

## IMUNOGENICIDADE DE UMA VACINA INATIVADA CONTRA O *Senecavirus A* EM CAMUNDONGOS BALB/cByJ

AMANDA DE OLIVEIRA BARBOSA<sup>1</sup>; DANIELLE GAVA<sup>2</sup>; ANA PAULA ALMEIDA BASTOS<sup>2</sup>; LEONARDO CLASEN RIBEIRO<sup>1</sup>; REJANE SCHAEFER<sup>2</sup>; MARCELO DE LIMA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [barbosa.oamanda@gmail.com](mailto:barbosa.oamanda@gmail.com); [leonardo.clasen@gmail.com](mailto:leonardo.clasen@gmail.com)

<sup>2</sup>Embrapa Suínos e Aves – [danielle.gava@embrapa.br](mailto:danielle.gava@embrapa.br); [ana.bastos@embrapa.br](mailto:ana.bastos@embrapa.br); [rejane.schaefer@embrapa.br](mailto:rejane.schaefer@embrapa.br)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [mdelima.ufpel@gmail.com](mailto:mdelima.ufpel@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

O *Senecavirus A* (SVA) é um vírus não envelopado com genoma composto por RNA de fita simples e sentido positivo que causa doença vesicular em suínos (VENKATARAMAN *et al.*, 2008). As lesões geralmente se desenvolvem no focinho, cavidade oral e patas dos animais acometidos, o que pode reduzir a conversão alimentar e levar a queda no ganho de peso diário devido à diminuição do consumo de ração pelos animais doentes (MONTIEL *et al.*, 2016). Além da questão produtiva, as lesões ocasionadas pela infecção pelo SVA podem ser confundidas com outras doenças vesiculares de suínos, como a febre aftosa, o que requer notificação ao Serviço Veterinário Oficial.

Surtos de doença vesicular causados pelo SVA têm sido reportados em diversos estados brasileiros desde 2014 (VIEIRA *et al.*, 2022) e, considerando os impactos negativos causados pelo agente na cadeia suinícola, o desenvolvimento de vacinas é uma estratégia importante para a segurança sanitária e econômica do setor. Atualmente, há apenas uma vacina comercialmente disponível contra SVA no Brasil, porém, informações sobre sua composição, eficácia e proteção não estão disponíveis na literatura.

Estudos com vacinas inativadas (YANG *et al.*, 2018; BUCKLEY; LAGER, 2022; LI *et al.*, 2022), atenuadas (SHARMA *et al.*, 2019), de subunidades (MU *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2023) e recombinantes (TAO *et al.*, 2023) têm demonstrado resultados promissores. A maioria das avaliações de candidatos vacinais foram realizadas em suínos. No entanto, Li *et al.* (2022) utilizaram camundongos Balb/c como modelo experimental para avaliar a imunogenicidade e eficácia de uma vacina inativada contra o SVA.

O uso de modelos murinos em ensaios pré-clínicos de vacinas permite a avaliação da imunogenicidade da cepa escolhida, da toxicidade da formulação e proteção induzida pela vacina (ORME, 2005). Além disso, camundongos são animais de pequeno porte e de fácil manutenção e o uso desses modelos pode reduzir custos e o número de suínos necessários para os ensaios clínicos posteriores.

Em relação ao SVA, estudos prévios demonstraram que camundongos são suscetíveis à infecção pelo vírus (KNOWLES *et al.*, 2006; JOSHI *et al.*, 2016), o que torna possível a realização de desafio para avaliação completa da eficácia da formulação testada. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a imunogenicidade de uma vacina inativada contra o *Senecavirus A* em camundongos BALB/cByJ.

### 2. METODOLOGIA

Os experimentos foram conduzidos na Embrapa Suínos e Aves, sob a aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais em Experimentos (CEUA)

da Unidade, processo número 15/2021. A cepa vacinal foi selecionada após a análise de 51 sequências do SVA de isolados de 8 estados do Brasil no período de 2018 até 2021, e cedidas pelo Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO-LFDA/MG). As amostras estão registradas no Sistema Nacional do Patrimônio Genético (SISGEN), cadastro de acesso número AFFB5D4. A seleção foi realizada pelo algoritmo PARNAS (MARKIN *et al.*, 2023) que possibilita a identificação da cepa mais representativa em uma árvore filogenética. A cepa viral escolhida, amostra\_12|Brazil|GO|2019, abrange até 98% da diversidade genética encontrada nas sequências brasileiras utilizadas.

A amplificação e titulação viral foram realizadas em células H1299 (*human non-small cell lung carcinoma cell*) cultivada em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 2 mM de L-Glutamina, Penicilina (100 U/mL) e Estreptomicina (100 µg/mL). O título viral utilizado na vacina foi escolhido com base no estudo de LI *et al.* (2022), que avaliou formulações vacinais contra SVA com títulos de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  TCID<sub>50</sub>. O título escolhido,  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/100 µL, resultou em maior nível de anticorpos neutralizantes e ausência de excreção viral pós-desafio em camundongos Balb/c.

Para produção da vacina, a suspensão viral foi inativada com etilenimina binária (BEI) sob agitação e temperatura de 37 °C por 8 h, conforme descrito por Bahnemann (1990). O vírus inativado foi emulsionado com o adjuvante, MONTANIDE™ ISA 201 VG, no volume 55:45, de acordo com a recomendação do fabricante.

Para avaliação pré-clínica da vacina inativada, cinquenta fêmeas de camundongos linhagem Balb/cByJ (6-8 semanas de idade), criadas em condições livres de patógenos específicos, foram divididas de forma aleatória em 5 grupos, descritos na tabela 1.

**Tabela 1:** Grupos experimentais, seus respectivos tratamentos e realização ou não de desafio com vírus homólogo na avaliação de imunogenicidade de uma vacina inativada contra o SVA em camundongos Balb/cByJ.

GRUPOS	TRATAMENTOS	DESAFIO
G I	Controle negativo: Sem vacinação (RPMI, IM)	Não
G II	Controle do desafio: Sem vacinação (RPMI, IM)	Sim <sup>a</sup>
G III	Vacina ( $10^7$ TCID <sub>50</sub> /100 µL + ISA 201 VG, IM)	Não
G IV	Vacina ( $10^7$ TCID <sub>50</sub> /100 µL + ISA 201 VG, IM)	Sim <sup>a</sup>
G V	Controle do adjuvante (RPMI + ISA 201 VG, IM)	Não

<sup>a</sup> SVA (amostra\_12|Brazil|GO|2019) título  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/100 µL, 100 µL via oral nos 36 dpv.

Os animais receberam duas doses de vacina via intramuscular (IM), com intervalo de 15 dias, sendo a primeira dose aplicada no dia experimental 0. Nos dias 0, 15, 36 e 41 pós-vacinação (dpv) foram feitas coletas de sangue por punção no plexo retro orbital para avaliação da resposta humoral. Aos 36 dpv, os animais dos grupos GII e GIV foram desafiados com 100 µL ( $10^7$  TCID<sub>50</sub>/100 µL) da suspensão viral por via oral em laboratório com nível de biossegurança 3 (NB3). Os animais foram monitorados diariamente durante todo o experimento. Para realização dos procedimentos de vacinação e coletas de sangue, os animais foram sedados com 0,02 mL de solução preparada com 1:1,5 de cetamina (10%) e xilazina (2%), respectivamente, por via intraperitoneal (IP). Aos 41 dpv todos os animais foram eutanasiados com superdosagem de anestésico por via IP.

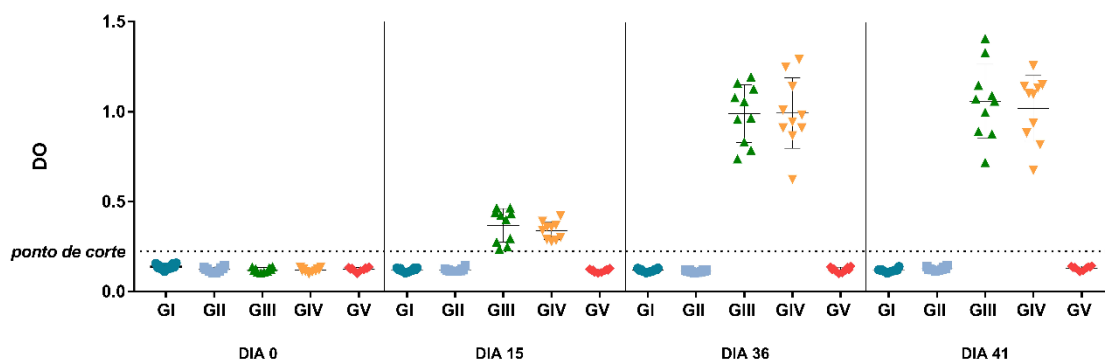
Para avaliação da resposta humoral, as amostras de sangue foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 min e os soros colhidos foram avaliados em um teste de ELISA. Resumidamente, placas de 96 poços (ref. 9017, Corning®) foram sensibilizadas com 100 µL/poço de vírus (SVA Amostra\_12|Brazil|GO|2019), título  $10^{7,5}$  TCID<sub>50</sub>/mL, diluído 1:100 em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M e pH 9,6) em câmara úmida a 4 °C, *overnight*.

Para realização do teste, as placas foram incubadas com 100 µL/poço dos soros diluídos 1:20 em solução de diluição (PBS + 0,05% Tween 20 + 1% de BSA). Em seguida, as placas foram incubadas com o conjugado (*Rabbit Anti-Mouse IgG(H+L)-HRP*, SouthernBiotech) na diluição 1:5000. As incubações foram realizadas em câmara úmida a 37 °C por 1 hora e foram realizadas 3 lavagens (PBS + 0,05% Tween 20) entre cada etapa. Por fim, 100 µL/poço da solução reveladora (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina ref. T2885, Sigma-Aldrich®) foram adicionados. A reação de revelação foi parada com a adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico (2 M) após 15 minutos. As placas foram lidas em espectrofotômetro, filtro 450 nm, para determinação da densidade ótica (DO).

Os valores da DO dos soros colhidos no dia 0, comprovadamente negativos para anticorpos contra SVA por ensaio de soroneutralização (dados não mostrados), foram utilizados para o cálculo de ponto de corte. Foram considerados positivos, soros de animais com DO maior que 0,225, calculado conforme descrito por Frey, Di Canzio e Zurakowski (1998).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais não apresentaram mudanças no padrão de comportamento e nem reações adversas à vacinação durante o experimento. Através do ELISA *in house*, considerando o ponto de corte estabelecido (OD de 0,225), foi possível detectar a presença de IgG nos camundongos vacinados a partir dos 15 dpv (Gráfico 1).



**Gráfico 1:** Gráfico de dispersão com os valores referentes à detecção de anticorpos IgG totais contra SVA no soro de camundongos por ensaio de ELISA *in house* nos dias 0, 15, 36 e 41 pós vacinação. Os valores estão apresentados de forma individual para cada animal, no seu respectivo grupo de tratamento. A média e  $\pm$  o desvio padrão estão representados pela linha preta atrás dos valores.

A média da DO dos grupos vacinados (GIII e GIV) foi 2,94 vezes superior à dos grupos não vacinados (GI, GII e GV) no dia 15 e 8,37 vezes superior no dia 36, indicando que os animais soroconverteram à vacinação. Comparando os resultados obtidos no dia 15 (referentes apenas à 1ª dose) e no dia 36 (referentes ao protocolo de vacinação completa), o valor da DO do dia 36 é 2,84 vezes superior, indicando que a segunda dose conferiu uma resposta humoral robusta.

Nenhum animal do GII (não vacinado e desafiado) foi considerado positivo nos 41 dpv. Embora os animais tenham sido desafiados com alta carga viral nos

36 dpv, a coleta de sangue e eutanásia foram realizadas 5 dias após o desafio, não sendo possível a detecção dos anticorpos da classe IgG, que são detectáveis mais tardiamente.

A produção de IgG é um importante indicativo de proteção imunológica. Em relação ao SVA, a resposta humoral é correlacionada com a resolução da doença clínica em suínos (MAGGIOLI *et al.*, 2016). Em camundongos, apesar de ter sido realizado desafio com vírus homólogo, cabe salientar que a espécie se infecta com o SVA, porém, não demonstra sinais clínicos (JOSHI *et al.*, 2016). Dessa forma, a relação entre resposta imune humoral e proteção será melhor estabelecida quando correlacionada com os dados de imunidade celular e carga viral em tecidos (experimentos em execução).

### 3. CONCLUSÃO

A vacina inativada contra o SVA, elaborada com uma cepa vacinal representativa da diversidade genética dos isolados brasileiros, foi segura e imunogênica em camundongos BALB/cByJ, sendo uma formulação promissora para avaliação em suínos.

### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAHNEMANN, H. G. Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. **Vaccine**, v. 8, n. 4, p. 299-303, 1990.
- BUCKLEY, A.; LAGER, K. Efficacy of an inactivated Senecavirus A vaccine in weaned pigs and mature sows. **Vaccine**, v. 40, n. 12, p. 1747–1754, 2022.
- FREY A, DI CANZIO J, ZURAKOWSKI D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **J Immunol Methods**, v. 221, n 1-2, p. 35-41, 1998.
- JOSHI L. R. et al. Detection of the Emerging Picornavirus Senecavirus A in Pigs, Mice, and Houseflies. **J Clin Microbiol**. 2016.
- KNOWLES, N. J. et al. Epidemiology of Seneca Valley virus: identification and characterization of isolates from pigs in the United States. **Northern Lights EUROPIIC**, 2006.
- LI, N. et al. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of a novel Senecavirus A strain-based inactivated vaccine in mice. **Research in Veterinary Science**, v. 142, p. 133–140, 2022.
- MAGGIOLI M. F. et al. Persistent Infection and Transmission of Senecavirus A from Carrier Sows to Contact Piglets. **Journal of Virology**, v. 93, n. 21, 2019.
- MARKIN A., et al. PARNAS: Objectively Selecting the Most Representative Taxa on a Phylogeny, **Systematic Biology**, 2023.
- MONTIEL, N. et al. Vesicular disease in 9-week-old pigs experimentally infected with senecavirus A. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, p. 1246–1248, 2016.
- MU, S. et al. Potent Protective Immune Responses to Senecavirus Induced by Virus-Like Particle Vaccine in Pigs. **Vaccines**, v. 8, n. 3, p. 532, 2020.
- ORME, I. M. The use of animal models to guide rational vaccine design. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 5–6, p. 905-910, 2005.
- SHARMA, B. et al. A Novel Live Attenuated Vaccine Candidate Protects Against Heterologous Senecavirus A Challenge. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.
- VENKATARAMAN, S. et al. Structure of Seneca Valley Virus-001: an oncolytic picornavirus representing a new genus. **Structure**, v. 16, p. 1555-1561, 2008.
- VIEIRA, M.V., et al. The third wave of Seneca Valley virus outbreaks in pig herds in southern Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 53, p. 1701–1706, 2022.
- YANG, F. et al. Immunogenicity and protective efficacy of an inactivated cell culture-derived Seneca Valley virus vaccine in pigs. **Vaccine**, v. 36, n. 6, 2018.