

**Vacinação Contra O Parvovírus Canino (Cpv): Comparação Das Respostas Dos
Anticorpos Neutralizante Em Filhotes Após Administração De Vacina Com Vírus Vivo
Modificado Cpv2 Ou Cpv2b.**

ANNAMARIA PRATELLI; ALESSANDRA CAVALLI; VITO MARTELLA; MARIA TEMPESTA; NICOLA DECARO;
LELAND EUGENE CARMICHAEL; CANIO BUONAVOGLIA.

RESUMO

O parvovírus canino tipo 2 (CPV2) surgiu em 1978 como o agente causador de uma doença nova em cães. Novas variantes antigênicas (biotipos), denominados CPV2a e CPV2b, difundiram-se de 1979 a 1980 e 1984, respectivamente. Atualmente, o CPV2 original desapareceu na população de cães e tem sido substituído pelos 2 outros vírus. O presente estudo relata a comparação de títulos para anticorpos neutralizantes entre dois grupos de filhotes (18 filhotes cada grupo), inoculados com vírus vacinal vivo modificado CPV2 e CPV2b. Utilizando-se o teste de inibição da hemaglutinação (HI), diferenças relevantes entre títulos de anticorpos contra o vírus homólogo ou contra o vírus heterólogo, não foram frequentemente observadas. Entretanto, utilizando o teste de neutralização (Nt), os filhotes inoculados com CPV2 tiveram títulos para anticorpo, os quais foram aproximadamente 30 vezes maiores para o vírus homólogo (média 4,732) do que para o vírus heterólogo (CPV2b) (média 162). Os resultados destes experimentos permitem concluir que: (i) o teste HI pode nem sempre avaliar precisamente o verdadeiro estado imune do cão, relativo ao CPV e (ii) cães inoculados com CPV2 vacinal desenvolvem títulos Nt relativamente baixos para anticorpos contra o vírus heterólogo (CPV2b). Estes dados podem sugerir uma vantagem para as novas vacinas (que utilizam CPV2b), considerando que a maioria das vacinas atualmente licenciadas são produzidas com CPV2, o qual não mais existe na população de cães.

INTRODUÇÃO

O parvovírus canino tipo 2 (CPV2) surgiu em 1978, quase simultaneamente na Europa e na América do Norte, como um novo patógeno de cães que era responsável por miocardites e gastroenterites hemorrágicas em filhotes (2, 7, 11, 12). A proximidade da relação antigênica e genômica que existe entre CPV2, vírus da panleucopenia felina e o vírus da enterite de “mink” (18) sugere que o CPV2 pode ter se originado de uma mutação genética em um hospedeiro silvestre receptivo a um dos vírus da panleucopenia felina, semelhante ao parvovirus que infecta os carnívoros (19).

Fazendo-se uso de anticorpos monoclonais, análise de restrição enzimática e sequenciamento de DNA, Parrish et al demonstraram que o tipo antigênico original (CPV2) tem sido substituído, durante o período de 1979 a 1981, por uma variante antigênica ou biotipo (CPV2a), que difere da linhagem original em três regiões do código genético por um capsídeo proteico VP2 (13, 14). Um segundo biotipo (CPV2b) surgiu em meados de 1984 e a única diferença significativa do CPV2a era a substituição de um aminoácido (Asn – Asp) na proteína VP2 (13, 14). Hoje, ambos os biotipos têm substituído a linhagem original CPV2 por toda a população canina em todo o mundo. Em particular no Reino Unido, Austrália e Itália o biotipo CPV2a é mais comum do que o biotipo CPV2b; na Alemanha e Espanha os dois biotipos parecem estar distribuídos similarmente; e, em contraste, o CPV2b parece ser mais comum nos Estados Unidos (6, 8, 10).

Uma pergunta importante diz respeito ao significado clínico e imunológico da variação antigênica do CPV2. Anteriormente, experimentos não demonstraram nenhuma relevância significativa das mudanças antigênicas relativas à habilidade do CPV2 vacinal em proteger cães contra infecção (1, 9). Além disso, um estudo preliminar mostrou uma

reatividade cruzada unidirecional (CPV2b – CPV2) dos soros de filhotes inoculados com vírus vacinal vivo e modificado CPV2 ou CPV2b (17).

O objetivo deste estudo foi comparar os títulos de anticorpos neutralizantes de dois grupos de cães inoculados, respectivamente, com vírus vacinal vivo e modificado CPV2 ou CPV2b. Nossos resultados propõem questões relativas à interpretação de dados sorológicos, especialmente aqueles obtidos pelos testes da inibição da hemaglutinação (HI), relativos ao estado imune dos filhotes.

MATERIAL E MÉTODOS

(i) Vacina CPV2

Utilizou-se uma vacina com o vírus CPV2 vivo e modificado (linhagem ISS 17/18) (3) com um título de cultura tecidual de $10^{5.50}$ e dose infectante (TCID₅₀)/ml. O vírus foi cultivado em linha de células de crescimento A-72 canina em DMEM (Dulbecco minimal essential medium) suplementado com 10% de soro fetal de bovino.

(ii) Vacina CPV2b

Utilizou-se uma vacina com vírus vivo e modificado CPV2b (linhagem 29/97-40) (5) com um título de $10^{4.50}$ TCID₅₀. O vírus foi cultivado em linha de células renais felinas Crandel de crescimento (CrFk) em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino.

(iii) Titulação do vírus

O teste de titulação do vírus foi realizado em placas de microtitulação. Dez diluições de cada vírus foram preparadas em quadruplicatas em DMEM e misturadas com 50 ul de suspensão contendo 200,000 células A-72 para vacina CPV2 e 200,000 células CrFK para

vacina CPV2b. As placas foram incubadas por 5 dias à 37°C em uma atmosfera de CO₂ umidificada. As placas foram, então, congeladas e descongeladas por três vezes e o sobrenadante de cada uma foi testado para atividade de hemaglutinação CPV (HA) utilizando 1% de eritrócitos de porco. Foi definido o ponto de 50% de atividade de hemaglutinação utilizando fórmula de Kärber.

Procedimentos Experimentais

Trinta e seis filhotes, de 9 a 10 semanas de idade, de sete ninhadas diferentes, foram aleatoriamente divididos em dois grupos (A e B) e acondicionados em acomodações separadas e isoladas. Os filhotes de cada grupo foram manipulados por pessoas diferentes. Todos os filhotes tinham sorologia negativa para CPV no momento da vacinação, determinada pelos testes HI e de neutralização (Nt). Os filhotes do grupo A (n=18) foram inoculados por via subcutânea com 1 ml da vacina CPV2 e os filhotes do grupo B (n=18) receberam 1 ml da vacina CPV2b. Após trinta dias da vacinação, o título de anticorpo de cada filhote foi avaliado pelos teste HI e Nt, utilizando ambos os vírus CPV2 e CPV2b. Nenhuma doença foi observada em qualquer filhote durante todo o estudo.

(i) Amostras sorológicas. Teste HI

O teste HI foi realizado em temperatura de 4°C utilizando 1% de eritrócitos de porco e 8 unidades HA de CPV2 (linhagem 17/80 ISS) ou CPV2b (linhagem 29/97-40). Duas diluições seriadas do soro foram realizadas em solução fosfatada tamponada (pH 7,2), começando com uma diluição de 1:10. Os títulos expressos foram aqueles referentes à diluição sérica mais alta capaz de inibir completamente a HA e as médias geométricas foram também calculadas.

(ii) Teste Nt

Duas diluições seriadas (começando com 1:10) de cada soro em DMEM foram misturadas com 50 μ l de uma suspensão do vírus contendo de 100 a 300 TCID₅₀ de CPV2 (linhagem 17/80 ISS) ou CPV2b (linhagem 29/97-40). Após uma hora de incubação à temperatura ambiente, 100 μ l de uma suspensão contendo 200,000 células A-72 para CPV2 e 200,000 células CrFK para CPV2b foram adicionadas à cada diluição. As placas foram incubadas à 37°C em uma atmosfera de CO₂ umidificada, durante 5 dias e o vírus foi, então, detectado utilizando o teste HA, como descrito acima para titulação do vírus. Os títulos de anticorpos neutralizantes foram calculados referentes a uma diluição sérica mais alta que neutraliza completamente o vírus (ausência de atividade HA). As médias geométricas de cada grupo (A e B) também foram calculadas.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o teste de análise de variância ONE WAY Kruskal-Wallis

RESULTADOS

Os resultados dos testes HI realizados nos soros dos filhotes inoculados com CPV2 (grupo A) ou CPV2b (grupo B) estão reportados nas Tabela 1 e 2, respectivamente. Para os cães inoculados com CPV2 (grupo A) (Tabela 1), a média geométrica do título de anticorpo homólogo foi de 1,950 e a média do título heterólogo foi 1,138 e esta diferença é estatisticamente significativa ($p = 0,036$). Para cães inoculados com CPV2b (grupo B) (Tabela 2), as médias homólogas e heterólogas foram, respectivamente, 3,475 e 2,655; a diferença não é estatisticamente significativa ($p = 0,108$).

Os títulos Nt de anticorpo dos filhotes inoculados com CPV2 (grupo A) ou CPV2b (grupo B) estão mostrados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Em geral, títulos mais altos foram observados em filhotes inoculados com CPV2b. A média geométrica dos títulos de anticorpos homólogos para filhotes no grupo A (Tabela 3), inoculados com CPV2, foi 4,732, enquanto a média do título heterólogo foi 162, a qual é estatisticamente significativa ($p < 0,01$). Filhotes do grupo B (Tabela 4), inoculados com CPV2b, tiveram uma média do título homólogo de 1,138 e a média do título heterólogo foi de 940, a qual não é estatisticamente significativa ($p = 0,184$).

DISCUSSÃO

Vacinas efetivas são geralmente válidas para a prevenção da infecção pelo CPV2. Ambas as vacinas de vírus vivo modificado ou inativado CPV2 têm demonstrado apresentar a habilidade de imunizar filhotes com eficiência. Vacinas inativadas, todavia, proporcionam apenas uma pequena imunidade contra a infecção. Cães podem apresentar infecção subclínica mesmo estando protegidos por vários meses contra várias doenças (15). Em contraste, vacinas com vírus vivo modificado têm protegido cães por até 2 a 3 anos.

Estudos prévios (4, 15, 16) demonstraram que filhotes com títulos HI $> 1:80$ são imunes ao desafio oronasal CPV2. Nestes estudos, doença clínica não foi observada, o vírus não foi recuperado de espécimens fecais e respostas sorológicas ativas não foram verificadas após o desafio. Por outro lado, filhotes com títulos HI $< 1:40$ tornaram-se infectados subclínicamente, com o vírus encapsulado e as respostas de anticorpos indicaram infecção ativa.

Os resultados destes estudos levantaram questões intrigantes sobre a significado clínico do biotipo antigênico CPV, quais sejam (i) os testes sorológicos utilizados para o diagnóstico e (ii) a imunidade atual dos cães vacinados, considerando que a maioria das

vacinas CPV licenciadas são produzidas à partir do vírus (CPV2) com a estrutura antigênica original.

O teste HI utilizando CPV2 como antígeno é atualmente empregado na maioria das investigações para mensurar títulos de anticorpo para CPV, desde que este teste tem sido correlacionado com o grau de imunidade para CPV2. Entretanto, os resultados apresentados aqui e nossa experiência de campo indicam que o teste HI, diferentemente do teste Nt, nem sempre detecta diferenças em quantidade de anticorpo contra o vírus homólogo (CPV2) ou o vírus heterólogo (CPV2b). Em contraste, utilizando o teste Nt, os títulos de anticorpo de filhotes vacinados com CPV2 foram muito maiores para o vírus homólogo (CPV2) do que para o vírus heterólogo (CPV2b). Estes achados sugerem que os valores de anticorpo HI utilizando um antígeno CPV2 não permitem um prognóstico real em idade muito precoce, na qual os filhotes estariam se tornando susceptíveis à infecção por CPV ou receptivos à imunização. Em vários casos nos quais nós investigávamos filhotes com títulos HI 1:160 a 1:320 para CPV2 e que não haviam sido vacinados, pois eram considerados protegidos, estes desenvolveram parvovirose causada por CPV2b pouco depois da avaliação sorológica ter sido realizada (C. Buonavoglia, dados não publicados). Estes achados inspiraram este estudo.

Outra questão se refere a real imunidade conferida pela vacina de CPV2 contra os biotipos CPV2a e CPV2b, atualmente circulantes pela população de cães. Nossos resultados (obtidos pelos testes sorológicos e sem os ensaios desafios) revelaram que filhotes inoculados com a vacina CPV2 tiveram maiores títulos Nt de anticorpos para o vírus homólogo (CPV2) do que para o vírus heterólogo (CPV2b). Em contraste, filhotes inoculados com a vacina CPV2b tiveram títulos Nt de anticorpos para ambas os virus.

A despeito do problema sorológico observado neste estudo, este pode não ser crítico, pois, no campo, são raras as infecções documentadas do parvovírus decorrentes de falhas

vacinais CPV2, como consequência de um baixo grau de imunidade em cães contra o vírus heterólogo. Filhotes vacinados com CPV2 possuem anticorpos contra o vírus heterólogo, os quais, provavelmente, estão em níveis que continuam suprindo imunidade completa ou parcial para filhotes de 2 a 4 meses de idade, período este onde eles estão mais susceptíveis a infecções por CPV. Todavia, há evidências que sugerem que uma proteção satisfatória pode não ser provida se as vacinas CPV2 são utilizadas, considerando que (i) o CPV2 original desapareceu da população canina por todo o mundo e (ii) a vacina CPV2 parece conferir uma imunidade mais baixa e de menor duração contra o biotipo CPV2b. Como sugerido em 1982, “vacinas mais efetivas que induzem imunidade duradoura contra infecções devem ser solicitadas para controlar a propagação do parvovírus canino” (15).