

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 Evaluation of the adjuvant activity of dimethyl dioctadecyl ammonium chloride associated with the ammonium hydroxide to induction of humoral immune response of cattle vaccinated with bovine viral diarrhoea virus

Luis César da SILVA¹;
Elisabete TAKIUCHI¹;
Kerlei Cristina MÉDICI²;
Alice Fernandes ALFIERI²;
Amauri Alcindo ALFIERI²

1- Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR
2- Laboratório de Virologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR

Resumo

A resposta imunológica humoral de bovinos vacinados com o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) inativado, tendo como adjuvante o cloreto de dimetildiocetadecilamônio (DDA cloreto) associado ao hidróxido de alumínio (vacina B), foi comparada com uma vacina contendo o mesmo antígeno adsorvido apenas com hidróxido de alumínio (vacina A). Duas semanas após a segunda dose foi avaliado o título de anticorpos neutralizantes dos animais que receberam as duas preparações de antígenos. Os animais que receberam a vacina B apresentaram melhor resposta imune humoral quando comparados com os animais vacinados com a vacina A. O título médio de anticorpos neutralizantes, expresso em Log₂, dos animais que receberam a vacina B foi superior ($P < 0,05$) ao observado no grupo vacinado com a vacina A. Esse resultado demonstra que, em bovinos vacinados com o BVDV inativado, a inclusão do DDA cloreto em formulações de vacinas adsorvidas com hidróxido de alumínio potencializa a resposta imune humoral.

Palavras-chave:

Bovino.
Vírus da diarreia viral bovina.
Cloreto de dimetildiocetadecilamônio.
Vacina.
Adjuvante.

Correspondência para:

AMAURI ALCINDO ALFIERI
Laboratório de Virologia Animal
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Centro de Ciências Agrárias, UEL
Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445),
km380 - Caixa Postal 6001
86051-990 - Londrina - PR
alfieri@uel.br

Recebido para publicação: 09/12/2002
Aprovado para publicação: 18/05/2004

Introdução

A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (*bovine viral diarrhoea virus* -BVDV-) determina consideráveis prejuízos econômicos à pecuária bovina de corte e leite. A diarreia viral bovina (*bovine viral diarrhoea* -BVD-) caracteriza-se por ocasionar quadros clínicos distintos que, devido à semelhança com outras infecções, são de difícil diagnóstico clínico.²¹ A característica imunodepressora do BVDV faz com que, em muitas ocasiões, infecções inicialmente

brandas, possam ser complicadas por infecções bacterianas secundárias dificultando o diagnóstico da etiologia primária.² Problemas respiratórios e entéricos são freqüentes nas infecções pelo BVDV, porém os distúrbios reprodutivos são os que trazem maiores conseqüências, diretas e indiretas, nos índices de produção.^{3,4} A infecção de fêmeas gestantes soronegativas, na dependência do estágio gestacional, pode determinar mortalidade embrionária e fetal, natimortalidade, mortalidade neonatal, o nascimento de animais fracos, com peso

corporal abaixo da média da raça, bem como o nascimento de animais persistentemente infectados pelo BVDV e constituem-se o elo da cadeia epidemiológica dessa virose.⁵

Para o controle e a profilaxia da BVD foram desenvolvidos basicamente dois tipos de vacinas. As vacinas contendo o BVDV atenuado induzem melhor resposta imune celular e humoral, porém podem ser responsáveis por imunodepressão, problemas reprodutivos, particularmente abortos⁶, e o desencadeamento de um quadro clínico conhecido como Doença das Mucosas^{7,8}. Esses efeitos adversos podem ser contornados pelo uso de vacinas contendo o BVDV inativado. Porém, o antígeno inativado é um imunógeno fraco, gerando resposta imune apenas do tipo humoral, em muitas ocasiões com baixo título de anticorpos e que persistem por um curto período de tempo⁹. Com isto, os níveis de imunidade protetora para um desafio fetal são bastante limitados¹⁰.

A adição de adjuvantes imunológicos em vacinas elaboradas com o BVDV inativado pode induzir resposta imune mais efetiva, tanto em relação ao título de anticorpos quanto ao período de proteção pós-vacinal.¹ O hidróxido de alumínio [Al(OH)₃] é um dos adjuvantes mais utilizados em vacinas para uso humano e veterinário. Porém, na dependência das características antigênicas, a resposta imunológica a antígenos adsorvidos com produtos derivados de alumínio, em muitas situações, não é melhor do que a obtida frente ao mesmo antígeno em meio aquoso.¹¹

O dimetildioctadecilamônio (DDA) é uma amina quaternária lipofílica sintética, descrita inicialmente por Gall¹², que atua como agente surfactante e apresenta uma importante característica imunomoduladora. O potencial adjuvante do DDA nas respostas imunológicas humoral e celular vem sendo testado frente a antígenos de diferentes origens incluindo os antígenos virais.^{13,14} A maioria dos estudos relativos ao potencial

adjuvante do DDA foi realizada com o ânion brometo, empregado de forma isolada ou em associação a outros imunomoduladores, sendo poucos os experimentos que avaliaram o ânion cloreto^{15,16}.

Neste estudo a capacidade adjuvante do DDA cloreto, associado ao Al(OH)₃, foi avaliada pela elaboração de vacinas contendo o BVDV inativado, empregadas para imunizar bezerras. A resposta imunológica humoral dos animais vacinados foi avaliada e os resultados comparados com um imunógeno contendo o BVDV inativado adsorvido apenas com o Al(OH)₃.

Materiais e Métodos

Para a elaboração das vacinas foi utilizada a estirpe Singer (ATCC) do BVDV, com título de 10^{7,10} TCID₅₀ / mL. Para o cultivo do BVDV foi empregada a linhagem celular *Madin Darby bovine kidney* (MDBK) mantida em meio Dulbecco (DMEM-Gibco BRL-EUA) suplementado com 7% de soro fetal bovino (SFB) livre de micoplasmas e vírus (Gibco BRL-EUA), 55 mg/mL de gentamicina (Sigma Co.-EUA) e 2,5 mg/mL de anfotericina B (Sigma Co.-EUA). Na multiplicação do BVDV foi empregado SFB 1%, o qual demonstrou previamente ser destituído de anticorpos neutralizantes para o BVDV e para o herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). Após a visualização de 60 a 70% de efeito citopático (ECP), para a liberação do vírus intracelular, as células foram lisadas com três ciclos rápidos de congelamento e descongelamento. O título viral foi determinado pelo método Reed e Muench¹⁷ e expresso em dose infectante para cultura de tecido / 50% (TCID₅₀).

O BVDV foi inativado pela bromoetilenimina (BEI), que foi obtida pela ciclização da 2-bromoetilamina (BEA) a 37° C por uma hora sob condição alcalina (0,2N NaOH). O processo de inativação viral foi realizado pela adição de 1mM de BEI pH 7,8 sob agitação lenta e constante, por 12 horas a 25° C². Após a inativação, a BEI foi

neutralizada pela adição de tiosulfato de sódio até a concentração final de 1%.¹⁸ Para o controle de vírus infeccioso residual, o BVDV inativado foi inoculado em cultivo de células MDBK, sendo a presença e/ou ausência de ECP monitorada por 96 horas.

Após a inativação do BVDV foram preparadas duas diferentes formulações de vacina, utilizando como adjuvante o gel de hidróxido alumínio $\text{Al}(\text{OH})_3$ (vacina A) e a associação $\text{Al}(\text{OH})_3$ / DDA cloreto (vacina B). Na vacina A, a adsorção do antígeno foi realizada pela adição de $\text{Al}(\text{OH})_3$, de forma lenta e gradual, por um período de 4 hs com agitação constante, obtendo-se a concentração final de 5 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ / mL de vacina. Para a elaboração da vacina B, após a adsorção do antígeno pelo $\text{Al}(\text{OH})_3$, o DDA cloreto foi adicionado na concentração de 5 mg/mL de vacina. Testes de esterilidade e inocuidade padrões¹⁹, “in vitro” e “in vivo” (camundongos) foram realizados com as duas formulações de vacinas.

Para os testes de avaliação imunológica das vacinas A e B foram utilizados 15 bezerros machos da raça holandesa preta e branca, com cinco a seis meses de idade, divididos em três grupos. O grupo A (n=6) recebeu a vacina contendo o adjuvante $\text{Al}(\text{OH})_3$, o grupo B (n=6) a vacina com a associação $\text{Al}(\text{OH})_3$ / DDA cloreto e o grupo C (n=3), controle negativo, recebeu apenas o DMEM sem SFB (Gibco BRL). Para todos os animais o volume de cada vacina foi de 5 mL/dose, aplicada pela via subcutânea na região do dorso, em duas doses, sendo a primeira no dia zero e a segunda 21 dias após.

Os soros dos bezerros vacinados foram obtidos por colheita de sangue na veia jugular realizada nos dias 0, anterior à primeira vacinação, e nos dias 21 e 35. Após a coagulação os soros foram separados, centrifugados a 1000 x g durante 10 min e estocados a -20° C para a posterior avaliação da soroconversão pós-vacinal.

A detecção dos anticorpos contra o BVDV foi realizada de acordo com a

microtécnica da soroneutralização (SN) descrita por Fulton et al.²⁰. Após a prévia inativação do soro a 56° C/30 min, diluições seriadas na base 2 (1:2 a 1:512), realizadas em meio DMEM (Gibco BRL), foram distribuídas em microplacas de 96 cavidades e incubadas com 100 TCID₅₀ da estirpe Singer do BVDV. Após incubação por uma hora a 37° C, uma suspensão de 4 x 10⁴ células MDBK diluída em meio DMEM foi adicionada em cada uma das cavidades. As placas foram incubadas a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ por três dias. Foram consideradas positivas as diluições dos soros que inibiram 100% do ECP induzido pelo BVDV, sendo os títulos expressos em Log₂ da recíproca da maior diluição.

Para o tratamento estatístico foi utilizada a análise de variância em blocos completos ao acaso, com nível de significância de 5%, e para as comparações múltiplas foi empregado o teste Duncan a 5%. Para a realização dos cálculos foi empregado o programa SAS (Statistic Analysis Systems

Resultados e Discussão

O DDA cloreto foi totalmente inócua para bovinos. Nenhum dos seis animais que recebeu esse adjuvante apresentou qualquer reação local e/ou sistêmica. A inocuidade do DDA também já foi anteriormente descrita em humanos e animais.^{21,22}

Os animais do grupo C (controle), que foram mantidos no mesmo ambiente e em contato com os animais dos dois grupos vacinados, permaneceram negativos (título ≤ 1) durante todo o experimento. Esse resultado sugere que no período do experimento não houve infecção dos animais pelo BVDV, indicando que os títulos de anticorpos, demonstrados pela técnica de soroneutralização, dos animais dos grupos vacinados são devidos ao estímulo imunológico promovido pelas vacinas. O perfil sorológico pré e pós-vacinal dos grupos A, vacina com $\text{Al}(\text{OH})_3$ e B, vacina com a associação $\text{Al}(\text{OH})_3$ / DDA cloreto, são apresentados na tabela 1.

Tabela 1

Distribuição da média dos títulos de anticorpos neutralizantes para o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) identificados em bezerros (n = 15) vacinados com duas doses (dias: zero e 21) do BVDV inativado, em duas formulações de vacinas

Grupos	Título de anticorpos Log ₂ ^(a)		
	Dia 0	Dia 21	Dia 35
Bezerros ⁽¹⁾			
GRUPO A			
A1	≤1	≤1	4
A2	≤1	2	4
A3	≤1	3	6
A4	≤1	4	4
A5	≤1	2	6
A6	≤1	3	6
Média	≤1,0	2,5±1,0	5,0±1,1 ^x
GRUPO B			
B1	≤1	4	6
B2	≤1	5	6
B3	≤1	5	6
B4	≤1	5	6
B5	≤1	4	7
B6	≤1	4	7
Média	≤1,0	4,5±0,5	6,3±0,5 ^y
GRUPO C			
C1; C2; C3	≤1	≤1	≤1

^(a)Grupos: A- Vacina com gel de hidróxido de alumínio; B- Vacina com associação gel de hidróxido de alumínio e cloreto de dimetildioctadecilamônio (DDA); C- Controle (meio de cultura celular Dulbecco)

⁽¹⁾Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste Duncan (P < 0,05).

No dia zero não houve diferença significativa entre os títulos de anticorpos neutralizantes nos animais dos dois grupos experimentais.

No 35º dia, todos os 12 animais incluídos nos grupos A e B, apresentaram soroconversão em títulos variados, embora o grupo B apresentasse maiores títulos que o grupo A. Esse resultado demonstra a manutenção da integridade dos antígenos do

BVDV uma vez que a soroconversão dos animais foi monitorada pela identificação de anticorpos neutralizantes, induzidos por determinantes antigênicos envolvidos no processo de adsorção do vírus às células alvo. A soroconversão de todos animais, independente do tipo de adjuvante recebido, também revela que o BVDV estava presente em título suficiente para ativar o sistema imunológico dos bovinos vacinados.

Com frequência, nas vacinações de rebanhos são observadas grandes variações no número de animais que apresentam soroconversão e no título de anticorpos induzidos por vacinas comerciais. Essa variação, em grande parte, deve-se ao título viral presente nos imunógenos e ao tipo de adjuvante utilizado. A literatura apresenta evidências que, frente a alguns antígenos, os compostos à base de alumínio não induzem melhor resposta imune humoral que preparações dos antígenos em soluções aquosas.¹¹

Nesse trabalho, as duas vacinas testadas foram elaboradas com o BVDV em alto título (10^{7,10} TCID₅₀ / mL) e todos animais, independente do tipo de adjuvante utilizado, apresentaram soroconversão em títulos variados. Como a resposta imune humoral induzida por antígenos inativados é dependente da concentração de antígeno²³, o alto título viral das vacinas A e B, provavelmente pode ter sido responsável pela produção de anticorpos detectados em todos os animais vacinados.

Entretanto, quantitativamente, observou-se diferença no perfil sorológico pós-vacinal induzido pelas duas vacinas avaliadas. Os resultados da associação Al(OH)₃ / DDA cloreto como adjuvante em vacinas com o BVDV inativado para uso em bovinos, revelaram-se bastante promissores uma vez que os animais do grupo B responderam com títulos de anticorpos neutralizantes superiores em relação ao grupo A. O efeito sinérgico do DDA na indução de resposta imunológica, quando em associação a outros adjuvantes, também já foi descrito por Veronesi, Correa e Alterio²² e Grubhofer.²⁴

A resposta imune humoral dos animais do grupo B foi mais precoce em

relação aos animais que receberam a vacina A. Os seis animais do grupo B apresentaram soroconversão vacinal já aos 21 dias após a primeira dose de vacina. No grupo A um animal não apresentou soroconversão e os outros cinco, apresentaram títulos de anticorpos inferiores ao detectados nos animais que receberam a associação DDA cloreto / Al(OH)₃ como adjuvante.

A intensidade da resposta imune humoral também foi superior no grupo B onde a média de anticorpos neutralizantes (4,5), já na primeira dose de vacina, foi muito semelhante à média do grupo A, alcançada somente 14 dias após a segunda dose. Os maiores títulos individuais, alcançados pelos animais do grupo B sugerem ainda que a associação de adjuvantes possibilita que os animais mantenham títulos protetores por maior período de tempo após a vacinação, determinando desta forma maior intervalo de proteção pós-vacinal. Esse resultado é

importante uma vez que o maior intervalo entre as vacinações resulta em redução de práticas de manejo e de custos de vacinação.

Esses resultados demonstram que, a exemplo do ânion brometo, o DDA cloreto quando empregado em associação com o Al(OH)₃, também tem grande potencial adjuvante da resposta imune humoral em bovinos vacinados com o BVDV inativado. Paralelamente, o baixo custo do DDA cloreto, que é uma substância utilizada como antiestático em cosméticos e amaciantes, abre a perspectiva da utilização desse adjuvante para o incremento da resposta imune específica, tanto em termos qualitativos quanto quantitativos, de vacinas comerciais.

Agradecimentos

Apoio financeiro: CNPq, CAPES e CPG/UEL.

Abstract

The humoral immune response of cattle vaccinated with inactivated bovine viral diarrhoea virus (BVDV) using the association of dimethyl dioctadecyl ammonium chloride (DDA-chloride) and aluminum hydroxide (vaccine B) as adjuvant, was compared with the same antigenic formulation adsorbed with only aluminum hydroxide (vaccine A). The neutralizing antibodies titers were assessed two weeks after the second vaccine dose. The animals that received vaccine B had better humoral responses than the calves vaccinated with vaccine A. The mean titers of neutralizing antibodies, expressed in Log₂, for the calves that received vaccine B was higher to those observed in group vaccinated with vaccine A. These results show that the inclusion of DDA chloride in vaccine formulations adsorbed with aluminum hydroxide determine a better humoral immune response in cattle vaccinated with BVDV inactivated.

Key-words:

Cattle.
Bovine viral diarrhoea virus.
Dimethyl dioctadecyl ammonium chloride.
Vaccine.
Adjuvant.

Referências

1. THOMAS, P. C. et al. Can an immunomodulating adjuvant enhance and extend the protection of Killed BVD virus vaccine? **Veterinary Medicine**, v. 81, p. 974-976, 1986.
2. POTGIETER, L. N. D. Immunosuppression of cattle as a result of bovine viral diarrhoea virus infection. **Agri-Practice**, v. 9, p. 7-14, 1988.
3. MCGOWAN, M. R.; KIRKLAND, P. D. Early reproductive loss due to bovine pestivirus infection. **British Veterinary Journal**, v. 151, p. 263-270, 1995.
4. WOODARD, L. F. BVD virus associated with outbreaks of abortion, stillbirths, and weak calves. **Veterinary Medicine**, v. 89, n. 4, p.379-384, 1994.
5. FREY, M. D.; PATON, D. J.; ALENIUS, S. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 615-627, 2000.
6. BOLIN, S. R. Control of bovine viral diarrhoea infection by use of vaccination. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 615-625, 1995.
7. BAKER, J. C. Clinical aspects of bovine virus diarrhoea

- virus infections. **Revue Scientifique et Technique**, v. 9, p. 25-41, 1990.
8. ROSNER, S. R. Complications following vaccination of cattle against infectious bovine rhinotracheitis, bovine viral diarrhea-mucosal disease and parainfluenza type 3. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 152, p. 898-902, 1968.
 9. CORTESE, V. S. et al. Specificity and duration of neutralizing antibodies induced in healthy cattle after administration of a modified live-virus vaccine against bovine diarrhea. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, p. 848-850, 1998.
 10. EDWARD, E. J. et al. Response to modified live and killed multivalent viral vaccine in regularly vaccinated, fresh dairy cows. **Veterinary Therapeutics**, v. 1, n. 1, p. 49-58, 2000.
 11. WARREN, H. S.; VOGEL, F. R.; CHEDID, L. A. Current status of immunological adjuvants. **Annual Review Immunology**, v. 4, p. 369-388, 1986.
 12. GALL, D. The adjuvant activity of aliphatic nitrogenous bases. **Immunology**, v. 11, p. 369-386, 1966.
 13. HILGER, L. A. T.; SNIPPE, H. DDA as an immunological adjuvant. **Research in Immunology**, v. 143, n. 5, p. 494-503, 1992.
 14. LINDBLAD, E. B. et al. Adjuvant modulation of immune responses to tuberculosis subunit vaccines. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 2, p. 623-629, 1997.
 15. ANDERSEN, P. The T cell response to secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. **Immunobiology**, v. 191, n. 4-5, p. 537-547, 1994.
 16. SILVA, R. A.; PAIS, T. F.; APPELBERG, R. Evaluation of IL-12 in immunotherapy and vaccine design in experimental *Mycobacterium avium* infections. **Journal of Immunology**, v. 161, n. 10, p. 5578-5585, 1998.
 17. REED, R. H.; MUENCH, H. A single method of estimating fifty percent end points. **American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 493-497, 1938.
 18. BAHNEMANN, H. G. Bynary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. **Archives of Virology**, v. 47, p. 47-56, 1975.
 19. CODE of Federal Regulations: Animal and animals products. Washington: United States Agricultural Department, 1999. v. 1, Parts 1 to 199.
 20. FULTON, R. W. et al. Neutralizing antibodies to type-1 and type-2 bovine viral diarrhea viruses – detection by inhibition of viral cytopathology and infectivity by immunoperoxidase assay. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, p. 380-383, 1997.
 21. RECK, R. A. Quaternary ammonium compounds. In: MARK, D. F. et al (Ed.). **Encyclopedia of chemical technology**: New York: J. Wiley and Sons, 1983. v. 19, p. 521-531.
 22. VERONESI, R.; CORRÊA, A.; ALTÉRIO, D. Single dose immunization against tetanus. Promising results in human trails. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 12, p. 46-54, 1970.
 23. CHEN, K. S. Adjuvant enhancement of humoral immune response to chemically inactivated bovine viral diarrhea virus. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 49, p. 91-94, 1985.
 24. GRUBHOFER, N. An adjuvant formulation based on N-acetylglucosamyl-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine with dimethyldioctadecylammonium chloride and zinc-L-proline complex as synergists. **Immunology Letters**, v. 44, p. 19-24, 1995.
 25. KATZ, D. et al. Adjuvant effects of dimethyl dioctadecyl ammonium bromide, complete Freund's adjuvant and aluminium hydroxide on neutralizing antibody, antibody-isotype and delayed-type hypersensitivity responses to Semliki Forest virus in mice. **FEMS Microbiology Immunology**, v. 3, n. 6, p. 305-320, 1991.
 26. KATZ, D. et al. Comparison of dimethyl dioctadecyl ammonium bromide, Freund's complete adjuvant and mineral oil induction of humoral antibodies, cellular immunity and resistance to Newcastle disease virus in chickens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 303-313, 1993.