado nos Estados Unidos, onde essa espécie foi encontrada em número expressivo em bovinos mantidos em pastagem, sem contato com ovinos nos últimos 40 anos (GASBARRE et al., 2009).

A profilaxia da verminose bovina tem como base a utilização de anti-helmínticos. Em consequência da utilização frequente desses produtos tem sido cada vez mais comum o relato de casos de resistência anti-helmíntica em vários países do mundo como, por exemplo, Nova Zelândia (WAGHORN et al., 2006), Reino Unido (COLES et al., 1998), Argentina (ANZIANI et al., 2004), Irlanda do Norte (TAYLOR et al., 2001) e Estados Unidos (WILLIAMS & DeROSA, 2003).

No Brasil, a situação também é bastante preocupante. Em percentual elevado das 39 propriedades de criação de bovinos, avaliadas no Estado de Santa Catarina, houve registro de resistência à ivermectina, levamisol e albendazole (SOUZA et al., 2008). O mesmo aconteceu na região noroeste do Estado de São Paulo em 25 propriedades estudadas (SOUTELLO et al., 2007). Casos isolados de resistência também foram descritos em outros locais. Em Minas Gerais registrou-se resistência à ivermectina e doramectina (RANGEL et al., 2005); no Rio Grande do Sul observou-se resistência às lactonas macrocíclicas (MELLO et al., 2006); no oeste do Estado de São Paulo, verificou-se resistência à moxidectina (CONDI et al., 2009) e em Caraguatatuba, houve resistência de *H. placei* e *C. punctata* à ivermectina (PAIVA et al., 2001).

Além dos problemas da resistência anti-helmíntica, a população mundial está cada vez mais exigindo alimentos saudáveis e oriundos de sistemas produtivos que não ofereçam riscos ao ambiente. Desta maneira, o uso de produtos químicos, que deixam resíduos na carne, deverá sofrer restrições cada vez mais intensas.

Uma das medidas destinadas a minimizar a dependência da utilização de produtos químicos para a profilaxia das parasitoses seria o emprego de medidas alternativas para o controle da verminose.

2. Utilização de vacinas contra helmintos de importância veterinária

2.1. Larvas irradiadas

Em 1960, descobriu-se que as infecções induzidas artificialmente com larvas de *Dictyocaulus viviparus*, que foram atenuadas por irradiação, induzem forte proteção contra infecções naturais (revisado por SMITH, 1999a).

A irradiação de larvas infectantes de várias espécies de nematódeos impede que no hospedeiro ocorra o desenvolvimento do parasita e a formação da larva de quarto estágio, impedindo desta forma o ciclo de vida do parasita (revisado por JASMER & McGUIRE, 1996).

Esta técnica de atenuação foi testada contra helmintos gastrintestinais, mas infelizmente este método teve resultados satisfatórios apenas em condições experimentais para *H. contortus* e *T. colubriformis* em ovinos sexualmente maduros, mas a proteção foi parcial ou muito fraca em cordeiros (revisado por SMITH, 1999a).

2.2. Antígenos naturais e ocultos

Os parasitas hematófagos, ao consumirem sangue do hospedeiro, ingerem também as imunoglobulinas e os componentes do complemento. Se um animal for imunizado com antígenos internos do parasita, como, por exemplo, substância oriunda da membrana que reveste o trato digestório do parasita ocorrerá a formação de anticorpos contra as mesmas. Ao se alimentar, os anticorpos ingeridos pelo parasita se ligarão à superfície da membrana intestinal do helminto causando dano ou interferindo com o funcionamento da mesma. Isto poderá resultar em alterações deletérias para o parasita. Como esses antígenos são internos, eles não entram em contato com os tecidos do hospedeiro e não são expostos ao seu sistema imunológico em condições naturais. Por essa razão, tais antígenos são denominados “ocultos”.

Como exemplo de vacina que utiliza antígenos ocultos, há uma vacina desenvolvida contra *Ripicephalus microplus*, carrapato de bovinos (WILLADSEN et al., 1995). O hospedeiro é imunizado com proteínas da membrana intestinal do parasita hematófago e anticorpos circulantes são produzidos. Quando o parasita se alimenta do sangue do hospedeiro, ingere com o sangue os anticorpos que se ligam às proteínas da membrana intestinal. Os danos causados no epitélio intestinal levam a inanição, redução na fecundidade e debilidade do parasita, levando-o a morte (SMITH & ZARLENGA, 2006).

Ao contrário dos antígenos ocultos, os antígenos que entram em contato com os tecidos do hospedeiro ao longo do processo de infecção, tais como os produtos excretórios/secretórios eliminados pelo parasita, são denominados de antígenos naturais. Logicamente, contra estes antígenos o hospedeiro produz anticorpos.

No caso de helmintos, produtos excretórios/secretórios de *H. contortus* vêm sendo avaliados como vacinas. Verificou-se que os antígenos induzem forte resposta humoral e celular em ovinos (SCHALLIG et al., 1994) e que a vacina pode induzir uma resposta imune protetora (SCHALLIG & van LEEUWEEN, 1997; SCHALLIG et al., 1997). Pesquisas utilizando antígenos extraídos de *Schistosoma* sp., aplicados em animais de laboratório, também demonstram forte resposta imunológica contra o parasita (TENDLER et al., 1986; revisado por McMANUS & LOUKAS, 2008; TENDLER & SIMPSON, 2008).

Os antígenos excretórios/secretórios também são muito testados e com sucesso em cestódeos, onde antígenos recombinantes têm sido sintetizados e são altamente protetores (revisado por SMITH, 1999a).

A confirmação de que os antígenos intestinais induzem imunidade contra o nematódeo hematófago *H. contortus* foi primeiro demonstrada com a utilização de uma molécula isolada da superfície do epitélio intestinal de *H. contortus*, denominada de “Contortin”. Cordeiros imunizados com esse antígeno e desafiados com larvas infectantes (L3) de *H. contortus*, apresentaram redução de 78% na carga parasitária (MUNN et al., 1987). Este resultado mereceu destaque porque foi o primeiro a demonstrar que proteínas expressadas na superfície do intestino de nematódeos hematófagos poderiam induzir um nível elevado de proteção quando utilizadas como imunógeno.

Posteriormente, outras proteínas foram isoladas da superfície microvilar do intestino de *H. contortus* e utilizadas como imunógenos, tais como H11 e H-gal-GP, que serão melhor discutidas abaixo.

2.2.1. H11

H11 é uma glicoproteína de membrana expressada apenas na superfície microvilar do intestino de *Haemonchus* e ausente em outras partes do intestino e de outros tecidos (MUNN et al., 1993a).

Munn et al. (1993a), ao utilizarem H11, obtiveram um resultado melhor do que com “contortin”. Cordeiros imunizados e desafiados com *H. contortus* tiveram redução na carga parasitária que variou de 89% a 72%. As fêmeas de *H. contortus* foram mais susceptíveis à imunização do que os machos e a produção de ovos caiu 92%.

Smith et al. (1993a) observaram que o antígeno H11, quando utilizado com 95% de pureza, proporcionou redução média na produção de ovos de 94,6% e no número de machos e fêmeas adultos de 86,5% e 93,5%, respectivamente.

Na África do Sul, Munn et al. (1993b) observaram que cordeiros vacinados com o H11 diluído em Tween apresentaram redução de 51% no número total de vermes, 66% no número de fêmeas e 40% nas contagens de ovos por grama de fezes (OPG). Já o grupo vacinado com a proteína H11 enriquecida com Thesit 0,1%, teve redução de 88% no número de vermes, 94% e 81% no número de fêmeas e de machos, respectivamente. Um terceiro grupo foi vacinado com uma fração de H11 e teve redução média na carga parasitária de 70%.

Andrews et al. (1995) verificaram que ovelhas imunizadas com H11, no periparto, apresentaram 98-99% de redução na eliminação de ovos. Os cordeiros filhos das ovelhas vacinadas com H11 apresentaram proteção colostrual moderada contra um desafio realizado na quinta semana de vida, com redução de 51% nas contagens de OPG e de 71% no número de fêmeas adultas de *H. contortus*. IgG1 foi, majoritariamente, a imunoglobulina transferida aos cordeiros via colostro.

Munn et al. (1997) utilizaram a proteína H11 purificada, na forma original e desnaturada. Os autores observaram que a forma integral de H11 foi a mais eficaz tendo proporcionado redução na contagem de ovos de 99,8% e de 95% na quantidade de vermes. Já os resultados dos ovinos imunizados com a forma desnaturada apresentaram resultados muito inferiores, ou seja, com a desnaturação, houve perda da capacidade da H11 de induzir imunidade contra *H. contortus*.

Segundo Andrews et al. (1997), cordeiros vacinados com H11 permanecem protegidos por cinco ou seis meses após a vacinação, depois disso a imunidade adquirida se desenvolve, induzida pela ingestão contínua de larvas infectantes de *H. contortus*.

Para verificar se a proteína H11 tem efeito imunogênico em diferentes isolados de *H. contortus*, Munn et al. (1993b) utilizaram a vacina H11 elaborada no Reino Unido e comprovaram sua eficácia contra uma linhagem de *H. contortus* da África do Sul. Da mesma forma, Newton et al. (1995) concluíram que a vacina é eficaz contra linhagens de nematódeos de diferentes continentes (Austrália e Reino Unido).

Também foi observado que a vacina H11 teve eficácia em ovinos infectados com *H. contortus*, independentemente dos isolados apresentarem resistência ou susceptibilidade aos anti-helmínticos (SMITH & SMITH, 1993b; NEWTON et al., 1995).

2.2.2. H-gal-GP

Técnicas de fracionamento de glicoproteínas integrais das células da membrana luminal do intestino de *H. contortus* foram utilizadas para isolar frações com potencial imunogênico. Ovinos foram imunizados com várias frações candidatas e foi revelada uma fração seletivamente vinculada à lectina, com especificidade pela N-acetilgalactosamina, que induziu redução na quantidade média de vermes em 72% e na contagem de OPG em 93% (SMITH et al, 1994). A superfície do lúmen do intestino de exemplares de *Haemonchus*, recolhidos de ovinos imunizados com este antígeno, mostrou-se recoberto com imunoglobulina do hospedeiro, sugerindo que o efeito protetor foi devido aos anticorpos que interferiram no funcionamento do intestino do nematódeo (SMITH et al, 1994). Esta fração ficou chamada por H-gal-GP (“*Haemonchus* galactose – containing glycoprotein complex”) e é uma fração que seletivamente liga lectinas com especificidade por N-acetilgalactosamina (SMITH et al, 1994).

Sendo a glicoproteína H-gal-GP composta por vários peptídeos, Smith e Smith (1996) fracionaram a H-gal-GP em subunidades e verificaram que as formas fracionadas não foram tão efetivas na indução de imunidade contra *H. contortus*, ao contrário da fração integral, que conferiu proteção significativa contra o parasita (SMITH et al., 1999b).

Na tentativa de encontrar o principal imunógeno, Smith et al. (2000a) isolaram um dos muitos componentes de H-gal-GP e o denominaram de H-sialgal-GP (*Haemonchus* sialylated galactose – containing glycoprotein). Os pesquisadores imunizaram ovinos com H-sialgal-GP ou com H-gal-GP. Observaram que os dois antígenos foram igualmente eficazes, reduzindo o número de ovos de *Haemonchus* em 86% e 93% e os vermes adultos em 52% e 75%, respectivamente. A partir deste resultado, Smith et al. (2000a) utilizaram um segundo antígeno protetor que foi separado de H-sialgal-GP, e foi enriquecido por duas proteínas denominadas p46 e p52. A imunização dos ovinos com este antígeno causou redução de 78% na produção de ovos e de 33% na carga parasitária. Estes resultados foram significativamente inferiores aos obtidos com H-gal-GP e H-sialgal-GP.

Na África do Sul, Smith et al. (2001a) imunizaram ovelhas com a combinação dos antígenos H-gal-GP e ConA H11. Ao final do experimento, o grupo vacinado apresentou redução média de 71% nas contagens de OPG.

Smith et al. (2003a) identificaram que o maior componente de H-gal-GP é uma família de quatro metaloendopeptidases de zinco, denominadas MEPs 1-4. Várias combinações destes MEPs foram avaliadas em experimentos com imunização de ovinos e observou-se que MEP3 foi o mais efetivo. No entanto o grupo que recebeu H-gal-GP nativo apresentou redução de 93% na contagem de OPG e de 69% na carga parasitária em comparação com o grupo controle, sem vacinação, enquanto os grupos vacinados com o H-gal-GP dissociado tiveram apenas 29% de redução na produção de ovos e 13% de redução na carga parasitária.

Outra família de constituintes com complexo H-gal-GP foi descrito e testado por Smith et al. (2003b), são duas aspartil proteases chamadas PEPs, as quais isoladamente não conferiram significativa proteção aos ovinos, porém induziram resposta imune.

Smith (2007) verificou que não houve sinergia entre a vacinação com H-gal-GP e a aplicação de ivermectina ou fenbendazole contra um isolado de *H. contortus*, que apresentava resistência anti-helmíntica.

Recentemente, Cachat et al. (2010) utilizaram as formas recombinantes de MEP1, MEP3, MEP4 e PEP1 em um coquetel ou o complexo H-gal-GP em sua forma natural e observaram que no ELISA houve resposta contra o coquetel e o H-gal-GP, porém a contagem de OPG foi substancialmente reduzida apenas no grupo de cordeiros vacinados com H-gal-GP, redução de 88,5% comparado com o grupo controle, enquanto não houve redução significativa na contagem de OPG do grupo vacinado com o coquetel.

2.2.3. Associação de H11 e H-gal-GP

Em trabalho realizado na Luisiana (EUA), ovelhas naturalmente infectadas com *H. contortus* foram distribuídas em três grupos: o primeiro grupo foi imunizado com vacina original que continha H11, H-gal-GP e adjuvante; o segundo grupo foi inoculado apenas com adjuvante e o terceiro, com solução salina. As ovelhas do primeiro grupo, que receberam os antígenos, apresentaram contagem de OPG sempre menor do que os outros dois grupos (KABAGAMBE et al., 2000).

Le Jambre et al. (2008), na Austrália, vacinaram cordeiros Merino, criados a pasto, com H11 e H-gal-GP e verificaram que a contagem de OPG e a anemia foram significativamente reduzidos nos animais vacinados e, ainda, que a pastagem dos cordeiros vacinados teve menor contaminação com larvas infectantes de *H. contortus*, do que a pastagem dos cordeiros não vacinados.

Tem sido mostrado que cordeiros, cabritos e ovelhas no periparto podem ser imunizados e que alguma proteção é transferida aos cordeiros pelo colostro. No entanto, a esperança é que a haemoncose possa ser controlada pela imunização de cordeiros antes do desmame e ovelhas durante a gestação para prevenir o aumento da contagem de OPG durante o periparto (revisado por SMITH, 1999a).

2.3. Imunização de bovinos

Em estudo realizado com bezerros nos EUA com proteína intestinal isolada de *H. placei*, Siefker e Rickard (2000a) verificaram que a vacina propiciou significativa redução no comprimento dos vermes adultos, no número de ovos no útero das fêmeas, assim como na contagem de OPG. Os bezerros vacinados também tiveram aumento significativo de IgG1 e de IgG2 do soro, mas não houve diferença significativa de IgM entre o grupo vacinado e o controle.

Em Mississippi – EUA, Siefker e Rickard (2000b) imunizaram bezerros com homogeneizado intestinal de *H. placei*, e desafiaram os bezerros com *Ostertagia ostertagi*. Os resultados, no entanto, não foram promissores, pois não houve diferença estatística entre o grupo controle e o grupo vacinado em relação ao número total de vermes e a contagem de OPG. Os autores sugeriram que talvez esse resultado tenha ocorrido devido à quantidade insuficiente de anticorpos ingeridos por *O. ostertagi*.

Uma vacina com glicoproteínas da membrana do intestino de *O. ostertagi*, denominada Oo-gal-GP (*Ostertagia ostertagi* galactose – containing glycoprotein complex), foi desenvolvida na Escócia. Em bezerros, a vacina propiciou redução significativa na produção de ovos de *O. ostertagi*, porém, sem efeito no número de vermes. Já quando ovinos foram imunizados com Oo-gal-GP e desafiados com L3 de *H. contortus*, observou-se proteção cruzada eficiente contra esta espécie de parasita, com redução entre 81% e 97% na produção de ovos e entre 57% e 84% no número de vermes (SMITH et al., 2000b).

No Brasil, Jensen e Vieira-Bressan (2008) imunizaram bezerros com um extrato intestinal de *H. placei*, ou com frações solúveis de *H. placei* em Triton X-100. Os animais foram desafiados com 120.000 L3 de *H. placei* e sacrificados 40 dias após. A contagem de OPG foi 49% e 57%, respectivamente, menor em comparação com o grupo controle. Os animais imunizados tinham maior nível sérico de IgG do que os animais controle depois da segunda imunização, com pico na quarta, e última, imunização.

2.4. Proteção cruzada das vacinas

Estudos vêm sendo realizados para avaliar a proteção cruzada dos antígenos em diferentes gêneros de helmintos na tentativa de se chegar a um único imunógeno capaz de proteger os animais contra as principais espécies de helmintos.

Em experimento realizado por Smith (1993c), verificou-se que cordeiros imunizados com H11, extraído da membrana intestinal de *H. contortus* não apresentaram nenhuma proteção cruzada contra *O. circumcincta* ou *Nematodirus battus*.

Smith et al. (2001b) imunizaram ovinos com a combinação H11 e H-gal-GP, e desafiaram diferentes grupos de animais com uma das seguintes espécies: *H. contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *T. axei* e *C. oncophora*. Contra *H. contortus* houve redução de 99% e 92%, respectivamente, nas contagens de OPG e vermes. Nenhuma diferença significativa foi detectada nas contagens de OPG ou vermes entre os ovinos imunizados e os ovinos controle, desafiados com *T. circumcincta* e *T. axei*. No caso de *C. oncophora*, os animais imunizados apresentaram menores contagens de OPG que os controles apenas nos primeiros dias após o desafio. Portanto, apesar de ser extremamente efetiva contra *H. contortus*, a vacinação com a combinação de H11 e H-gal-GP não confere proteção contra *T. circumcincta*, *T. axei* e *C. oncophora*. Em outro experimento, ovinos foram imunizados com glicoproteínas da membrana intestinal de *T. circumcincta* e desafiados com *T. circumcincta* ou *H. contortus*, nenhuma proteção foi detectada contra *T. circumcincta* (SMITH et al., 2001b). No entanto, os ovinos desafiados com *H. contortus* e imunizados com glicoproteínas da membrana intestinal de *T. circumcincta*, tiveram redução significativa na contagem de OPG, porém não no número de vermes.

2.5. Casos de insucesso

Outras vacinas foram desenvolvidas na busca por outros imunógenos, no entanto estas vacinas não ofereceram proteção contra os parasitas. Esse foi o caso de uma vacina feita a partir do colágeno da cutícula de larvas L3 e L4 de *H. contortus*, que induziu a produção de anticorpos contra o colágeno da cutícula, porém, não conferiu proteção significativa (Boisvenue et al., 1991).

Outro caso de insucesso foi o da vacina contra *O. ostertagi*, feita a partir de frações de *O. ostertagi*, que tinha como principal antígeno uma globina (CLAEREBOUET et al., 2005). Da mesma forma, observou-se ineficácia da vacina de TSBP (Thiol Sepharose-Binding Proteins), contra *H. contortus* (REDMOND & KNOX, 2004).

3. Adjuvantes

Os adjuvantes são utilizados para maximizar a eficácia das vacinas, especialmente daquelas que contém organismos inativados ou purificados, tem sido comum a inclusão de substâncias denominadas adjuvantes ao antígeno. Os adjuvantes podem aumentar bastante a resposta do organismo às vacinas, podendo permitir reduções na quantidade de antígeno injetado. Os adjuvantes podem ser: de depósito, microbianos, estimulantes imunológicos, de distribuição ou mistos (TIZARD, 2009).

O principal adjuvante utilizado com os antígenos apresentados anteriormente é o QuilA que é uma fração da saponina derivada de um extrato aquoso da casca da *Quillaja saponaria*, uma árvore nativa da região dos Andes. O QuilA é forte imunoestimulante, além de induzir grande resposta celular (revisado por RAJPUT et al., 2007).

4. Considerações finais

Visto que a resistência anti-helmíntica é um problema mundial e de grande importância devemos buscar métodos alternativos de controle da verminose nos ruminantes e um dos métodos que vem se destacando pela sua eficácia são as vacinas formuladas com antígenos intestinais ocultos, pois estas têm se mostrado as mais promissoras. Estima-se que se estas vacinas apresentarem eficácia de 80% serão mais eficientes do que os anti-helmínticos convencionais em um programa de profilaxia de verminose de ruminantes (SMITH et al., 2001a).

5. Referências bibliográficas

- AMARANTE, A. F. T.; BAGNOLA Jr., J; AMARANTE, M. R. V.; BARBOSA, M. A. Host specificity of sheep and cattle nematodes in São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.73, p. 89-104, 1997.
- ANDREWS, S. J.; HOLE, N. J. K.; MUNN, E. A.; ROLPH, T. P. Vaccination of sheep against haemonchosis with H11, a gut membrane – derived protective antigen from the adult parasite: Prevention of the periparturient rise and colostral transfer of protective immunity. **International Journal for Parasitology**, v.25, n.7, p.839-846, 1995.
- ANDREWS, S. J.; ROLPH, T. P.; MUNN, E. A.; TAYLOR, M. A. Duration of protective immunity against ovine haemonchosis following vaccination with the nematode gut membrane antigen H11. **Research in Veterinary Science**, v.62, p.223-227, 1997.
- ANZIANI, O. S.; SUAREZ, V.; GUGLIELMONE, A. A.; WARNKE, O.; GRANDE, H.; COLES, G. C. Resistance to benzimidazole and macrocyclic lactone anthelmintics in cattle nematodes in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.122, p.303-306, 2004.
- BOISVENUE, R. J.; STIFF, M. I.; TONKINSON, L. V.; COX, G. N. Protective studies in sheep immunized with cuticular collagen proteins and peptides of *Haemonchus contortus*. **Parasite Immunology**, v.13, p.227-240, 1991.
- BRICARELLO, P. A.; ZAROS, L. G.; COUTINHO, L. L.; ROCHA, R. A.; KOOYMAN, F. N. J.; De VRIES, E.; GONÇALVES, J. R. S.; LIMA, L. G.; PIRES, A. V.; AMARANTE, A. F. T. Field study on nematode resistance in Nelore-breed cattle. **Veterinary Parasitology**, v.148, p.272-278, 2007.

- CACHAT, E.; NEWLANDS, G. F. J.; EKOJA, S. E.; MCALLISTER, H.; SMITH, W. D. Attempts to immunize sheep against *Haemonchus contortus* using a cocktail of recombinant proteases derived from the protective antigen, H-gal-GP. **Parasite Immunology**, v.32, p.414-419, 2010.
- CATTO, J. B.; BARROS, A. T. M.; COSTA, C. A. F. Efeito de tratamentos anti-helmínticos no ganho de peso de bezerros desmamados, criados em pastagens nativas, no pantanal mato-grossense, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.2, n.2, p.127-132, 1993.
- CLAEREBOUT, E.; SMITH, W. D.; PETTIT, D.; GELDHOF, P.; RAES, S.; GEURDEN, T.; VERCRUYSSSE, J. Protection studies with a globin-enriched protein fraction of *Ostertagia ostertagi*. **Veterinary Parasitology**, v.128, p.299-307, 2005.
- COLES, G. C.; STAFFORD, K. A.; MacKAY, P. H. Ivermectin-resistant *Cooperia* species from calves on a farm in Somerset. **Veterinary Record**, v.142, p.255-256, 1998.
- CONDI, G. K.; SOUTELLO, R. G. V.; AMARANTE, A. F. T. Moxidectin-resistant nematodes in cattle in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.161, p.213-217, 2009.
- GASBARRE, L. C.; SMITH, L. L.; HOBERG, E.; PILITT, P. A. Further characterization of a cattle nematode population with demonstrated resistance to current anthelmintics. **Veterinary Parasitology**, v.166, p.275-280, 2009.
- GENNARI, S. M.; VIEIRA BRESSAN, M. C. R.; ROGERO, J. R.; MacLean, J. M.; DUNCAN, J. L. Pathophysiology of *Haemonchus placei* infection in calves. **Veterinary Parasitology**, v.38, p.163-172, 1991.
- JASMER, D. P. & McGUIRE, T. C. Antigens with application toward immune control of blood-feeding parasitic nematodes. **British Veterinary Journal**, v.152, n.3, p.251-268, 1996.

JENSEN, J. R. & VIEIRA-BRESSAN, M. C. R. Protection against high-dose homologous infection in calves immunized with intestine or membrane extracts from *Haemonchus placei*.

Veterinary Parasitology, v.151, p.344-350, 2008.

KABAGAMBE, E. K.; BARRAS, S. R.; LI, Y.; PEÑA, M. T.; SMITH, W. D.; MILLER, J. E.; Attempts to control haemonchosis in grazing ewes by vaccination with gut membrane proteins of the parasite.

Veterinary Parasitology, v.92, p.15-23, 2000.

LeJAMBRE, L. F.; WINDON, R. G.; SMITH, W. D. Vaccination against *Haemonchus contortus*: Performance of native parasite gut membrane glycoproteins in Merino lambs grazing contaminated pasture.

Veterinary Parasitology, v.153, p.302-312, 2008.

LIMA, W. S. Seasonal infection pattern of gastrointestinal nematodes of beef cattle in Minas Gerais States – Brazil.

Veterinary Parasitology, v.74, p.203-214, 1998.

McMANUS, D. P. & LOUKAS, A. Current status of vaccines for schistosomiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.21, n.1, p.225-242, 2008.

MELLO, M. H. A.; DEPNER, R.; MOLENTO, M. B.; FERREIRA, J. J. Resistência lateral às macrolactonas em nematodas de bovinos. **Archives of Veterinary Science**, v.11, n.1, p.8-12, 2006.

MUNN, E. A.; GREENWOOD, C. A.; COADWELL, W. J. Vaccination of young lambs by means of a protein fraction extracted from adult *Haemonchus contortus*. **Parasitology**, v.94, p.385-397, 1987.

MUNN, E. A.; SMITH, T. S.; GRAHAM, M.; TAVERNOR, A. S.; GREENWOOD, C. A. The potential value of integral membrane proteins in the vaccination of lambs against *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v.23, n.2, p.261-269, 1993a.

MUNN, E. A.; SMITH, T. S.; GRAHAM, M.; GREENWOOD, C. A.; TAVERNOR, A. S.; COETZEE, G. Vaccination of Merino lambs against haemonchosis with membrane-associated proteins from the adult parasite. **Parasitology**, v.106, p.63-66, 1993b.

MUNN, E. A.; SMITH, T. S.; SMITH, H.; JAMES, F. M.; SMITH, F. C.; ANDREWS, S. T. Vaccination against *Haemonchus contortus* with denatured forms of the protective antigen H11. **Parasite Immunology**, v. 19, p.243-248, 1997.

NEWTON, S. E.; MORRISH, L. E.; MARTIN, P. J.; MONTAGUE, P. E.; ROLPH, T. P. Protection against multiply drug-resistant and geographically by vaccination with H11, a gut membrane – derived protective antigen. **International Journal for Parasitology**, v.25, n.4, p.511-521, 1995.

NICOLAU, C. V. J.; AMARANTE, A. F. T.; ROCHA, G. P.; GODOY, W. A. C. Relação entre desempenho e infecções por nematódeos gastrintestinais em bovinos Nelore em crescimento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.4, p.351-357, 2002.

PAIVA, F.; SATO, M. O.; ACUÑA, A. H.; JENSEN, J. R.; BRESSAN, M. C. R. V. Resistência a ivermectina constatada em *Haemonchus placei* e *Cooperia punctata* em bovinos. **A Hora Veterinária**, v.120, p.29-34, 2001.

RAJPUT, Z. I.; HU, S.; XIAO, C.; ARIJO, A. G. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. **Journal of Zhejiang University Science B**, v.8, n.3, p.153-161, 2007.

RANGEL, V. B.; LEITE, R. C.; OLIVEIRA, P. R.; SANTOS Jr., E. J. Resistência de *Cooperia spp.* e *Haemonchus spp.* às avermectinas em bovinos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.2, p.186-190, 2005.

REDMOND, D. L. & KNOX, D. P. Protection studies in sheep using affinity-purified and recombinant cysteine proteinases of adult *Haemonchus contortus*. **Vaccine**, v.22, p.4252-4261, 2004.

ROCHA, R. A.; BRESCIANI, K. D. S.; BARROS, T. F. M.; FERNANDES, L. H.; SILVA, M. B.; AMARANTE, A. F. T. Sheep and cattle grazing alternately: Nematode parasitism and pasture decontamination. **Small Ruminant Research**, v.75, p.135-143, 2008.

SANTOS, T. R.; LOPES, W. D. Z.; BUZULINI, C.; BORGES, F. A.; SAKAMOTO, C. A. M.; LIMA, R. C. A.; OLIVEIRA, G. P.; COSTA, A. J. Helminth fauna of bovines from the Central-Western, Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, v.40, n.4, p.934-938, 2010.

SCHALLIG, H. D. F. H.; van LEEUWEN, M. A. W.; HENDRIX, W. M. L. Immune responses of Texel sheep to excretory / secretory products of adult *Haemonchus contortus*. **Parasitology**, v.108, p.351-357, 1994.

SCHALLIG, H. D. F. H. & van LEEUWEN, M. A. W. Protective immunity to the blood-feeding nematode *Haemonchus contortus* induced by vaccination with parasite low molecular weight antigens. **Parasitology**, v.114, p.293-299, 1997.

SCHALLIG, H. D. F. H.; van LEEUWEN, M. A. W.; CORNELISSEN, A. W. C. A. Protective immunity induced by vaccination with two *Haemonchus contortus* excretory / secretory proteins in sheep. **Parasite Immunology**, v.19, p.447-453, 1997.

SIEFKER, C. & RICKARD, L. G. Vaccination of calves with *Haemonchus placei* intestinal homogenate. **Veterinary Parasitology**, v.88, p.249-260, 2000a.

SIEFKER, C. & RICKARD, L. G. *Ostertagia ostertagi* challenge of calves vaccinated with *Haemonchus placei* intestinal homogenate. **Veterinary Parasitology**, v.90, p.103-110, 2000b.

SMITH, S. T.; MUNN, E. A.; GRAHAM, M.; TAVERNOR, A. S.; GREENWOOD, C. A. Purification and evaluation of the integral membrane protein, H11 as a protective antigen against *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v.23, n.2, p.271-280, 1993a.

SMITH, W. D. & SMITH, S. K. Evaluation of aspects of the protection afforded to sheep immunized with a gut membrane protein of *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, v.55, p.1-9, 1993b.

SMITH, W. D. Protection in lambs immunized with *Haemonchus contortus* gut membrane proteins. **Research in Veterinary Science**. V.54, p.94-101, 1993c.

SMITH, W. D.; SMITH, S. K.; MURRAY, J. M. Protection studies with integral membrane fractions of *Haemonchus contortus*. **Parasite Immunology**, v.16, p.231-241, 1994.

SMITH, S. K. & SMITH, W. D. Immunisation of sheep with an integral membrane glycoprotein complex of *Haemonchus contortus* and with its major polypeptide components. **Research in Veterinary Science**, v.60, p.1-6, 1996.

SMITH, W. D. Prospects for vaccines of helminth parasites of grazing ruminants. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.17-24, 1999a.

SMITH, S. K.; PETTIT, D.; NEWLANDS, G. F. J.; REDMOND, D. L.; SKUCE, P. J.; KNOX, D. P.; SMITH, W. D. Further immunization and biochemical studies with a protective antigen complex from the microvillar membrane of the intestinal of *Haemonchus contortus*. **Parasite Immunology**, v. 21, p.187-199, 1999b.

SMITH, W. D.; SMITH, S.K.; PETTIT, D.; NEWLANDS, G. F. J.; SKUCE, P. J. Relative protective properties of three membrane glycoprotein fractions from *Haemonchus contortus*. **Parasite Immunology**, v.22, p.63-71, 2000a.

SMITH, W. D.; SMITH, S. K.; PETTIT, D. Evaluation of immunization with gut membrane glycoproteins of *Ostertagia ostertagi* against homologous challenge in calves and against *Haemonchus contortus* in sheep. **Parasite Immunology**, v.22, p.239-247, 2000b.

SMITH, W. D.; van WYK, J. A.; van STRIJP, M. F. Preliminary observations on the potential of gut membrane proteins of *Haemonchus contortus* as candidate vaccine antigens in sheep on naturally infected pasture. **Veterinary Parasitology**, v.98, p.285-297, 2001a.

SMITH, W. D.; PETTIT, D.; SMITH, S. K. Cross-protection studies with gut membrane glycoprotein antigens from *Haemonchus contortus* and *Teladorsagia circumcincta*. **Parasite Immunology**, v.23, p.203-211, 2001b.

SMITH, W. D.; NEWLANDS, G. F. J.; SMITH, S. K.; PETTIT, D.; SKUCE, P. J. Metalloendopeptidases from the intestinal brush border of *Haemonchus contortus* as protective antigens for sheep. **Parasite Immunology**, v.25, p.313-323, 2003a.

SMITH, W. D.; SKUCE, P. J.; NEWLANDS, G. F. J.; SMITH, S. K.; PETTIT, D. Aspartyl proteases from the intestinal brush border of *Haemonchus contortus* as protective antigens for sheep. **Parasite Immunology**, v.25, p.521-530, 2003b.

SMITH, W. D. & ZARLENGA, D. S. Developments and hurdles in generating vaccines for controlling helminth parasites of grazing ruminants. **Veterinary Parasitology**, v.139, p.347-359, 2006.

SMITH, W. D. Attempts to detect synergy between vaccination and anthelmintic against a drug resistant isolate of *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.148, p.356-359, 2007.

SOUTELLO, R. G. V.; SENO, M. C. Z.; AMARANTE, A. F. T. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.148, p.360-364, 2007.

SOUZA, A. P.; RAMOS, C. I.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; SCHELBAUER, C. A. Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1363-1367, 2008.

TAYLOR, S. M.; Le STANG, J. P.; KENNY, J. Persistent efficacy of doramectin and moxidectin against *Cooperia oncophora* infections in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 96, p.323-328, 2001.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. Terceira edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

TENDLER, M.; PINTO, R. M.; LIMA, A. O.; GEBARA, G.; KATZ, N. *Schistosoma mansoni*: vaccination with adult worm antigens. **International Journal for Parasitology**, v.16, n.4, p.347-352, 1986.

TENDLER, M. & SIMPSON. The biotechnology-value chain: Development of Sm14 as a schistosomiasis vaccine. **Acta Tropica**, v.108, p.263-266, 2008.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. Oitava edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

WAGHORN, T. S.; LEATHWICK, D. M.; RHODES, A. P.; JACKSON, R.; POMROY, W. E.; WEST, D. M.; MOFFAT, J. R. Prevalence of anthelmintic resistance on 62 beef cattle farms in the North Island of New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v.54, n.6, p.278-282, 2006.

WILLADSEN, P.; BIRD, P.; COBON, G. S.; HUNGERFORD, J. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. **Parasitology**, v.110, p.S43-S50, 1995.

WILLIAMS, J. C. & DeROSA, A. Dose confirmation of moxidectin 0.5% pour-on against adults and fourth-stage larvae of various *Cooperia* spp. and *Trichostrongylus colubriformis* in Louisiana. **Veterinary Parasitology**, v.114, p.295-303, 2003.

CAPÍTULO 2¹

¹ Neste capítulo consta o artigo “Protection of calves against *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* after immunization with gut membrane proteins from *H. contortus*” que foi submetido à publicação no periódico Parasite Immunology.

Protection of calves against *Haemonchus placei* and *Haemonchus contortus* after immunization with gut membrane proteins from *H. contortus*

Vaccine against *Haemonchus* in cattle

C.C. BASSETTO¹, B.F. SILVA¹, G.F.J. NEWLANDS², W.D. SMITH², A.F.T. AMARANTE^{1*}

¹UNESP - Universidade Estadual Paulista, Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências, Caixa Postal 510, Botucatu - SP, CEP 18618-000, Brazil.

²Moredun Research Institute, Pentland Science Park, Bush Loan, Penicuik EH26 OPZ Edinburgh, UK.

Disclosures: César Cristiano Bassetto – none; Bruna Fernanda da Silva – none; George F. J. Newlands – none; William David Smith – none and Alessandro Francisco Talamini Amarante – none.

*Correspondence: Alessandro F. T. Amarante, Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, 18618-000, Brazil. Tel.: +55 14 3811 6239; fax: +55 14 3815 3744. *E-mail address*: amarante@ibb.unesp.br

ABSTRACT

A vaccine containing integral membrane glycoproteins from the intestine of *Haemonchus contortus* was evaluated in 4 groups of 9 worm free calves challenged with either 8,000 *H. contortus* or *Haemonchus placei* infective larvae. Vaccinates received 50 µg of the antigen and 1mg QuilA adjuvant three times 21 days apart, while the controls got adjuvant alone. The calves were challenged 7 days after the last immunization and killed for worm counts 43 days later. Immunization resulted in high titre antibodies against the vaccine antigens and significant reduction in egg output and worm numbers of both challenge species, compared to control calves. It was concluded that vaccination of calves with native parasite gut membrane glycoproteins obtained from *H. contortus* conferred protection against both *H. placei* and *H. contortus*.

Keywords: vaccine, cattle, parasitic gastroenteritis, *Haemonchus contortus*, *Haemonchus placei*

1. Introduction

Several genera of nematodes parasitize the gastrointestinal tract of cattle. Of these *Haemonchus* species are among the most important especially for calves grazing in tropical and sub-tropical areas of the world. *Haemonchus placei* or *H. similis* usually predominate but *H. contortus*, normally more prevalent in sheep and goats, can also be found (1, 2, 3, 4).

Control of bovine parasitic gastroenteritis currently relies almost entirely on the use of anthelmintics, but drug resistance is increasingly common (4, 5, 6, 7, 8) including cases in Brazil where *Haemonchus* species were the culprits (9, 10, 11). In addition to the resistance problem, world demand for meat and milk free of chemical residues is increasing, forcing attention on drug-free approaches for worm control.

One potential option is vaccination, an approach which appears quite promising for *H. contortus* in sheep (12, 13). The overall purpose of the present work was to confirm and extend two previous reports where calves were partially protected against challenge with *H. placei* following immunization with homogenates of the parasite intestines (14, 15). The specific aim was to determine whether calves immunized with a gut membrane glycoprotein preparation from *H. contortus* would be protected against challenge with *H. placei* and *H. contortus*.

2. Materials and methods

2.1. Calves

Thirty-six male Holstein calves were raised indoors from birth under conditions designed to exclude accidental infection with nematodes. The calves were fed colostrum just after birth, then milk which was gradually substituted by milk replacer (Purilac[®], Purina), until they were weaned at 60 days of age. They were also fed concentrates (Terneirina[®], Purina), up to 4 kg/day

per animal and had free access to nematode-free hay from a farm without ruminants. The bedding was replaced daily and the concrete floor of the pens was pressure washed three times per week followed by disinfection with sodium hypochlorite solution.

2.2. Infective larvae (L3)

The *H. contortus* L3 had been maintained in mono-specifically infected lambs, since May 2006 (16). This isolate showed multiple anthelmintic resistance (17).

The *H. placei* L3, which had been stored in liquid nitrogen after isolation from cattle in 2004, were thawed and passaged twice through donor calves before use in the trial.

Both *Haemonchus* species had been previously identified based on the morphology of spicules of adult males (2).

All infective larvae were stored in distilled water and were less than 30 days old when used to infect the trial calves.

2.3. Faecal examination and worm counts

Faecal egg counts (FEC) were determined both by a modified McMaster method (EPG-M) in which each egg counted represented 50 eggs per gram of faeces (18) and by the Willis technique (EPG-W), as follows: 4 g of faecal material was mixed with 56 mL of flotation solution (NaCl saturated solution with 1,200 of density) and strained through a tea strainer into a container. The mixture was homogenised using a magnetic stirrer and 10 mL (one sixth) of contents was transferred to other container with a capacity to 16 mL, using a Pasteur pipette. Then, approximately 6 mL of flotation solution were added until there was a reverse meniscus on the top of the container. A coverslip was placed in contact with the meniscus, removed 15 minutes later, placed on a microscope slide and all eggs present were counted under a microscope. With this EPG-W technique 33 times more faecal material was examined compared

to the EPG-M method and the limit of detection was calculated at less than 2 eggs per gram.

Samples containing 20% of the abomasal contents were fixed in 5% formaldehyde. Worms were counted, sexed and classified by their stage of development (18).

2.4. ELISA

Microtitre plates (96 well, Maxisorb, Nunc, USA) were coated with 50 μ L per well of stock antigen diluted 1 μ g/mL with carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6). The plates were covered with Cyclorseal Sealing Film (Platemax) and kept overnight at +3 °C. The plates were then washed three times (ELx405R Microplate Washer – BioTek Instruments), rotated through 180° and re-washed three times with ultra pure water (EASYPure II UV, Barnstead, USA) containing 0.05% Tween 20 (ProPure[®], Amresco) and blocked overnight at +3 °C with phosphate buffered saline, pH 7.2, containing 0.1% w/v Gelatin (Amresco, USA) and 0.05% v/v Tween 20 (PBS-GT) to prevent non-specific protein interactions. After blocking the plates were re-washed six times, as above and were then ready for use.

Serum samples were prepared as follows: A dilution series was prepared for each serum sample by doubling dilution in PBS-GT from 1/200 to 1/204,800. A negative control serum sample was prepared from a pool of pre-immunization sera from the experimental animals by diluting it 1/200 with PBS-GT. For the assay 50 μ L of each serum dilution was added to the prepared ELISA plate and incubated for 1 h at +25 °C. The plates were washed again, and 50 μ L of HRP conjugated anti-Bovine IgG, diluted 1/10,000 in PBS-GT, (Bethyl - cat. n° A10-118P) was added to each well. After 1h incubation at +25 °C plates were again washed as above and 50 μ L of 1,2-phenylenediamine dihydrochloride substrate solution (OPD, Dako, Denmark) was added to each well and incubated in the dark at room temperature. After 15 minutes, 50 μ L Stop Solution (5%

v/v sulphuric acid) was added and the plates were read immediately using an automated ELISA reader (Biotrak II, Amersham-Biosciences, UK) at 492 nm.

Serum antibody titres were calculated by an end-point titration, where the end-point was the absorbance value at 492 nm (A₄₉₂) of the pre-immunization serum pool at a dilution of 1/200. For each serum sample the A₄₉₂ value for each point in the dilution series 1/200 to 1/204,800 was plotted against the inverse of the dilution factor. A logarithmic trend line was fitted to the data, equation; $y = c \cdot \ln(x) - b$ where y = natural log antibody titre and x = A₄₉₂. The equation generated for each sample dilution series was used to determine the dilution factor for that individual serum sample required to give the end-point value (the A₄₉₂ of the pre-immunization serum pool at a dilution of 1/200).

2.5. Preparation, Formulation and Administration of the Vaccine

The vaccine antigen was prepared from gut membranes of adult *Haemonchus contortus* as described before (19). Each dose of vaccine contained 50 µg of the antigen and 1 mg of QuilA in 2 mL of PBS. The vaccine was administered intramuscularly in the neck and given 3 times, 3 weeks apart.

2.6. Design of the Experiment

A 2×2 factorial design was used where the treatments were vaccinated or control and *H. contortus* or *H. placei* as the challenge species.

The calves were randomly allocated to 4 groups of 9, balanced as far as possible for weight and treated as follows: Group 1 Control – *H. contortus*; Group 2 Vaccinated – *H. contortus*; Group 3 Control – *H. placei* and Group 4 Vaccinated – *H. placei*. One calf in Group 4 (Vaccinated – *H. placei*) died from causes unrelated to the design of the trial and so the number

in this group was reduced to 8.

The first vaccination was given when the calves were four months old. Seven days after the third vaccination all calves were challenged with 8,000 infective larvae (L3) of the appropriate *Haemonchus* species. Faecal egg counts were made twice a week from 28 days after challenge and the calves were killed for worm counts 43 days after challenge.

The experiment reported was approved and conducted in accordance with the experimental protocol approved by the local Ethical Committee.

2.7 Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the general linear models procedure of SAS release 9.2. FEC and worm burden data were log transformed ($\log_{10}(x+1)$). In the case of FEC, the repeated measures analysis of variance was employed in data analysis. Significant differences between group means were determined by the Student's *t*-test at 5%. Means are reported in results as arithmetic means \pm the standard error of the mean (SE) of the untransformed data.

3. Results

Group mean serum antibody titres are illustrated in Figure 1. Titres close to zero were detected in all calves at the start of the trial and remained low in both control groups throughout.

The vaccinated calves first showed an obvious rise in titre 7 days after the second dose of vaccine (V2). A second increase in titre occurred after the third dose (V3) so that peak levels were attained at about the time of challenge. Thereafter values started to decline, but remained well above background until the end of the trial.

The differences on dynamics of egg output resulted in significant interaction between day x species x immunization ($P < 0.05$). Considering only the *H. contortus* groups, there was

significant difference ($P < 0.05$) between vaccinated group and control group at 28, 31, 35 and 38 days post infection with 99% reduction in cumulative EPG – W. In *H. placei* groups, there was significant reduction ($P < 0.05$) in mean FEC of the vaccinated group on days 31, 35, 38 and 42 post infection in comparison with the control group with 97% of reduction in cumulative EPG – W (Figure 4).

Vaccination significantly reduced ($P < 0.05$) the adult worm burdens of both *Haemonchus* species (Figure 3), but did not affect their sex ratio, nor the numbers of immature worms.

In the control calves there appeared to be differences between the *Haemonchus* species in terms of the kinetics of their egg outputs (Figure 2). With *H. contortus* egg output was bigger at the beginning of trial and subsequently declined, whereas with *H. placei* eggs were slower to appear but output was maintained for longer. Control calves contained approximately three times as many adult *H. placei* than *H. contortus*, but more juvenile worms were recovered from those infected with *H. contortus* (Figure 3).

4. Discussion

This trial clearly showed that vaccination of calves with intestinal membrane glycoproteins, from *H. contortus* conferred substantial protection against *H. contortus* and *H. placei*, both in terms of reduced egg output and adult worm numbers. This result confirmed extensive trials in sheep which have shown that vaccines made from various *H. contortus* gut membrane preparations were highly protective (12, 13). Obviously it would be attractive if a vaccine designed to work against ovine haemonchosis was also protective for cattle.

The protection data also endorsed similar effects reported in a previous vaccine trial with *H. placei* in cattle. Immunization with a homogenate of *H. placei* intestines substantially reduced

the egg output of calves following challenge with 3,300 larvae of the same species (14). However, when Jensen and others attempted to repeat this with calves hyper immunized with either a detergent extract of whole *H. placei* or of its intestines, formulated with Freund's adjuvant, only about a 50% reduction in the final egg count was recorded (15). Possibly this was because they used a much larger challenge (120,000 L3) or possibly it was because their group size was too small to cope with the individual variation they observed.

Although produced from antigens obtained from *H. contortus*, the vaccine conferred protection against *H. placei*. The simplest conclusion from this result is that the intestinal cell glycoproteins of both species are similar, but other explanations are also possible. It was unfortunate that insufficient *H. placei* parasites could be recovered to confirm this either by gel profile or immunoblotting. This cross-protection result was not particularly surprising since gut membrane glycoproteins of *Ostertagia ostertagi* also cross protect efficiently against *H. contortus* (19).

The egg and worm counts of the control calves suggested that *H. placei* was a more efficient cattle parasite than *H. contortus*. Thus, more immature *H. contortus* than *H. placei* were recovered, indicating delayed development of the former. Similarly, the egg count profile and final adult worm counts of *H. contortus* suggest it did not persist as efficiently. This agrees with previous studies with naturally infected livestock where *H. contortus* showed marked preference for small ruminants, while *H. placei* and/or *H. similis* were better adapted to cattle (1, 2, 20, 21, 22). However it is worth mentioning that *H. contortus* is also considered an important parasite in cattle in United States (4).

In conclusion, vaccination of calves with native parasite gut membrane glycoproteins obtained from *H. contortus* conferred protection against both *H. placei* and *H. contortus*.

References

- 1 Amarante AFT, Bagnola Jr.J, Amarante MRV & Barbosa MA. Host specificity of sheep and cattle nematodes in São Paulo state, Brazil. *Vet Parasitol* 1997; **73**: 89-104.
- 2 Achi YL, Zinsstag J, Yao K, *et al.* Host specificity of *Haemonchus* spp. for domestic ruminants in the savanna in northern Ivory Coast. *Vet Parasitol* 2003; **116**: 151–158.
- 3 Condi GK, Soutello RGV & Amarante AFT. Moxidectin-resistant nematodes in cattle in Brazil. *Vet Parasitol* 2009; **161**: 213-217.
- 4 Gasbarre LC, Smith LL, Hoberg E & Pilitt PA. Further characterization of a cattle nematode population with demonstrated resistance to current anthelmintics. *Vet Parasitol* 2009; **166**: 275-280.
- 5 Coles GC, Stafford KA & MacKay PHS. Ivermectin-resistant *Cooperia* species from calves on a farm in Somerset. *Vet Rec* 1998; **142**: 255-256.
- 6 Anziani OS, Suarez V, Guglielmone AA, *et al.* Resistance to benzimidazole and macrocyclic lactone anthelmintics in cattle nematodes in Argentina. *Vet Parasitol* 2004; **122**: 303-306.
- 7 Taylor SM, Le Stang JP & Kenny J. Persistent efficacy of doramectin and moxidectin against *Cooperia oncophora* infections in cattle. *Vet Parasitol* 2001; **96**: 323-328.
- 8 Waghorn TS, Leathwick DM, Rhodes AP, *et al.* Prevalence of anthelmintic resistance on 62 beef cattle farms in the North Island of New Zealand. *N Z Vet J* 2006; **54**: 278–282.
- 9 Rangel VB, Leite RC, Oliveira PR & Santos Jr. EJ. Resistência de *Cooperia* spp. e *Haemonchus* spp. às avermectinas em bovinos de corte. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2005; **57**: 186-190.
- 10 Soutello RGV, Seno MCZ & Amarante AFT. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol* 2007; **148**: 360-364.

- 11 Souza AP, Ramos CI, Bellato V, Sartor AA & Schelbauer CA. Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto Catarinense. *Cienc Rural* 2008; **38**: 1363-1367.
- 12 Smith WD, van Wyk JA & van Strijp MF. Preliminary observations on the potential of gut membrane proteins of *Haemonchus contortus* as candidate vaccine antigens in sheep on naturally infected pasture. *Vet Parasitol* 2001; **98**: 285-297.
- 13 LeJambre LF, Windon RG & Smith WD. Vaccination against *Haemonchus contortus*: Performance of native parasite gut membrane glycoproteins in Merino lambs grazing contaminated pasture. *Vet Parasitol* 2008; **153**: 302-312.
- 14 Siefker C & Rickard LG. Vaccination of calves with *Haemonchus placei* intestinal homogenate. *Vet Parasitol* 2000; **88**: 249-260.
- 15 Jensen JR & Vieira-Bressan MCR. Protection against high-dose homologous infection in calves immunized with intestine or membrane extracts from *Haemonchus placei*. *Vet Parasitol* 2008; **151**: 344-350.
- 16 Silva BF, Amarante MRV, Kadri SM, Carrijo-Mauad JR & Amarante AFT. Vertical migration of *Haemonchus contortus* third stage larvae on *Brachiaria decumbens* grass. *Vet Parasitol* 2008; **158**, 85-92.
- 17 Almeida FA, Garcia KCOD, Torgerson PR & Amarante AFT. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. *Parasitol Int* 2010; **59**: 622-625.
- 18 Ueno H & Gonçalves PC. *Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes*, ed. Four, Tokyo: Japan International Cooperation Agency; 1998; 143.

- 19 Smith WD, Smith SK & Pettit D. Evaluation of immunization with gut membrane glycoproteins of *Ostertagia ostertagi* against homologous challenge in calves and against *Haemonchus contortus* in sheep. *Parasite Immunol* 2000; **22**: 239-247.
- 20 Rocha RA, Bresciani KDS, Barros TFM, *et al.* Sheep and cattle grazing alternately: Nematode parasitism and pasture decontamination. *Small Rumin Res* 2008; **75**: 135-143.
- 21 Giudici CJ, Cabaret J & Durette-Desset MC. Changes in gastro-intestinal helminth species diversity in lambs under mixed grazing on irrigated pastures in the tropics (French West Indies). *Vet Res* 1999; **30**: 573-581.
- 22 Roberts FHS & Bremmer KC. The susceptibility of cattle to natural infestations of the nematode *Haemonchus contortus* (Rudolphi) Cobb 1898. *Aust Vet J* 1955; **31**: 133-134.

Acknowledgements

The authors would like to thank the technical assistance of Camila O. Carvalho and Jorge K. Xavier. This study was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil (FAPESP). César C. Bassetto received financial support from FAPESP and Alessandro F. T. Amarante from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil).

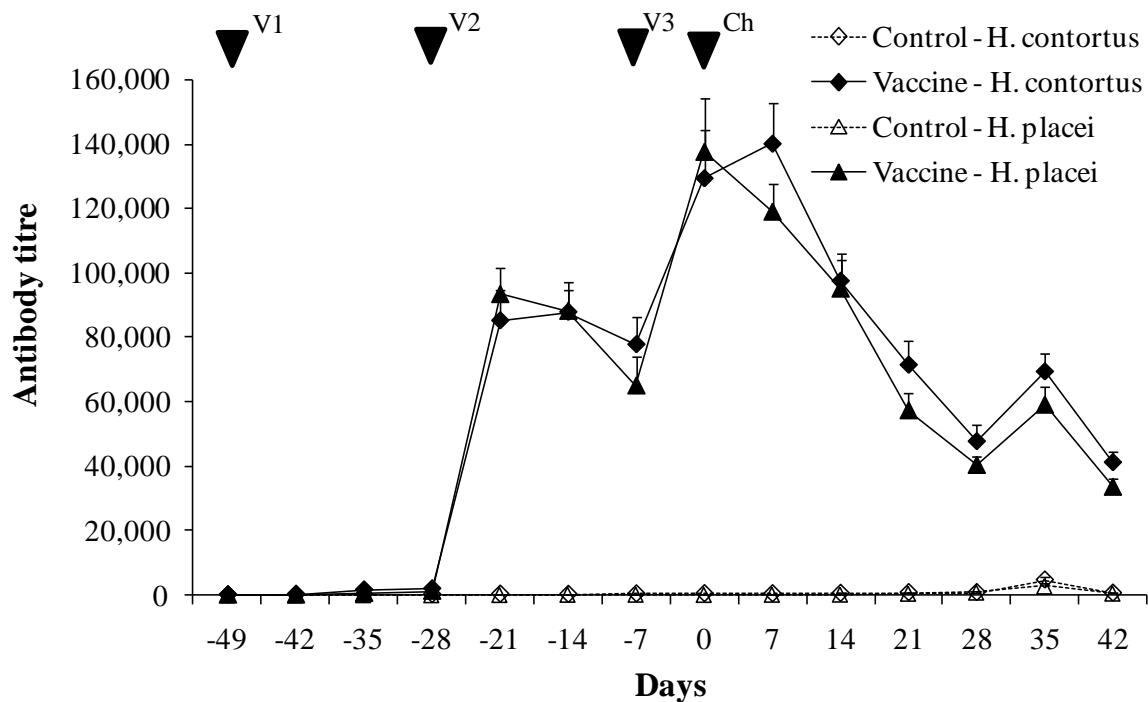


Figure 1 Mean serum antibody titre of calves after immunization (V) with gut membrane antigens of *Haemonchus contortus*. Control animals received only the vaccine adjuvant. Animals were challenged (Ch) with *H. contortus* or *Haemonchus placei* seven days after the last vaccination. Bars represent standard error of the mean.

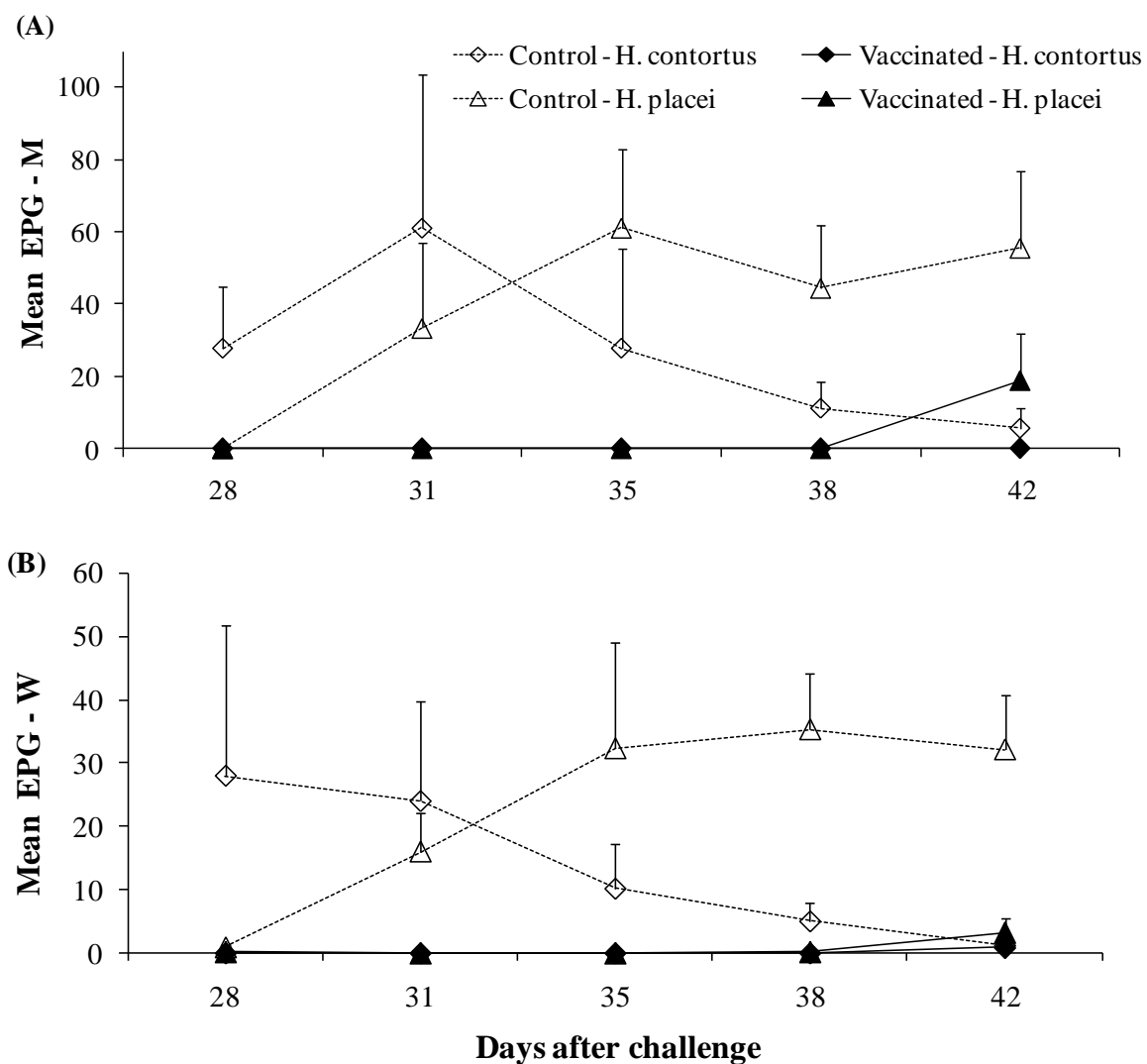


Figure 2 Group mean eggs per gram of faeces (EPG) by McMaster (A) and Willis (B) techniques in calves challenged with *Haemonchus contortus* or *Haemonchus placei* after immunization with gut membrane antigens of *H. contortus*. Control animals received only the vaccine adjuvant. Bars represent standard error of the mean.

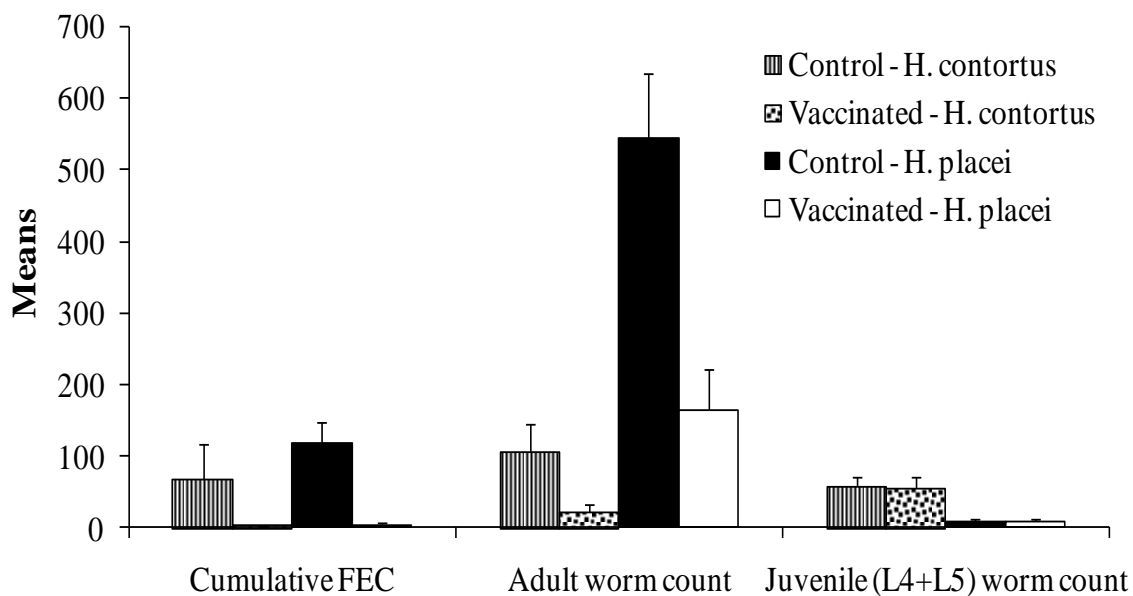


Figure 3 Mean cumulative faecal egg counts (FEC - Willis technique) and worm burdens of calves challenged with *Haemonchus contortus* or *Haemonchus placei* after immunization with gut membrane antigens of *H. contortus*. Control animals received only the vaccine adjuvant. Bars represent standard error of the mean.