

AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DE VACINAS COMERCIAIS POLIVALENTES CONTRA A ENTEROTOXEMIA EM CAPRINOS¹

SEROLOGICAL EVALUATION OF POLYVALENT COMMERCIAL VACCINES AGAINST ENTEROTOXEMIA IN GOATS

J. L. A. VESCHI^{2*}, I. S. DUTRA³, M. A. B. ALVES³, S. H. V. PERRI³,
L. F. ZAFALON⁴, M. FERNANDEZ-MIYAKAWA⁵

RESUMO

Foram avaliadas as respostas sorológicas a cinco vacinas comerciais polivalentes que continham o toxóide épsilon do *Clostridium perfringens* tipo D na sua formulação. Para isso, foram utilizados 84 caprinos jovens, divididos aleatoriamente em seis grupos experimentais com 14 animais em cada grupo. Os caprinos do Grupo Controle não receberam nenhuma dose de vacina e os dos Grupos 1 ao 5 receberam duas doses de vacina com intervalo de quatro semanas entre elas. A primeira dose de vacina foi aplicada aos 45 (± 3) dias de vida dos animais (início do experimento - dia zero) e a segunda aos 75 (± 3 - dia 30). As amostras de sangue para a realização dos testes sorológicos foram colhidas antes (dia zero), e nos dias 30, 60, 90, 120 e 150 após o início do experimento. Utilizou-se a técnica de ELISA Indireto para quantificação dos anticorpos antitoxina épsilon do *C. perfringens* tipo D. De maneira geral ocorreu um aumento nos valores médios do título de anticorpos séricos dos caprinos no dia 60 em resposta às duas doses de vacina recebidas nos dias zero e 30, sendo que o maior número de animais considerados protegidos também foi detectado neste dia. Apenas cinco caprinos jovens do Grupo 1 e um do Grupo 3 permaneceram com títulos de anticorpos considerados protetores até o dia 150. Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que as vacinas avaliadas apresentaram baixa capacidade de estimular uma resposta imune protetora nos caprinos avaliados.

PALAVRAS-CHAVE: *Clostridium perfringens* tipo D. ELISA. Resposta imune. Toxóide épsilon. Vacinação.

SUMMARY

We evaluated the serological response of five commercial polyvalent vaccines containing epsilon toxoid of *Clostridium perfringens* type D. For this, 84 young goats were randomly divided into six groups, with 14 animals in each group. The goats in the Control Group were not vaccinated, while goats of Groups 1 to 5 received two vaccine shots four weeks apart. The first shot was administered when the goats were 45 (± 3) days old and the second at 75 (± 3). Blood samples for serological tests were collected on days zero, and 30, 60, 90, 120 and 150 after the start of the experiment. The Indirect ELISA technique was used to quantify the epsilon antitoxin antibodies for *Clostridium perfringens* type D. In general, the mean serum antibody titers of goats on day 60 increased as a response to the two vaccine shots received on days zero and 30. The largest number of animals considered protected was also detected on day 60, in response to the two vaccine shots. Only five animals from Group 1 and one goat from Group 3 displayed antibody titers that are considered protective up to 150 days after vaccination. Based on these results, we concluded that the evaluated vaccines showed poor ability of stimulate a protective immune response in the assessed goats.

KEY-WORDS: *Clostridium perfringens* type D. ELISA. Epsilon toxoid. Immune response. Vaccination.

¹ Projeto financiado pela FAPESP.

² Médico Veterinário - EMBRAPA Semiárido, BR 428, Km 152, Caixa Postal, 23, Petrolina, PE, Brasil, CEP 56302-690, Autor para correspondência: josir.veschi@embrapa.br

³ Médico Veterinário - UNESP - FMVA - Araçatuba, SP, Brasil.

⁴ Médico Veterinário - EMBRAPA Pecuária Sudeste - São Carlos, SP, Brasil.

⁵ Biólogo - INTA - CNIA; Depto. Biología; Buenos Aires, Argentina.

INTRODUÇÃO

A enterotoxemia, ou doença do rim polposo, é causada pelos efeitos da absorção intestinal da toxina épsilon, que é produzida pelo *Clostridium perfringens* tipo D (Uzal, 2004). Trata-se de uma enfermidade infecciosa não contagiosa das mais importantes dos caprinos (Uzal, et al., 2004). É reconhecida mundialmente por determinar grandes taxas de mortalidade em rebanhos de pequenos ruminantes.

Acomete animais em qualquer idade, entretanto a suscetibilidade é maior nos jovens (Uzal et al., 2003). A persistência do *C. perfringens* tipo D no ambiente deriva de casos anteriores de enterotoxemia ou da constante contaminação fecal por animais que apresentam o microrganismo na flora intestinal normal, fato que impossibilita a erradicação da doença, tornando as mediadas profiláticas de grande importância para o seu controle (Ehreth, 2003). Entretanto, a exposição natural dos caprinos à toxina épsilon não estimula, de maneira geral, a produção de anticorpos com magnitude para proteger os animais contra os desafios dessa toxina (Veschi et al., 2008).

Na profilaxia da enterotoxemia, duas medidas são ressaltadas como de grande importância: a vacinação sistemática de todos os animais do rebanho e o manejo nutricional adequado (Uzal & Kelly, 1998). Vacinas de alto poder imunogênico combinadas com estratégias eficientes de imunização, protegem os ovinos contra a enterotoxemia (Uzal et al., 1998). Entretanto, em caprinos, a vacinação usual produz títulos de anticorpos séricos mais baixos e de menor duração quando comparado com os produzidos pelos ovinos (Uzal & Kelly, 1999).

Lobato et al. (2010) avaliaram, em caprinos, a potencia de toxóide épsilon recombinante do *C. perfringens* tipo D expresso em *Escherichia coli* e concluíram que o mesmo produziu 14,3 UI/mL quando administrado 0,2mg no dia zero e uma dose de reforço 21 dias após.

Para Uzal et al. (1998) a proteção efetiva dos caprinos pode ser obtida quando se utiliza vacina com alto poder imunogênico em duas doses iniciais com quatro a seis semanas de intervalo entre elas. Entretanto, no Brasil, inexistem vacinas comerciais produzidas especificamente para proteger os caprinos, as formulações polivalentes, elaboradas para os bovinos e ou ovinos, são rotineiramente utilizadas. Visando verificar a resposta de antitoxinas beta e épsilon do *C. perfringens* tipo D, Lobato et al (2000) avaliaram a resposta imune em coelhos e bovinos de seis vacinas comerciais contra as clostridioses.

Diante da importância de se prevenir a ocorrência de enterotoxemia nos caprinos, a resposta sorológica de cinco vacinas comerciais polivalentes contendo o toxóide épsilon do *C. perfringens* tipo D na sua composição foram avaliadas, nessa espécie, pela técnica de ELISA Indireto em seis momentos distintos.

Foram utilizados 84 caprinos jovens (45 ± 3 dias de idade), filhos de cabras sem histórico de vacinações anteriores contra as clostridioses, das raças Saanen e Alpina, criadas em sistema de confinamento total em propriedade rural localizada no interior do Estado de São Paulo, Brasil. Os animais foram identificados individualmente e mantidos nas condições usuais de manejo da propriedade.

Os grupos foram formados ao acaso, de modo que cada um tivesse 14 animais. Foram utilizadas cinco vacinas comerciais polivalentes, que continham em sua formulação entre cinco e nove agentes, podendo ser bacterinas e/ou toxóides. As vacinas foram adquiridas em casas de produtos veterinários, e todas continham em sua formulação o toxóide épsilon do *C. perfringens* tipo D.

Os animais do grupo controle (GC) não foram vacinados, e os dos grupos 1 ao 5 (G1, G2, G3, G4 e G5) receberam duas doses de uma das vacinas utilizadas no experimento, com intervalo de quatro semanas entre elas, ou seja, a primeira dose no dia zero, e a segunda no dia 30. Utilizou-se a via subcutânea para a aplicação das vacinas e a dosagem foi a recomendada pelos fabricantes, para a utilização em ovinos.

As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia jugular utilizando agulhas descartáveis e tubos a vácuo em seis momentos distintos, ou seja, nos dias 0 (antes da primeira dose de vacina), 30 (antes da segunda dose de vacina), 60, 90, 120 e 150 dias após a vacinação, totalizando 504 amostras analisadas.

Para a avaliação da resposta imune humoral, utilizou-se a técnica de ELISA Indireto descrita por Uzal et al. (1997), com o valor de 0,25UI/mL arbitrariamente fixado por Uzal e Kelly (1998) como a quantidade mínima de anticorpos antitoxina épsilon necessário para proteger os caprinos contra os efeitos da toxina épsilon do *C. perfringens* tipo D. Todas as amostras de soro foram avaliadas em duplicata na micro-placa de ELISA.

Os dados obtidos foram transformados em log (x+1) e submetidos à análise de variância com medidas repetidas. As médias dos grupos foram comparadas pelo teste de Tukey e as médias dos momentos em relação ao momento zero pelo teste de Dunnett. Para verificar associação entre o status imunológico e os grupos foi utilizado o teste exato de Fisher. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$. As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa SAS (*Statistical Analysis System*).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A vacinação de caprinos, associada ao controle dos fatores predisponentes, são as medidas profiláticas indicadas para a prevenção da enterotoxemia, já que a erradicação desta enfermidade é impossível. Para Uzal et al. (1998) os caprinos necessitam de níveis séricos mínimos de 0,25UI de antitoxina épsilon/mL para estarem protegidos contra os desafios da enterotoxemia

MATERIAL E MÉTODOS

causada pela toxina épsilon do *C. perfringens* tipo D. Embora este valor tenha sido sugerido baseado nas observações de avaliações de vacinação e indução experimental da doença, ainda é desconhecido o seu real significado quando da ocorrência natural da enfermidade. No entanto, deveria servir de referência para os laboratórios produtores de vacinas comerciais, seguido das observações sobre o seu efeito no comportamento epidemiológico da doença e diante do desafio natural.

Na Tabela 1 são apresentados os valores médios da resposta sorológica dos caprinos jovens utilizados no experimento e avaliados nos diferentes momentos. As médias dos títulos de anticorpos dos caprinos do G1 diferiram das médias dos animais do GC a partir de 60 dias, quando analisados pelo teste de Tukey, demonstrando que esta vacina foi capaz de induzir a síntese de anticorpos, atingindo valores superiores a 0,25UI de antitoxina épsilon/mL, até o dia 120, o que é considerado adequado para a proteção do animal. No entanto, já ao dia 150 esses valores estavam abaixo do mínimo necessário, evidenciando uma proteção relativamente curta.

As médias dos títulos de anticorpos dos animais do G2 diferiram das médias do grupo controle nos dias 0 e 60 (30 dias após o reforço vacinal) o que indica que antes da vacinação os animais do G2 já apresentavam título superior aos do GC e que, embora, no dia 60 os níveis de antitoxina tenham sido maiores do que 0,25 UI/mL, a resposta induzida pela vacinação pode ser considerada inconsistente. Da mesma forma, a análise dos resultados do G3 mostra que antes da primeira dose da vacina, os animais desse grupo já apresentavam título de anticorpos maior do que do GC e que embora a vacinação tenha sido capaz de aumentar esse título, especialmente nos dias 60 e 90, esses não foram diferentes dos do GC e nem atingiram o mínimo de 0,25 UI/mL.

A análise dos títulos de anticorpos dos animais que receberam a vacina 4 (G4) também mostra resultados inconsistentes pois os títulos de antitoxina épsilon dos animais vacinados mostraram-se superiores

aos dos animais do GC antes da vacinação e nos dias 30 e 60, voltando a diminuir e se igualar ao controle a partir do dia 90. Observa-se também que esses valores nunca atingiram o mínimo considerado protetor.

Com relação aos caprinos que receberam a vacina 5 (G5), as médias dos seus títulos não mostraram-se diferentes das do GC em nenhum dos momentos avaliados. Embora as duas doses dessa vacina tenham sido capazes de aumentar o título de anticorpos nos dias 60 e 90, quando comparado ao dia zero no mesmo grupo, esse aumento pode ser considerado insuficiente para proteger os animais.

Na Tabela 2 estão registrados os números de caprinos jovens com título de anticorpos considerados protetores. De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, por ocasião da primeira avaliação sorológica, ou seja, aproximadamente 45 dias após o nascimento (dia zero), nenhum dos animais apresentou título considerado como protetor. Alguns caprinos responderam com títulos de anticorpos protetores 30 dias após a primeira vacinação, mas esses números não diferiram entre si segundo o teste de Fisher.

A análise do dia 60, ou seja, 30 dias após a aplicação da segunda dose de vacina, mostra que o número de animais protegidos aumentou nos grupos 1, 2 e 4 quando comparado com o GC, mas não entre si.

Considerando-se o exposto na Tabela 1, onde observa-se que a produção de anticorpos induzida pelas vacinas, de uma maneira geral, aumentou a partir do dia 60, ou seja, 30 dias após a aplicação da segunda dose de vacina (exceto para o G4, em que o aumento ocorreu já a partir do dia 30) e o constante na Tabela 2 que mostra que o número de animais considerados protegidos se elevou somente após o dia 60, reforça a importância de se utilizar duas doses iniciais de vacina em caprinos, como já demonstrado por Uzal e Kelly (1999) e Veschi et al. (2006), que observaram que os animais que receberam duas doses com intervalo de quatro semanas entre elas, apresentaram títulos mais elevados de anticorpos séricos do que os caprinos que receberam uma única dose de vacina.

TABELA 1 - Valores médios da resposta sorológica (UI/mL) de caprinos jovens vacinados com diferentes produtos comerciais (Grupo 1 ao Grupo 5) e do Grupo Controle (GC), avaliados pelo teste de ELISA-I em diferentes momentos.

Dia	Grupo (média ± desvio padrão)					
	GC	G1	G2	G3	G4	G5
0	0,086 ± 0,037 ^C	0,119 ± 0,023 ^{AB}	0,134 ± 0,029 ^A	0,123 ± 0,012 ^A	0,115 ± 0,031 ^{AB}	0,094 ± 0,018 ^{BC}
30	0,116 ± 0,052 ^B	0,168 ± 0,060 ^{AB}	0,148 ± 0,039 ^{AB}	0,123 ± 0,021 ^{AB}	0,175 ± 0,066 ^{*A}	0,126 ± 0,050 ^{AB}
60	0,115 ± 0,052 ^C	0,345 ± 0,127 ^{*A}	0,260 ± 0,142 ^{*AB}	0,182 ± 0,052 ^{*BC}	0,241 ± 0,096 ^{*AB}	0,188 ± 0,094 ^{*BC}
90	0,147 ± 0,116 ^{*B}	0,291 ± 0,134 ^{*A}	0,158 ± 0,067 ^B	0,218 ± 0,127 ^{*AB}	0,197 ± 0,067 ^{*AB}	0,153 ± 0,069 ^{*B}
120	0,120 ± 0,073 ^B	0,265 ± 0,131 ^{*A}	0,114 ± 0,060 ^B	0,181 ± 0,120 ^{AB}	0,163 ± 0,045 ^{*B}	0,126 ± 0,049 ^B
150	0,105 ± 0,066 ^B	0,205 ± 0,093 ^{*A}	0,096 ± 0,047 ^B	0,125 ± 0,075 ^B	0,107 ± 0,041 ^B	0,101 ± 0,043 ^B

*diferença significativa em relação ao dia 0 "Antes da vacinação" pelo teste de Dunnett (P<0,05).

^A médias seguidas de letras diferentes, na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

TABELA 2 - Número de caprinos jovens considerados protegidos (título de anticorpos acima de 0,25UI/mL) de um total de 14 animais/grupo, após a resposta de diferentes vacinas (G1-G5) e Grupo Controle (GC).

Dia	Número de animais protegidos					
	GC	G1	G2	G3	G4	G5
0	0	0	0	0	0	0
30	0 ^A	1 ^A	1 ^A	0 ^A	3 ^A	1 ^A
60	0 ^D	11 ^A	8 ^{AB}	2 ^{CD}	6 ^{ABC}	3 ^{BCD}
90	2 ^B	9 ^A	1 ^B	5 ^{AB}	2 ^B	2 ^B
120	2 ^B	8 ^A	0 ^B	3 ^{AB}	0 ^B	0 ^B
150	1 ^{AB}	5 ^A	0 ^B	1 ^{AB}	0 ^B	0 ^B

^A médias seguidas de letras diferentes, na linha, diferem entre si pelo teste exato de Fisher (P<0,05).

Em avaliação sorológica de seis vacinas comerciais contra as clostridioses realizada em bovinos por Lobato et al (2000), na determinação dos níveis de anticorpos antitoxina épsilon realizados aos 56 dias após a aplicação da primeira dose de vacina, somente duas formulações produziram níveis de anticorpos protetores detectáveis no teste. Resultados semelhantes aos encontrados em caprinos, no presente estudo quando comparamos com o dia 60, em que das cinco formulações avaliadas, somente três apresentaram níveis de anticorpos que podem ser considerados como protetores.

A partir do dia 90, a quantidade de animais protegidos apresentou uma tendência de diminuição em todos os grupos que receberam vacina, o que foi mais evidente em G2, G3 e G4. O fato de alguns animais do Grupo Controle apresentarem níveis protetores de anticorpos nos dias 90, 120 e 150 pode ser explicado pelo histórico de ocorrência de surtos de enterotoxemia no rebanho durante o período de realização do experimento. A presença de animais com títulos considerados protetores está de acordo com Veschi et al (2008) que relatam que caprinos não vacinados podem apresentar anticorpos naturais antitoxina épsilon, o que pode ser explicado pela presença do *C. perfringens* tipo D no trato intestinal, produzindo toxina épsilon em quantidade suficiente para induzir a produção de anticorpos, mas não necessariamente para proteger esses animais contra a doença e nem para desencadear a enfermidade (Uzal, 1997).

Uma hipótese que pode ser aventada para explicar a reduzida resposta sorológica das vacinas testadas seria que, por razões comerciais, os imunógenos contra as clostridioses vêm tendo as suas formulações alteradas, objetivando-se vacinas polivalentes e direcionadas para multi-espécies, o que certamente tem contribuído para reduzir a sua eficácia.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, em que cinco vacinas comerciais polivalentes contra a enterotoxemia foram avaliadas, pode-se

concluir que as mesmas apresentaram grande heterogeneidade com relação à capacidade de induzir a produção de anticorpos em caprinos, sendo que apenas uma delas foi capaz de induzir a produção de concentrações consideradas protetora por 120 dias. Desta forma recomenda-se cautela aos produtores de caprinos antes da aquisição de uma vacina contra a enterotoxemia causada por *C. perfringens* tipo D.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Sérgio Mahfuz, proprietário do Capril Rio Preto, São José do Rio Preto, SP por ter gentilmente cedido o seu rebanho para a realização deste experimento. E ao Prof. Dr. Francisco Alejandro Uzal pelas valiosas contribuições no delineamento experimental deste estudo.

REFERÊNCIAS

- EHRETH J. The value of vaccination: a global perspective. **Vaccine**, v.21, p.4105-4117, 2003.
- LOBATO, F. C. F.; LIMA, C. G. R. D.; ASSIS, R. A.; PIRES, P. S.; SILVA, R. O. S.; SALVARANI, F. M.; CARMO, A. O.; CONTIGLI, C.; KALAPOITHAKIS, E. Potency against enterotoxemia of a recombinant *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid in ruminants. **Vaccine**, v.28, p.6125-6127, 2010.
- LOBATO, F. C. F.; MORO, E.; UMEHARA, O.; ASSIS, R. A.; MARTINS, N. E. GONÇALVES, L. C. B. Avaliação da resposta de antitoxinas beta e épsilon de *Clostridium perfringens* induzidas em bovinos e coelhos por seis vacinas comerciais no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.4, 2000.

SAS Institute Inc., SAS OnlineDoc®, Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1999.

UZAL, F. A. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. **Anaerobe**, v.10, p.135-143, 2004.

UZAL, F. A. **Studies on enterotoxaemia in goats**, 1997. 164 f. Thesis (Doctor of Philosophy) - Division of Veterinary Pathobiology – School of Veterinary Science – The University of Queensland, Australia, 1997.

UZAL, F. A.; BODERO, D. A. V.; KELLY, W. R.; NIELSEN, K. Variability of serum antibody responses of goat kids to a commercial *Clostridium perfringens* epsilon toxoid vaccine. **The Veterinary Record**, v.143, n.17, p.472-474, 1998.

UZAL, F. A.; KELLY, W. R. Serum antibody response to a *Clostridium perfringens* epsilon toxoid vaccine in goats. **Anaerobe**, v.5, p.287-289, 1999.

UZAL, F. A.; KELLY, W. R. Protection of goats against experimental enterotoxaemia by vaccination with *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid. **The Veterinary Record**, v.142, n.26, p.722-725, 1998.

UZAL, F. A.; NIELSEN, K.; KELLY, W. R. Detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon antitoxin in serum of goats by competitive and indirect ELISA. **Veterinary Microbiology**, v.51, p.223-231, 1997

UZAL, F. A.; KELLY, W. R.; MORRIS, W. E.; BERMUDEZ, J.; BAISÓN, M. The pathology of peracute experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in sheep. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.16, p.403-411, 2004.

UZAL, F. A., KELLY, W. R.; THOMAS R.; HORNITZKY, M.; GALEA, F. Comparison of four techniques for the detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in intestinal contents and other body fluids of sheep and goats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.15, n.2, p.94-99, 2003.

VESCHI, J. L. A.; BRUZZONE, O. A.; LOSADA-EATON, D. M.; DUTRA, I. S. FERNANDEZ-MIYAKAWA, M. E. Naturally acquired antibodies against *Clostridium perfringens* epsilon toxin in goats **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.125 p.198–202, 2008.

VESCHI, J. L. A., DUTRA, I. S. MIYAKAWA, M. E. F., PERRI, S. H. V., UZAL, F. A. Immunoprophylactic strategies against enterotoxemia causes by *Clostridium perfringens* type D in goats. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, n.1, p.51-54, 2006.