

TÍTULO DE ANTICORPOS EM CAVALOS IMUNIZADOS COM VACINA CONTRA INFLUENZA EQUINA

DALVA ASSUNÇÃO PORTARI MANCINI
Pesquisadora Científica III
Instituto Butantan

ELAINE APARECIDA GERALDES
Bióloga - Estagiária
Instituto Butantan

JOSÉ RICARDO PINTO
Pesquisador Científico I
Instituto Butantan

MANCINI, D.A.P.; GERALDES, E.A.; PINTO, J.R. Título de anticorpos em cavalos imunizados com vacina contra influenza eqüina. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, v.28, n.2, p.171-7, 1991.

RESUMO: Vacinas contra influenza eqüina bivalentes (A/Eq₁ e A/Eq₂) inativadas, sem e/ou com adjuvante de hidróxido de alumínio, produzidas no Instituto Butantan, foram comparadas quanto a sua capacidade de induzir a produção de anticorpos específicos, através dos testes de inibição da hemaglutinação (IH) e de hemólise radial simples (HRS), em dois lotes de potros. Pela análise de títulos de anticorpos no soro, a partir de avaliações semanais, verificou-se que ambos os tipos de vacina apresentaram imunogenicidade. Ao prazo de um mês da vacinação observou-se que a imunização com vacina adicionada de adjuvante, comparada à imunização com vacina simples, resultou em respostas de anticorpos com títulos mais elevados tanto para IH como HRS, avaliadas frente às duas cepas virais.

UNITERMOS: Influenza, eqüinos; Vacinas; Anticorpos

INTRODUÇÃO

Surtos epidêmicos da influenza eqüina têm ocorrido frequentemente no mundo, ocasionando altos índices de morbidade entre os animais afetados ^{2,22}. Apesar do prognóstico benigno da enfermidade, podem ocorrer complicações tais como infecções secundárias,

agravando a doença ^{2,10}. O vírus da influenza eqüina A/Eq₁ foi inicialmente isolado em Praga, Tchecoslováquia, em 1956, surgindo nos Estados Unidos, somente em 1963. Neste mesmo ano ocorreu em Miami, Flórida, um surto do vírus influenza A/Eq₂ que causou 80% das mortes entre os animais da região. Os isolamentos das cepas A/Eq₁, assim como a A/Eq₂ do vírus influenza serviram de fonte para a produção de vacina bivalente "Fluvac", após exaustivos estudos realizados pelo Departamento de Ciências Veterinárias da Universidade de Kentucky, USA. Esta vacina, após sucessivos testes, foi liberada para uso em 1965. Depois de mais de 20 anos de seu emprego, não houve alteração das cepas constituintes ¹³. Outros estudos realizados com vírus da influenza eqüina demonstraram bons resultados na obtenção de imunógenos, que foram capazes de induzir aumento significativo no nível de anticorpos protetores em animais vacinados ^{1,7,9,14,20,23}. Principalmente, considerando-se que as cepas do tipo A do vírus influenza apresentam um antígeno tipo específico comum entre elas, o que foi observado através de reações sorológicas ¹⁶.

No Brasil, o isolamento das cepas A/Eq₁ e A/Eq₂, foi realizado após o surto de influenza em eqüinos no Estado de São Paulo, em 1963 e 1969 ¹⁷ e Rio de Janeiro, em 1969, 1976 e 1985 ^{3,4,6}.

Novas informações sobre as propriedades antigênicas do vírus influenza têm contribuído, de forma efetiva, para o esclarecimento das cepas variantes incidentes, e concomitantemente no planejamento das medidas de controle da infecção ¹¹. Assim, a vacinação tem sido a mais eficaz solução contra a infecção viral, principalmente em locais de alta morbidade do vírus ^{1,14}. Deve-se considerar, também, que pesquisas realizadas após períodos epizooticos da influenza eqüina demonstraram aumento expressivo nos títulos de anticorpos contra influenza, em animais que haviam sido previamente vacinados ⁷.

O uso de adjuvantes associados a vacina contra influenza tem sido relatado, demonstrando um aumento na produção de anticorpos. Substâncias como alginato de sódio, adjuvante de Freund, óleo mineral, e sistemas como óxido de alumínio, hidróxido de alumínio, fosfatos de cálcio e alumínio, têm sido empregados como potencializadores de antígenos ^{8,12,18}. Todavia, o emprego de adjuvantes pode induzir a formação de inflamação e o desenvolvimento de tumores no local da aplicação. Por isso, deve-se equacionar a utilização destas substâncias, considerando-se o título de anticorpos alcançados frente ao grau de agressão induzida ao animal.

Tendo em vista que no Brasil, várias ocorrências da influenza eqüina têm sido relatadas ^{4,6,11,14}, e não havendo dados atuais sobre a resposta de soroconversão de animais imunizados e, ainda, que as

vacinas disponíveis são normalmente importadas, é que se procurou, no presente trabalho, avaliar uma vacina bivalente contra influenza eqüina, preparada experimentalmente em nossos laboratórios do Serviço de Virologia, no Instituto Butantan, com as cepas A/Eq₁ e A/Eq₂ do vírus influenza, isoladas no Instituto Adolfo Lutz. Analisou-se a influência do hidróxido de alumínio como adjuvante e a persistência de anticorpos nos animais vacinados, durante aproximadamente cinqüenta dias.

MATERIAL E MÉTODO

1 - Virus

Os tipos A/Eq₁/SP/1/56 (H₇N₇) e A/Eq₂/SP/1/85 (H₃N₈) do vírus de influenza eqüina* foram cultivados em ovos embrionados de galinha (Specific Pathogen Free), de 11 dias, através de passagens sucessivas.

2 - Preparo da Vacina

A vacina contra gripe eqüina foi preparada experimentalmente com os antígenos do vírus da influenza eqüina A/Eq₁ (H₇N₇) e A/Eq₂ (H₃N₈), obedecendo aos padrões da Organização Mundial da Saúde¹⁵ para a produção de vacina contra gripe de uso humano, e compreendendo, basicamente, as seguintes etapas:

- cultivo do vírus influenza em células da cavidade alantóide de ovos embrionados da galinha (S P F);
- colheita do vírus após incubação a 36 °C por 40 h;
- concentração do vírus em ultracentrífuga Sharples (50.000 rpm) com fluxo contínuo;
- inativação viral através do formol a 1:2.000. Os concentrados virais (A/Eq₁ e A/Eq₂), diluídos em solução tampão fosfato até a concentração antigênica final de 100 u.h., geraram a vacina bivalente simples (V.S.) que, acrescida de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) a 30%, resultou na vacina bivalente com adjuvante (V.A.). Como conservante foi utilizado o thimerosal a 1:10.000. Provas de potência e de segurança foram realizadas no decorrer do processamento das vacinas¹⁵.

* Isolados no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo e gentilmente cedidos pela Dra. Sueko Takimoto.

3 - Animais Utilizados

Cavalos (potros) com idade média de 2,5 anos, pertencentes ao plantel da Fazenda São Joaquim do Instituto Butantan, foram separados em 3 lotes:

Lote A - 14 animais, imunizados com a vacina simples (V.S.).

Lote B - 15 animais, imunizados com a vacina adicinada de adjuvante (V.A.).

Lote C - 05 animais controle, não vacinados.

4 - Imunização e Sangrias

As imunizações, constando de duas doses de vacina de 3,0 ml cada uma, foram realizadas com intervalo de duas semanas. Os animais foram sangrados antes das imunizações e 7,14,21,28,35 e 42 dias após a primeira imunização.

5 - Testes Sorológicos

O teor de anticorpos nos soros dos eqüinos foi avaliado através dos métodos de inibição da hemaglutinação e hemólise radial simples.

5.1 Inibição da Hemaglutinação (IH)

Foi utilizado o método de Takatsy²¹, que se baseia na inibição da ação hemaglutinante dos vírus, através de anticorpos específicos. Amostras de soro foram inativadas a 56 °C e tratadas com Caolim a 20% em solução tampão fosfato (PBS), para remoção de anticorpos inespecíficos. Destes tratados foram feitas diluições em duplicata, seriadas, em microplacas de fundo em "V". Antígeno do vírus influenza, cultivado em ovos embrionados, contendo 4 unidades hemaglutinantes, foi adicionado às cavidades. Após 1 hora de reação à temperatura ambiente, acrescentaram-se hemácias de galo a 0,5%. Ao fim de 30 min., procedeu-se à leitura, considerando-se como título do anticorpo, a recíproca da última diluição que induziu inibição da hemaglutinação. Os soros que apresentaram títulos de anticorpos iguais ou superiores a 1/20, foram considerados positivos.

5.2 Hemólise Radial Simples (HRS)

Foi utilizado o método de SCHILD et al.¹⁹, que se fundamenta na lise das hemácias de galo, sensibilizadas com vírus e mediada pelo complemento (soro fresco de cobaia), quando na presença de anticorpos específicos. Placas de poliestireno (12,5 x 8,5 cm) foram preparadas com 20 ml de agarose a 1%, fundida e resfriada a 43 °C, adicionada de 4 ml de antígeno de vírus influenza (50 unidades hemaglutinantes), previamente absorvido com 4 ml de suspensão a 10% de hemácias de galo, em solução de D.G.V. (dextrose 1 g%, gelatina 0,06 g% e veronal 0,03 g%), sob refrigeração por 30 min. Em seguida, adicionou-se à agarose, 1 ml de complemento (soro fresco de cobaia) com 125 unidades - CH₅₀. Após incubação de 30 min. à temperatura ambiente, foram feitas perfurações de 3 mm de diâmetro na agarose, às quais se adicionaram os soros dos animais imunizados, previamente inativados a 56 °C/30 min. Ao completar 18 h de incubação em câmara úmida, foi realizada a leitura do diâmetro das áreas de hemólise. Estas medidas forneceram uma avaliação indireta da concentração de anticorpos no soro, sendo considerados reação positiva, os valores iguais ou superiores a 2,0 mm.

RESULTADOS**

As Fig. 1,2,3 e 4 mostram teor de anticorpos nos soros dos eqüinos imunizados com as vacinas simples (V.S.) e com adjuvante (V.A.), avaliadas através dos testes IH e HRS.

Na Fig. 1 encontram-se os resultados dos soros dos animais que apresentaram títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação iguais ou superiores a 1/20, valores considerados satisfatórios frente à imunização com antígeno influenza A/Eq₁ com e sem adjuvante.

Os animais vacinados com antígeno influenza associado ou não ao adjuvante, que apresentaram títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação iguais ou superiores a 1/20, para o vírus A/Eq₁, encontram-se na Fig. 2.

As Fig. 3 e 4 apresentam as médias dos títulos de anticorpos verificados em diâmetro dos halos de hemólise para os antígenos A/Eq₁ e A/Eq₂ com e sem adjuvante, respectivamente, detectados nos soros dos potros vacinados, com valores iguais ou superiores a 2,0 mm.

** Aos resultados foi aplicado o teste t de Student. Na elaboração dos gráficos foi utilizado o Harvard Graphics Program em um computador PC XT.

Os cinco animais controle, não vacinados, não apresentaram títulos de anticorpos detectáveis quer pelo método de inibição da hemaglutinação ou pelo método da hemólise radial simples.

Comparando-se os números de animais que apresentaram positividade frente aos antígenos influenza A/Eq₁ e A/Eq₂, com e sem adjuvante, observa-se que a vacina adjuvantada apresentou imunogenicidade significativamente superior à vacina sem adjuvante (P < 0,01, cepa A/Eq₁ e P < 0,05, cepa A/Eq₂).

Na análise do soro dos animais que apresentaram médias de títulos de anticorpos verificados pela hemólise radial simples, observa-se, também, significância para vacina com adjuvante (P < 0,05, para ambas as cepas A/Eq₁ e A/Eq₂).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A escolha de animais jovens, com idade média de 2,5 anos para avaliação da imunização contra a influenza eqüina, prende-se ao fato deles apresentarem maior índice prévio de soronegativos, devido à menor frequência de exposição à infecção, contrariamente ao que ocorre com animais adultos¹¹.

A investigação sorológica oferece importante suporte ao monitoramento de uma vacinação contra determinada infecção, porém, depende de complementos como a observação do quadro clínico e do isolamento do agente etiológico, quando se trata do diagnóstico de uma infecção natural. Os testes sorológicos, como inibição da hemaglutinação e hemólise radial simples, são os mais indicados para avaliação imunológica da vacinação contra a influenza eqüina, cuja correlação entre si é considerada satisfatória e comprovadora dos resultados²³.

Nas Fig. 1 e 2 pode-se observar, pelo método da inibição da hemaglutinação, o aumento da positividade à imunização a partir da segunda sangria, com aumento significativo nas subseqüentes sangrias dos animais que receberam a vacina associada ao hidróxido de alumínio. Nestas figuras observa-se, também, que o antígeno A/Eq₁ apresentou menor capacidade imunogênica e menor persistência de anticorpos, quando comparado ao antígeno A/Eq₂.

As curvas de níveis de anticorpos, detectadas pelo método da hemólise radial simples, indicam aumento significativo já na terceira sangria, permanecendo até a 5ª sangria, quando então se inicia o declínio destes níveis.

Da mesma forma que se observa, através dos resultados obtidos pelo método de inibição da hemaglutinação, maior capacidade imunogênica para a vacina adjuvantada, verificam-se, também, resultados

equivalentes obtidos pelo método da hemólise radial simples. É importante destacar que este método permite avaliar os títulos de anticorpos de maneira mais sensível do que o método da inibição da hemaglutinação¹⁹. Estes dados estão de acordo com as observações feitas por WOOD et al.²³ que, trabalhando com pôneis imunizados com vacina contra influenza, observaram maior positividade do soro analisado pelo método da hemólise radial simples. CUNHA et al.⁵ também verificaram boa potencialização do antígeno na presença do hidróxido de alumínio, na resposta imunológica de cavalos vacinados contra influenza eqüina, por diferentes vias de inoculação.

Outro fato relacionado com a eficiência do adjuvante é que, dentre os 15 potros imunizados com vacina contra influenza eqüina adjuvantada, apenas dois não apresentaram resposta de anticorpos inibidores da hemaglutinação para os antígenos A/Eq₁ e A/Eq₂, embora todos fossem soropositivos ao método da hemólise radial simples.

Portanto, podemos considerar, através de nossas análises e de outros pesquisadores⁵, que o uso de adjuvante do tipo aquoso Al(OH)₃ em associação à vacina contra influenza eqüina é válido, face a sua ação imunomoduladora. Somando-se a isto, é importante caracterizar que, pelas observações clínicas realizadas semanalmente nos animais de nosso experimento, não se constatou qualquer tipo de alteração que pudesse eventualmente ocorrer pelo uso do hidróxido de alumínio.

Devido ao declínio de títulos de anticorpos verificados durante a investigação, é lícito crer que a persistência de anticorpos contra a influenza eqüina é curta, como havia sido observado por nós em trabalho anterior¹¹.

Comprovada a imunogenicidade das cepas A/Eq₁ e A/Eq₂ do vírus influenza, avaliadas neste estudo, podemos concluir que elas estariam adequadas para compor a elaboração de um imunógeno com características necessárias para oferecer proteção aos eqüinos susceptíveis à infecção. Devemos ressaltar que a autosuficiência de produção desse imunobiológico traria vantagens à eqüinocultura brasileira, no aspecto de poder diminuir a demanda de sua importação e, conseqüentemente, a redução de custos neste particular.

Considerando a necessidade de se estabelecer o prazo entre a imunização inicial e a dose reforço, a pesquisa prossegue, objetivando investigar a persistência de anticorpos nos animais vacinados contra influenza eqüina, durante o período de um ano. Assim como se pretende estudar, também, o efeito de outros adjuvantes na resposta imune da vacina contra influenza eqüina.

AGRADECIMENTOS

Ao FEDIB (Fundo Especial de Despesas do Instituto Butantan), pela bolsa de estudo concedida, através da aprovação deste trabalho, à estagiária Elaine A. Geraldles.

A Dra. Edda de Rizzo, Diretora do Serviço de Virologia do Instituto Butantan, pela colaboração e sugestões na redação deste trabalho.

Ao médico veterinário Dr. Fuad Naufel "in memoriam", pelo incentivo à investigação da influenza eqüina.

MANCINI, D.A.P.; GERALDES, E.A.; PINTO, J.R. Seroconversion in horses vaccinated with inactivated equine influenza vaccines. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, v.28, n.2, p.171-7, 1991.

SUMMARY: The immunogenicity of the bivalent equine influenza vaccines (types A/Eq₁ and A/Eq₂) plain, or adjuvanted with aluminum hydroxide, produced at the Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, was evaluated on horses sera taken before and after immunization by haemagglutination-inhibition (HI) and single radial haemolysis (SRH) tests. Seroconversion curves were established through weekly evaluations demonstrating good immunogenicity of both vaccines. Better humoral antibody titers were obtained with adjuvanted vaccine compared with the plain one, as showed by both methods used.

UNTERMS: Influenza of equine; Vaccine; Antibody formation

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01-BRYANS, J.T.; DOLL, E.R.; WILSON, J.C.; McCOLLUM, W.M. Immunization for equine influenza. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, v.148, p.413-7, 1966.
- 02-CORREA, W.M.; CORREA, C.N.M. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos*. São Paulo, Varela, 1979. p.555-63: Enfermidades por Rickettsias e vírus.
- 03-CUNHA, R.G. Isolamento de amostras de vírus influenza eqüina/A/Eq₂ no Estado da Guanabara. *Rev. bras. Biol.*, v.30. p.491-8, 1970.
- 04-CUNHA, R.G.; PASSOS, W.S.; PAGANO, M.C.; SOUZA, D.M. Surto de gripe eqüina/produzida por vírus

Título de anticorpos em cavalos imunizados com vacina contra influenza eqüina.

- influenza A/Eq₂ no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. bras. Med. vet.*, v.8, p.88-91, 1986.
- 05-CUNHA, R.G.; PASSOS, W.S.; RODRIGUES, A.F. Influência da via de inoculação e do hidróxido de alumínio na resposta imunológica de cavalos vacinados contra influenza eqüina. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.40, p.357-68, 1973.
- 06-CUNHA, R.G.; PASSOS, W.S.; VALLE, M.C.C. Surto de gripe Eqüina produzida por vírus influenza A/Eq₁ no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. bras. Biol.*, v.38, p.549-54, 1978.
- 07-GOTO, H.; SHIMIZU, K.; TAYA, Y.; NODA, H.; TOKUNAGA, T. Antibody response of horses to equine influenza viruses during a postepizootic period in Japan. *Canad. J. comp. Med.*, v.46, p.27-32, 1982.
- 08-KUCERA, C.J. The case for an adjuvanted equine influenza vaccine. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, v.155, p.281-4, 1969.
- 09-LANGER, P.H. Equine influenza: development of a new combination vaccine. *Vet. Med. small anim. Clin.*, v.61, p.662-8, 1966.
- 10-McQUEEN, J.L.; STEELE, J.H.; ROBINSON, R.Q. Equine influenza. *Advanc. vet. Sci.*, v.12, p.285-336, 1968.
- 11-MANCINI, D.A.P.; GERALDES, E.A.; PINTO, J.R.; SOARES, M.A. Ocorrência de influenza eqüina na Fazenda São Joaquim, São Roque - SP, do Instituto Butantan. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec Univ. S. Paulo.*, v.25, p.93-100, 1988.
- 12-DE MEIO, J.L.; GUTENKUNST, D.E.; BEILER, J.M.; PATON, I.M.; DE SANCTIS, A.N. The evaluation of an experimental bivalent equine influenza virus vaccine. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, v.155, p.278-81, 1969.
- 13-MOORE, D.O. Development and evolution of three vaccines. *Irish vet. J.*, v.40, p.105-7, 1986.
- 14-NAGAMINE, T.; ASAHARA, T.; HIGASHIHARA, M. Studies on a test vaccine for equine influenza virus. I. Production of a test vaccine. *Kiasso Arch. exp. Med.*, v.48, p.53-67, 1975.
- 15-ORGANIZATION MONDIALE DE LA SANTÉ. Comité OMS d'experts de la standartisation biologique. Annexe 3. Normes révisées relatives au vaccin antigrippal (inactivé). Genève, 1978. p.161-78. (Série de Rapports Techniques, 638)
- 16-PEREIRA, H.G. Influenza antigenic spectrum. *Progr. med. Virol.*, v.11, p.46-79, 1969.
- 17-PIEGAS, N.S.; TAKIMOTO, S.; BARBOSA, H.H.G.; LACERDA, J.P.G.; GUARNIERI, R.; ISHIMARU, T. Isolamento de vírus influenza de surto de gripe eqüina em São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 15., Rio de Janeiro, 1976. *Anais*. p.122.
- 18-REISINGER, R.C. Comments on aqueous and adjuvanted equine influenza vaccines. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, v.155, p.287-93, 1969.
- 19-SCHILD, G.C.; PEREIRA, M.S.; CHAKRAVERTY, P. Single-radial-haemolysis: a new method for the assay of antibody to influenza haemagglutinin. *Bull. Wild Hlth Org.*, v.52, p.43-50, 1975.
- 20-SOVINOVA, O.; TUMOVA, B.; POUŠKA, F.; NEMEC, J. Isolation of virus causing respiratory disease in horses. *Acta virol.*, v.2, p.52-61, 1958.
- 21-TAKATSY, G. The use of spiral loops in serological and virological micromethods. *Acta microbiol. Acad. Sci. Hung.*, v.3, p.191, 1955.
- 22-WADDELL, L.G.H.; TEIGLAND, M.B.; SIGEL, M.M. A new influenza virus associated with equine respiratory disease. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, v.143, p.587-90, 1963.
- 23-WOOD, J.M.; MUNFORD, J.; FOLKERS, C.; SCOTT, S.M.; SCHILD, G.C. Studies with inactivated equine influenza vaccine. *J. Hyg.*, London. v.90, p.371-84, 1983.

Recebido para publicação em 23/11/90

Aprovado para publicação em 10/10/91

Título de anticorpos em cavalos imunizados com vacina contra influenza eqüina.

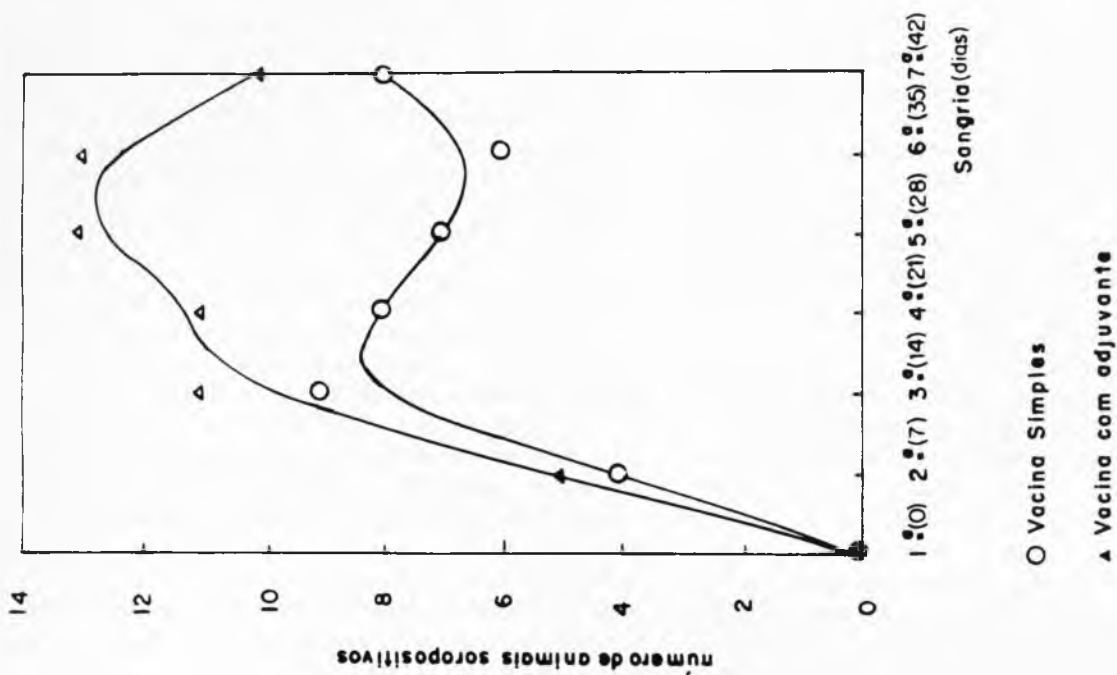


FIGURA 2 - Resposta de anticorpos detectados pela inibição da hemaglutinação para o vírus influenza A/Equ₂ em soros de potros imunizados com vacina contra gripe eqüina.

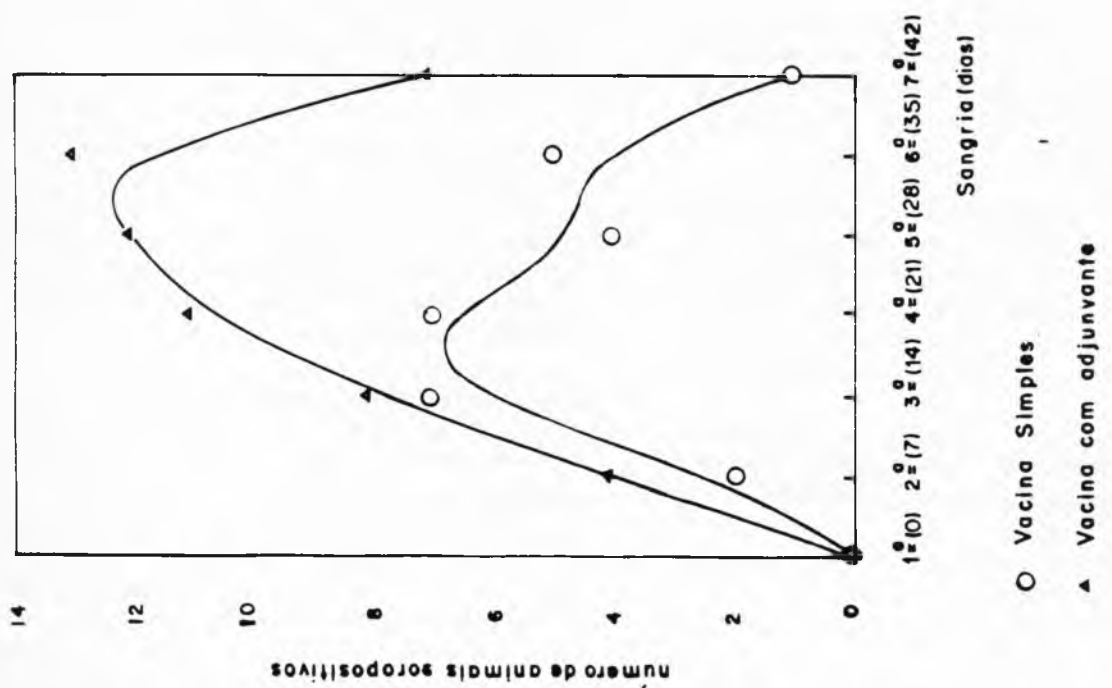


FIGURA 1 - Resposta de anticorpos detectados pela inibição da hemaglutinação para o vírus influenza A/Equ₁ em soros de potros imunizados com a vacina contra gripe eqüina.

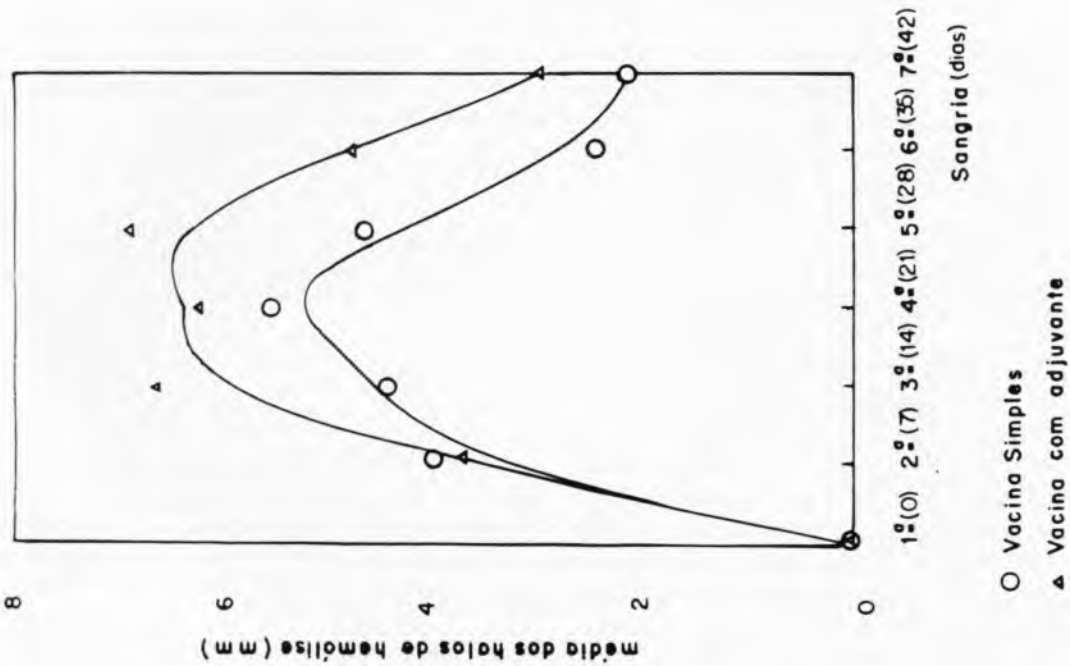
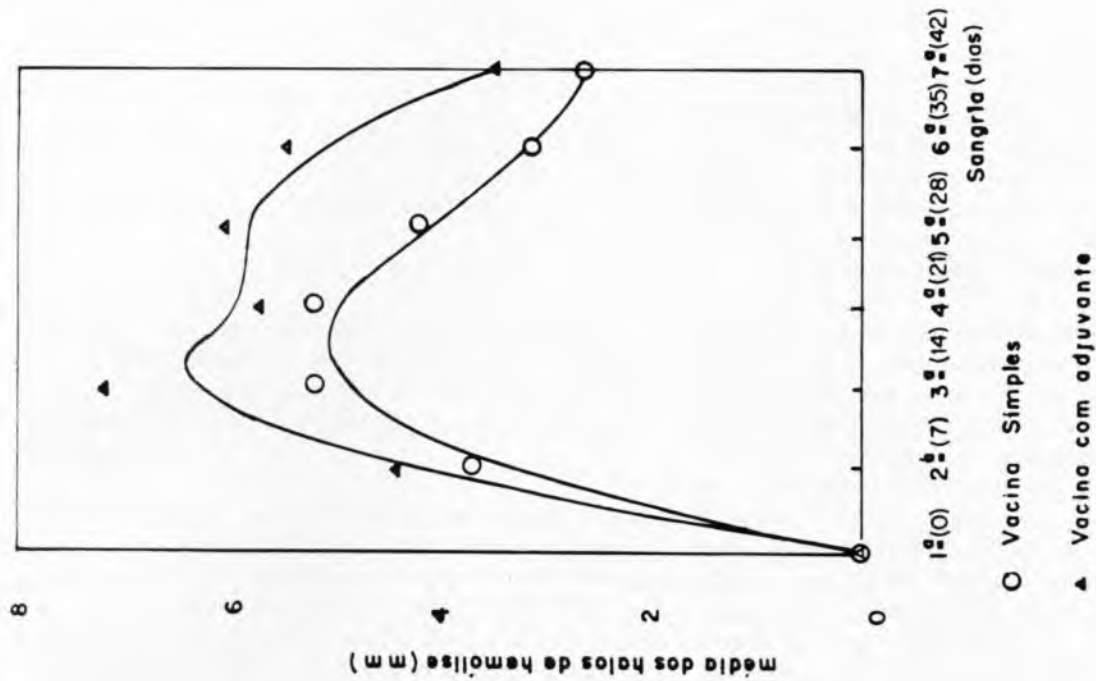


FIGURA 4 - Resposta de anticorpos detectados pela hemólise radial simples para o vírus influenza A/Eq₂ em soros de potros imunizados com a vacina contra gripe eqüina.

FIGURA 3 - Resposta de anticorpos detectados pela hemólise radial simples para o vírus influenza A/Eq₁, em soros de potros imunizados com a vacina contra gripe eqüina.