

ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE DUAS VACINAS INATIVADAS, ACRESCIDAS DE DIFERENTES ADJUVANTES, CONTRA O *ALPHAHERPESVIRUS BOVINO 1*

MARIANA HERNANDEZ LIBOS¹; NADÁLIN YANDRA BOTTON²; MATHEUS IURI FRÜHAUF²; LARIANE DA SILVA BARCELOS²; GEFERSON FISCHER³

¹Universidade Federal de Pelotas – marianahl_@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – nadalinyb@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – matheus.fruhauf@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas – larianebarcelos@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – geferson.fischer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O *Alphaherpesvirus bovino 1* (BoHV-1) possui genoma DNA de fita dupla, é envelopado, e pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus* (ICTV, 2021). É o agente etiológico da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), da Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IPV), da Balanopostite Pustular Infecciosa (IPB), além de causar infertilidade, abortos e infecção multissistêmica fatal de neonatos (KAHRS, 2001). A latência induzida pelo vírus dificulta o diagnóstico e representa um fator de manutenção do vírus nos rebanhos (ARRUDA et al., 2019).

A vacinação é um método de controle amplamente utilizado com objetivo de prevenir a manifestação de sinais clínicos de doença (SILVA et al., 2007). Dentre as vacinas mais utilizadas estão as inativadas, que normalmente, necessitam de associação com adjuvantes, que potencializam a resposta do sistema imune (FLORES, 2017). Dentre as categorias de adjuvantes, na Medicina Veterinária, os mais utilizados são o hidróxido de alumínio, emulsões oleosas e *ISCOM's* (SIVAKUMAR et al., 2011).

A infecção causada pelo BoHV-1 gera prejuízos econômicos significativos para a pecuária, e considerando a importância do BoHV-1 para bovinos, cujas perdas podem ser reduzidas pela vacinação, este trabalho buscou realizar uma análise comparativa entre duas vacinas inativadas, acrescidas com diferentes adjuvantes, baseado na investigação da resposta sorológica através do teste de soroneutralização.

2. METODOLOGIA

2.1 Instalações

Os ensaios *in vitro* e análises laboratoriais deste estudo foram conduzidos junto ao Laboratório de Virologia e Imunologia Veterinária (LabVir), da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Os ensaios *in vivo* de aplicação vacinal e coleta de material biológico, foram realizados junto a Agropecuária Yviporã, no município de Pedro Osório – RS.

2.2 Células e Vírus

A cepa V.V. de BoHV-1 foi amplificada e titulada em células da linhagem *Madin Darby Bovine Kidney* (MDBK), mantidas em meio essencial mínimo (MEM) Gibco®, acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) Gibco®, 200 U.I./mL de estreptomicina e penicilina (Sigma-Aldrich®), 5 µg/mL de enrofloxacin (Baytril®, Bayer) e 2,5 µg/mL de anfotericina B (Fungizone®, Cristália). O título viral utilizado foi de 10^{6,50} DICC₅₀/ml para as infecções celulares.

2.3 Adjuvantes vacinais e preparo das vacinas

A suspensão viral foi inativada pela adição de 1% de bromoetilamina (BEI) (pH 7,8) sob agitação lenta (50 rotações por minuto – RPM) e constante, à temperatura de 22°C por 12 horas (SILVA et al., 2004).

Os adjuvantes de eleição para a utilização nas vacinas experimentais foram o Hidróxido de Alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) 4,3% (Teor de Óxido de Alumínio – Al_2O_3 – 2,3%) e o óleo mineral Montanide™ ISA 50 V2. Os adjuvantes vacinais foram incorporados à suspensão viral inativada através de agitação constante e, após o preparo, as vacinas foram armazenadas em temperatura de 4 – 8°C até o momento do uso. Para o grupo controle negativo, utilizou-se uma solução salina tamponada (PBS), inoculada também, por via intramuscular.

2.4 Ensaio *in vivo*

Para avaliação da eficiência vacinal, 60 bovinos da raça Braford, com idades entre 12 e 20 meses, sorologicamente negativos para BoHV-1, BoHV-5 e BVDV (Vírus da Diarreia Viral Bovina) pela técnica de soroneutralização, foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais e inoculados, em 3 aplicações, por via intramuscular. Os grupos experimentais estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1. Grupos experimentais

Grupo	Especificação	Número de animais
Grupo 1	Antígeno BoHV-1 + Montanide™	20 animais
Grupo 2	Antígeno BoHV-1 + $\text{Al}(\text{OH})_3$	20 animais
Grupo 3	PBS	20 animais

2.5 Coleta de material biológico e Soroneutralização

A coleta de material biológico dos bovinos foi realizada nos dias 0 e 42 após a primeira inoculação. Amostras de sangue foram coletadas em tubos Firstlab® com ativador de coágulo para a avaliação da resposta imune humoral conferida pela vacina, com mensuração de títulos de anticorpos neutralizantes, através da técnica de soroneutralização (FISCHER et al., 2007).

Após sofrerem diluição seriada de 1:2 a 1:256, os soros foram distribuídos (volume de 25 µL) em microplacas de poliestireno (Kasvi®) para posterior adição de 100 TCID₅₀ do vírus BoHV-1 (volume de 25µL) e incubação de uma hora, a temperatura de 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂. As células da linhagem MDBK foram então adicionadas (3×10^4 células por cavidade, no volume de 50 µL), e as microplacas foram incubadas, sob as condições já citadas, durante 48 a 72 horas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Brasil, não existe uma regulamentação específica definindo o nível de imunidade exigido para que vacinas inativadas ou vivas contra o BoHV-1. No entanto, considerando referências de outros países, vacinas contra o BoHV-1 deveriam induzir títulos neutralizantes ≥ 8 em pelo menos 80% dos animais (ANZILIERO et al., 2015). Na análise comparativa na qual este estudo foi realizado, observa-se, na Figura 1, que dos diferentes adjuvantes vacinais utilizados, tanto o Hidróxido de Alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) quanto o óleo mineral (Montanide™ ISA 50 V2), induziram resposta em mais de 80% dos animais vacinados com títulos médios de anticorpos neutralizantes de 16 e 64 respectivamente, o que estaria dentro do mínimo exigido para proteger os indivíduos e o rebanho. Comparativamente, o adjuvante oleoso induziu maior soroconversão em relação ao hidróxido de alumínio.

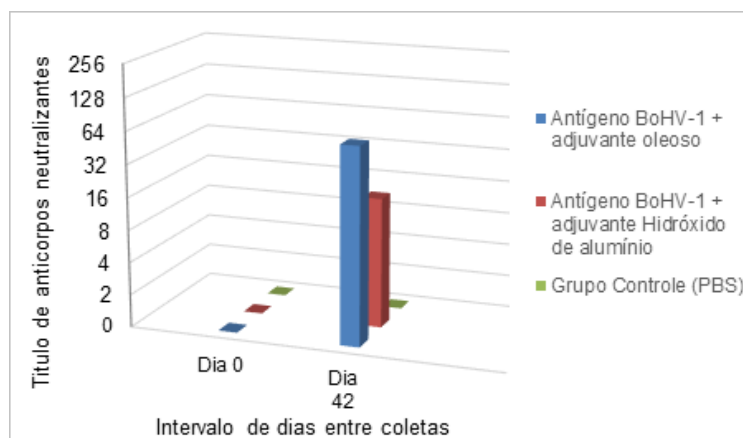


Figura 1 - Títulos médios de anticorpos neutralizantes induzidos por vacinas inativadas com *Alphaherpesvirus bovino tipo 1* (BoHV-1) no dia 0 e no dia 42 após inoculação.

A busca por novas formulações vacinais tem sido constante, e nos últimos anos vários adjuvantes combinados tem sido utilizados (GARG et al., 2017). Apesar do uso generalizado de sais inorgânicos como adjuvantes, principalmente o Hidróxido de Alumínio, não há ainda total entendimento sobre seu mecanismo de ação, mas este, estimula a imunidade inata e adquirida por mecanismos que incluem o efeito pró-fagocítico, a ativação da via pró-inflamatória NLRP3 e a ativação da cascata do sistema complemento, além de proporcionar aumento de estabilidade ao antígeno vacinal adsorvido (DIAS, 2016). Já o mecanismo de ação de adjuvantes oleosos inclui a formação de depósitos no local da injeção, permitindo a liberação lenta de antígeno e estimulação de anticorpos (DOTTO et al., 2020), como observado nos resultados obtidos do título de anticorpos neutralizantes do presente trabalho. Além disso, é possível encontrar o Montanide® como emulsão do tipo água em óleo, que induz uma resposta imune protetora de longo prazo, estimulando a resposta imune humoral e mediada por células (BURAKOVA et al., 2018). Ao avaliar vacinas inativadas contra o BoHV-1 com adjuvante oleoso, HALFEN et al. (2000) demonstraram que elas costumam induzir altos títulos de anticorpos neutralizantes.

3. CONCLUSÕES

Os animais inoculados com as vacinas inativadas contendo a cepa V.V. de BoHV-1 e os dois diferentes adjuvantes obtiveram soroconversão satisfatória, com ambos os adjuvantes, suficiente para uma imunização adequada dos rebanhos. No entanto comparativamente, o adjuvante oleoso obteve maior soroconversão em relação ao hidróxido de alumínio.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRUDA, E. F. et al. Soroprevalence of bovine alphaherpesvirus type 1 (BoHV-1) and risk factors associated with dairy properties of the municipality of Senador Guiomard, Acre, Brazil. **Scientific Article, Animal Patology**. Arq. Inst. Biol., v.86, 1-6, e1362018, 2019.

BEDIN, A., et al. Serological prevalence of bovine viral diarrhoea (BVD-1) in non-vaccinated dairy cattle in the municipality of Realeza-Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, 2020, 41.3 p. 907-914.

BURAKOVA, Y., et al. Adjuvants for Animal Vaccines. **Viral Immunol.**, v.31, n.1, p.11-22. 2018.

DIAS, P. C. G. **Avaliação da resposta imune induzida por diferentes adjuvantes e sua aplicação no desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra leptospirose.** 2016. Dissertação de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

DOTTO, E. K. et al. **Indução de anticorpos neutralizantes contra herpesvírus bovino e vírus da diarreia viral bovina por vacinas comerciais e vacina experimental associada com diferentes adjuvantes.** 2020. Dissertação de Mestrado. 2020. Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária.

FISCHER, G. et al. Imunomodulação produzida por extrato de própolis verde nas respostas humoral e celular de camundongos imunizados com SuHV-1. **Vaccine**, v. 25, n. 7, p. 1250-1256, 2007.

FLORES, E.F. et al. **Virologia Veterinária.** 3ª Ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2017. Cap.12, p. 327-330.

GARG R., BABIUK L., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S., GERDTS V., 2017. A novel combination adjuvant platform for human and animal vaccines. **Vaccine** 35 (35): 4486-4489.

KAHRS, R.F. Infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis. In: Kahrs RF (Ed.). **Viral Diseases of Cattle.** 2.ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 2001. p.159-170.

HALFEN, D. et al., Imunogenicidade do herpesvirus bovino tipo 5 (BHV-5) em vacinas inativadas de diferentes formulações. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.5, p.851-856, 2000.

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses. 2021. Acessado em 11 agosto 2022. Online. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/>

SILVA, L.C da et al. Avaliação da capacidade adjuvante do cloreto de dimetildiocetadecilamônio associado ao hidróxido de alumínio na indução da resposta imune humoral de bovinos vacinados com o vírus da diarreia viral bovina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 3, p. 201-206, 2004.

SILVA, L. F.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Imunogenicidade de vacinas comerciais inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1471-1474, 2007.

SIVAKUMAR, S.M.; SAFHI, M.M.; KANNADASSAN, M.; SUKUMARAN, N. Vaccine adjuvants – Current status and prospects on controlled release adjuvancy. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 19, n.4, p. 197-206, 2011.