

**DESENVOLVIMENTO E IMUNOGENICIDADE DE UMA VACINA INATIVADA  
DE APLICAÇÃO INTRAVAGINAL CONTRA O ALPHAHERPESVIRUS BOVINO  
TIPO 1 EM ASSOCIAÇÃO COM O ESPORO INATIVADO DO *Bacillus  
toyonensis***

**CRISTINA MENDES PETER<sup>1</sup>, MATHEUS IURI FRUHAUF<sup>2</sup>; NADÁLIN YANDRA  
BOTTON<sup>2</sup>, LARIANE DA SILVA BARCELOS<sup>2</sup>, RODRIGO BOSEMBECKER<sup>2</sup>;  
GEFERSON FISCHER<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – cristina\_peter@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – matheus.fruhauf@outlook.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – geferson.fischer@gmail.com

## **1. INTRODUÇÃO**

O sistema imune de mucosas representa a barreira inicial frente à infecção por diversos patógenos que utilizam estas superfícies como porta de entrada no organismo hospedeiro, como é o caso do alphaherpesvirus bovino do tipo 1 (BoHV-1) (PETRINI et al., 2019). Este vírus infecta os sistemas respiratório e reprodutivo de bovinos, sendo responsável por casos de rinotraqueíte infecciosa bovina e vulvovaginite, usando como porta de entrada as cavidades revestidas por células epiteliais de mucosa, principalmente nasal e genital (FERREIRA et al., 2018). Este é o seu ponto inicial de replicação, seguindo-se a disseminação local, viremia sistêmica e disseminação neuronal (ROELS et al., 2000). Mecanismos inatos de defesa, em cooperação direta com mecanismos adaptativos, conferem proteção ao sistema integrado de mucosas e, devido à grande importância destas vias na transmissão do BoHV, torna-se relevante o desenvolvimento de vacinas que propiciem imunidade de mucosa contra estes agentes etiológicos (OLIVEIRA et al., 2011).

O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de uma plataforma farmacêutica para liberação sustentada de uma vacina inativada de mucosa frente ao BoHV-1, bem como aferir a capacidade imunomoduladora do *Bacillus toyonensis* (bactéria gram-positiva, formadora de esporos, utilizada como adjuvante vacinal e probiótico) quando utilizado como adjuvante em vacinas inativadas contra o BoHV-1.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1 Instalações**

As atividades laboratoriais (ensaios *in vitro* e análises), deste estudo foram realizadas junto ao Laboratório de Virologia e Imunologia e a produção do adjuvante foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Centro de Biotecnologia (CDTEC – UFPEL). Os ensaios *in vivo* de aplicação da vacina foram realizados junto a Fazenda Agropecuária Yvyaporã, localizada no município de Pedro Osório.

### **2.2. Preparo das formulações vacinais**

As formulações dos derivados de celulose 2-Hidroxietilcelulose e metilcelulose, (Sigma-Aldrich®) foram preparadas de acordo com o “método à frio”. Foram testadas diferentes formulações e posteriormente, foram avaliadas para utilização *in vivo*.

### **2.3. Preparações das vacinas experimentais**

Uma cepa de BoHV-1 (cepa V.V. – procedente de um animal com vulvovaginite) foi amplificada e titulada em células Madin Darby Bovine Kidney – MDBK e foi utilizado um título viral de  $10^7$  DICC<sub>50</sub>/mL, tanto para as infecções celulares, como para purificação, visando análises moleculares.

#### 2.4. Produção do Adjuvante Imunoestimulante *Bacillus toyonensis*

Em resumo, para preparação do pré-inóculo de *B. toyonensis* a partir de cepa cultivada, utilizou-se cerca de 3 colônias em meio BHI (Brain Heart Infusion broth) durante 24 horas em Shaker a 37°C. Após incubação, preparou-se o inóculo, para obtenção de esporos, em meio BHI acrescido de Meio F, por aproximadamente 10 dias (TAVARES et al., 2013). Após o término de incubação, realizou-se a Coloração de Verde Malaquita, para avaliação dos esporos e posteriormente, realizou-se a contagem das Unidades Formaforas de Colônias (UFC)/mL. Após contagem, fez-se a inativação do cultivo através de banho maria a 100°C durante 12 horas. Ao término da inativação, realizou-se a purificação do inóculo de acordo com metodologia descrita (TAVARES et al., 2013).

#### 2.5. Inoculação dos bovinos

Para verificação da eficácia da vacina, 72 fêmeas bovinas, da raça Braford, com 15 meses de idade, mantidas em pastagem de azevém e aveia, sorologicamente negativas para BoHV-1 e ao vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) foram categorizadas de forma aleatória utilizando o peso de cada animal. Dessa forma, os bovinos foram divididos em nove grupos de 8 animais e inoculados por via intravaginal e via parenteral. Os animais foram divididos nos grupos vacinais conforme Tabela 1.

**TABELA 1. GRUPOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA VACINA EM BOVINOS.**

Tratamentos	Componente vacinal	Nº de animais
Grupo 1	Controle negativo (PBS)	8
Grupo 2	BoHV-1 + PBS + gelatina farmacêutica	8
Grupo 3	Controle positivo (Vacina Comercial)	8
Grupo 4	Polímero Metilcelulose + BoHV-1	8
Grupo 5	Polímero Metilcelulose + BoHV-1 + <i>Bacillus toyonensis</i>	8
Grupo 6	Polímero Metilcelulose + <i>Bacillus toyonensis</i>	8
Grupo 7	Polímero 2- hidroxietilcelulose + BoHV-1	8
Grupo 8	Polímero 2- hidroxietilcelulose + BoHV-1 + <i>Bacillus toyonensis</i>	8
Grupo 9	Polímero 2 hidroxietilcelulose + <i>Bacillus toyonensis</i>	8

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEAA) – 4918.

#### 2.6. Avaliação da eficácia vacinal

A coleta de material foi realizada nos dias 0, 30, 60 e 90 após a primeira vacinação. Foram coletadas amostras de sangue e secreção vaginal para avaliação da resposta imune conferida pela vacina. Amostras de secreção vaginal foram coletadas através do coletor Metrichoch® (MSD Animal). O muco foi extraído utilizando-se metodologia descrita (TOCHIKUBO et al., 1998). A titulação dos níveis sanguíneos de anticorpos totais, conferidos pelas vacinas experimentais, foi realizada através do ELISA indireto a fim de detectar-se anticorpos IgA e IgG contra BoHV-1 e também através da Técnica de Soroneutralização.

## 2.7. Análise Estatística

O teste LSD (ELISA) foi utilizado para determinar diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre as médias dos tratamentos. Todos os dados foram expressos pela média  $\pm$  desvio padrão médio, o software utilizado foi o Statistix 9.0®.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os títulos de anticorpos neutralizantes contra o BoHV-1, através da técnica de soroneutralização, somente foram detectados no grupo dos animais vacinados com a vacina comercial. No entanto, os tratamentos da vacina experimental, tanto amostras de soro e muco vaginal, foram negativas.

Os níveis de IgA e IgG induzidos pelas vacinas experimentais foram mensurados através de um ELISA indireto, a partir de soro e muco vaginal. Como pode ser observado na Figura 1, a inoculação intravaginal estimulou a produção tanto de IgG como IgA no soro sanguíneo. Níveis estatisticamente superiores ( $p < 0,05$ ) de IgG e IgA foram observados aos 90 dias após a primeira inoculação nos tratamentos em que o antígeno foi associado ao adjuvante *B. toyonensis* (G5 e G8) em relação aos grupos controle e ao Grupo 3 (G3- Vacina Comercial).

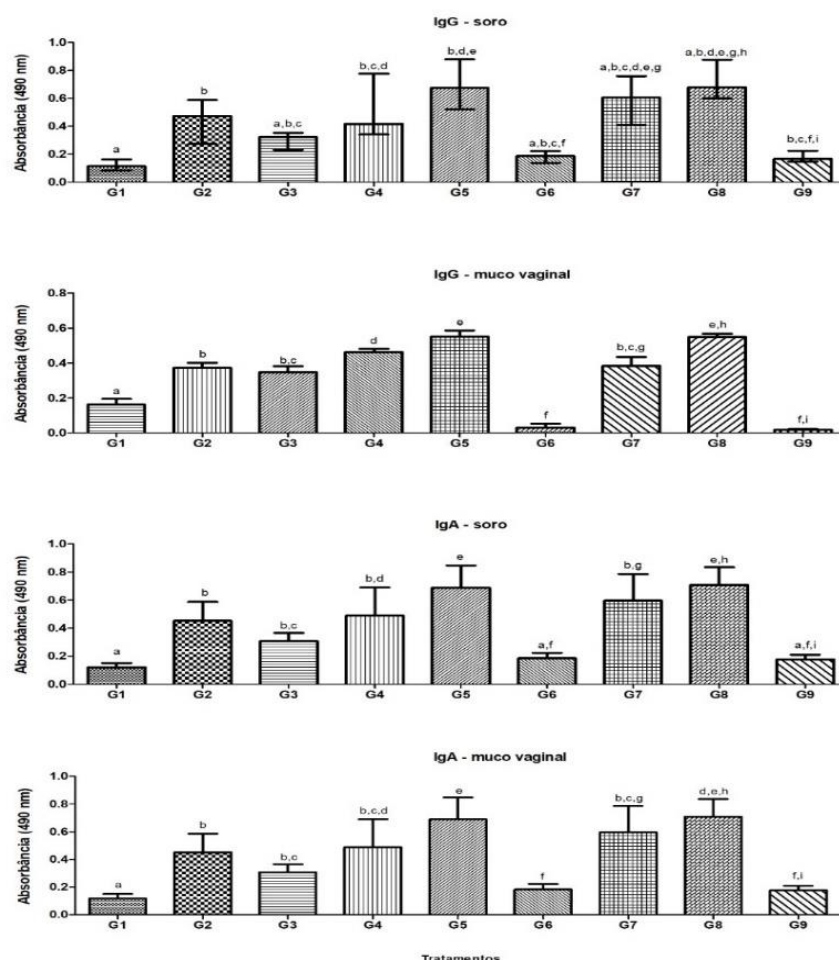


FIGURA 1- NÍVEIS SISTÊMICOS E MUCO VAGINAL DE IGG E IGA MENSURADOS POR ELISA INDIRETO DOS ANIMAIS DO EXPERIMENTO.

Na mucosa vaginal, após 90 dias da primeira vacinação, os animais dos grupos tratamento (G5 e G8) foram significativamente superiores na mensuração

de IgA ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais tratamentos. Os níveis séricos de IgG, mensurados por ELISA indireto nos Grupos 5 e Grupo 8 também foram superiores aos 90 dias após a primeira inoculação por via intravaginal em relação aos controles ( $p < 0,001$ ). Ainda também, os Grupos da vacina intravaginal apresentaram valores superiores ao Grupo 3 (G3 – Vacina Comercial), ( $p < 0,001$ ).

Mulira e Saunders (1994) avaliaram a imunogenicidade de uma vacina frente ao *Ureaplasma diversum* através das vias subcutânea (SC) e intravaginal. Obtiveram como resultados, após duas vacinações, altas concentrações de IgA e IgG na mucosa e níveis séricos, enquanto via SC obtiveram altos níveis IgG no soro apenas, sem reatividade de IgA e nenhuma resposta a nível de sistema de mucosa.

Em nosso estudo, os animais dos grupos que receberam a vacina intravaginal (G5 e G8) associada ao *Bacillus toyonensis* desenvolveram títulos de IgA na mucosa vaginal significativamente superiores aos animais dos grupos tratamento. Sabe-se que a resposta imune de mucosa é induzida de maneira mais eficiente quando a inoculação ocorre nas próprias mucosas, enquanto vias sistêmicas geralmente induzem uma fraca resposta imune nestas superfícies (ZAJAC et al., 2016). Azizi et al. (2010) reforçam esta hipótese, pois, ao inocularem bovinos com uma vacina contra BoHV-1, por via intramuscular, não detectaram IgA específica na mucosa nasal, pelo método de ELISA indireto.

Considerando-se a importância das vias mucosas nasal e vaginal na epidemiologia dos herpesvírus bovino (BoHV), especialmente na sua transmissão, fica evidente a necessidade de técnicas que propiciem desenvolvimento de resposta imune eficaz nas mucosas. As vacinas atualmente disponíveis contra estes agentes etiológicos, no entanto, carecem desta capacidade de indução de imunidade de mucosa (BRANDTZAEG et al., 2007).

#### 4. CONCLUSÕES

Em conclusão, ainda que os resultados obtidos por meio da Técnica de Soroneutralização não sejam satisfatórios, os valores adquiridos pelo Teste de ELISA demonstram a eficácia da vacina inativada contra o BoHV-1 de aplicação intravaginal associada ao *Bacillus toyonensis*, uma vez que houve incremento dos níveis de anticorpos IgA e IgG, nas mucosas vaginal e ainda dos níveis séricos. Além disso, estudos como este impulsionam estudos adicionais para avaliar também a imunidade com o uso de outros adjuvantes.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DEL MÉDICO ZAJAC, M.; PUNTEL, M.; ZAMORANO, P. I.; SADIR, A. M.; ROMERA, S. A. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. **Research in Veterinary Science**, England, v. 81, p. 327-334, 2006.
- FERREIRA, H. C. C.; CAMPOS, M. G.; VIDIGAL, P. M. P.; SANTOS, M. R.; DE CARVALHO, O. V.; BRESSAN, G. C.; FIETTO, J. L. R.; COSTA, E. P.; ALMEIDA, M. R.; SILVA JÚNIOR, A. Latent bovine herpesvirus 1 and 5 in milk from naturally infected dairy cattle. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 80, n. 11, p. 1787-1790, 2018.
- MULIRA, G. L.; SAUNDERS, J. R. Humoral and secretory antibodies to *Ureaplasma diversum* in heifers following subcutaneous vaccination and vaginal infection. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 2, p. 104-108, 1994.
- PETRINI, S.; ISCARO, C.; RIGUI, C. Antibody Responses to Bovine Alpha herpesvirus 1 (BoHV-1) in Passively Immunized Calves. **Viruses**, v. 11, n. 1, 2019.