

## Efeitos da vacinação contra brucelose e clostridioses sobre a resposta imune de bezerras leiteiras<sup>1</sup>

Bianca Souza Ferreira Albuquerque<sup>2</sup>, Hilton do Carmo Diniz Neto<sup>3</sup>, Mayara Campos Lombardi<sup>5</sup> Bárbara Pirone Pereira<sup>4</sup>, Vanessa Cominato<sup>2</sup>, Ana Keren do Carmo Ribeiro<sup>2</sup>, Gabrielle Oliveira Soares<sup>2</sup>, Raquel Paixão<sup>4</sup>, Sandra Gesteira Coelho<sup>3</sup>, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira<sup>6</sup>, Thierry Ribeiro Tomich<sup>6</sup>, Wanessa Araújo Carvalho<sup>6</sup>, Fernanda Samarini Machado<sup>6</sup>, Mariana Magalhães Campos<sup>6,7</sup>

<sup>1</sup>O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Parte da dissertação de mestrado do segundo autor.

<sup>2</sup>Graduanda em Medicina Veterinária – UFJF. Bolsista PIBIC CNPq

<sup>3</sup>Departamento de Zootecnia, Escola de Veterinária, UFMG/Belo Horizonte – MG

<sup>4</sup>Graduanda em Zootecnia – IF Sudeste MG. Bolsista PIBIC CNPq

<sup>5</sup>Departamento de Ciência Animal, Escola de Veterinária, UFMG/Belo Horizonte – MG

<sup>6</sup>Pesquisador Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG.

<sup>7</sup>Orientadora

**Resumo:** O objetivo do presente estudo foi avaliar duas estratégias de vacinação (simultânea ou não) contra brucelose e clostridioses sobre a resposta imune. Foram utilizadas 50 bezerras distribuídas aleatoriamente em três grupos (B, animais vacinados contra brucelose; C, vacinados contra clostridioses e BC, vacinados utilizando-se ambas). Foram realizadas coletas de sangue nos tempos 0 e 28 dias pós vacinação para análise da resposta imune celular (brucelose) e humoral (clostridioses). A média dos títulos de anticorpos neutralizantes contra a toxina épsilon de *C. perfringens* foi de 14,57 UI / mL no grupo C, maior que animais do grupo CB (9,20 UI / mL) ( $P = 0,03$ ). De forma similar, os animais do grupo CB também apresentaram títulos médios de anticorpos neutralizantes (1,44 UI / mL) contra a toxina C de *C. botulinum* inferiores aqueles observados no grupo C (4,92 UI / mL) ( $P = 0,03$ ). A vacinação simultânea contra brucelose e clostridioses resultou em decréscimo significativo nos títulos de anticorpos contra *Clostridium*. O mesmo efeito não foi observado na resposta imunológica celular à *Brucella*. O protocolo sanitário das propriedades deve ser alterado, de forma que a vacina contra brucelose e clostridioses devem ser realizadas separadamente.

**Palavras-chave:** protocolo sanitário, antígeno, *Brucella abortus*, *Clostridium*

### Effects of vaccination against brucellosis and clostridiosis on the immune response of dairy calves

**Abstract:** The aim of the present study was to evaluate two vaccination strategies (simultaneous or not) against brucellosis and clostridiosis on the immune response. Fifty calves were randomly assigned to three groups (B, animals vaccinated against brucellosis; C, vaccinated against clostridiosis and BC, vaccinated using both). Blood samples were taken at times 0 and 28 days after vaccination to analyze the cellular immune response (brucellosis) and humoral (clostridiosis). The mean titers of neutralizing antibodies against the epsilon toxin of *C. perfringens* was 14.57 IU / mL in group C, higher than animals in the CB group (9.20 IU / mL) ( $P = 0.03$ ). Similarly, animals in the CB group also had average neutralizing antibody titers (1.44 IU / mL) against *C. botulinum* toxin C lower than those seen in group C (4.92 IU / mL) ( $P = 0.03$ ). Simultaneous vaccination against brucellosis and clostridiosis resulted in a significant decrease in antibody titers against *Clostridium*. The same effect was not seen in the cellular immune response to *Brucella*. The health protocol of the properties must be changed, so that the vaccine against brucellosis and clostridiosis must be performed separately.

**Keywords:** health protocol, antigen, *Brucella abortus*, *Clostridium*

### Introdução

A brucelose é uma doença infecciosa de grande importância na bovinocultura de leite. É de caráter zoonótico, causada pela bactéria *Brucella abortus* e responsável por aborto no último trimestre de gestação, mortalidade perinatal e infertilidade, nas fêmeas, e orquite e infertilidade em machos (Poester et al., 2013). Como ferramenta para os programas de controle utiliza-se vacina viva atenuada, a B19, como o principal imunógeno. Já as clostridioses, também de origem infecciosa, são causadas por bactérias do gênero *Clostridium*, podendo afetar os bovinos com altas taxas de morbidade e letalidade, além de ser uma zoonose (Lobato et al., 2013). Como medida de prevenção são feitas vacinações com vacinas polivalentes, produzidas com toxinas inativadas.

Com o objetivo de facilitar o manejo e reduzir o estresse dos animais durante a vacinação, é comum a administração conjunta de diferentes vacinas, com diferentes antígenos, simultaneamente. Entretanto, os efeitos da administração simultânea na resposta imunológica, ainda não foi relatado pela literatura científica. Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar os efeitos da vacinação contra brucelose e clostridioses sobre a resposta imune de bezerras leiteiras.

### Material e Métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Embrapa Gado de Leite (nº 7194210316) e conduzido no Campo Experimental da Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brasil. Foram utilizadas 50 bezerras. Aos 120 dias de idade ( $\pm 7,6$  d), com peso médio de 105,2 kg ( $\pm 13,8$  kg), os animais foram aleatoriamente distribuídos em três grupos: B (n = 18) animais vacinados contra brucelose (B19- 2 mL subcutâneo); C (n = 14) vacinados contra clostridioses (Cultura inativada de *Clostridium chauvoei* e toxoides de *C. botulinum* tipo C e D, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. perfringens* tipo B, C e D e *C. sordelli*- 5 mL subcutâneo) e CB (n = 18) associação das vacinas para brucelose e clostridioses (2 mL e 5 mL subcutâneo, respectivamente).

Amostras de sangue foram coletadas mediante punção da jugular nos tempos 0 e 28 dias em relação à data da vacinação, em tubos sem anticoagulante que foram refrigerados e centrifugados. Alíquotas de soro (2 mL) foram armazenadas a -20 °C para posterior análise para mensuração de anticorpos. Além disso, amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo heparina mantidos em temperatura ambiente e transportados dentro de 24 horas para serem analisados no Laboratório de Bacteriologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para cultivo e proliferação celular.

Foram extraídos os leucócitos mononucleares de sangue periférico conforme descrito por Palmer et al. (1997). Posteriormente foi realizado ensaio de proliferação através da marcação das células com Carboxifluoresceína diacetato succinimidyl éster (CFSE) (Life Technologies, EUA), conforme as instruções do fabricante. Posteriormente foi realizado o cultivo de PBMC, em meio RPMI 1640 (Sigma, EUA), em placas de cultura de células de 48 poços (1 x 10<sup>6</sup> células / poço) (Corning, EUA) por 6 dias a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Para cada amostra animal, foram feitos cultivos celulares sem estimulação antigênica (controle negativo) e com estimulação através da incubação com 108 UFC / mL de *B. abortus*  $\gamma$ -irradiada, linhagem 2308. Adicionalmente, foi realizada estimulação antigênica com 2,5 e 5,0  $\mu$ g / mL de fito-hemaglutinina-P (PHA-P) (Medicago, Suécia) para controle positivo do ensaio. A viabilidade celular foi monitorizada por coloração com azul de tripano utilizando microscopia de luz.

Após o período de cultivo, as células foram recuperadas e marcadas com anticorpos anti-CD4 bovino e anti-CD8 bovino, conjugados com ficoeritrina (PE) e Alexa-Fluor 647 (mAb purchased from AbD Serotec, Raleigh, USA). Para análise dos

dados de citometria de fluxo foi utilizado o software FlowJo 7.6.1 (Tree Star, EUA).

Para *C. botulinum* tipo C, a determinação do nível de antitoxina nos soros foi realizada através da soroneutralização em camundongos (SNC), descrita pela Instrução Normativa nº 23 do MAPA (2002) e baseada na Farmacopeia Europeia (2017). Já para *C. perfringens* tipos D, a determinação do nível de antitoxinas épsilon foi realizada por soroneutralização em cultivo células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney cells – ATCC/CCL-34) como descrito em trabalhos anteriores (Silva et al., 2018).

A análise estatística para os dados de imunologia (anticorpos e citometria) foi utilizado o pacote Epicalc (Chongsuvivatwong 2012) do software R versão 3.0.1. Para todas as análises, valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### Resultados e Discussão

A média dos títulos de anticorpos neutralizantes contra a toxina épsilon de *C. perfringens* foi de 14,57 UI / mL no grupo C, maior que animais do grupo CB (9,20 UI / mL) ( $P = 0,03$  - Tabela 1). De forma similar, os animais do grupo CB também apresentaram títulos médios de anticorpos neutralizantes (1,44 UI / mL) contra a toxina C de *C. botulinum* inferiores aqueles observados no grupo C (4,92 UI / mL) ( $P = 0,03$  - Tabela 1). O Código de Regulamentos Federais (CFR) e pela Farmacopeia Europeia (2017) recomendam títulos  $\geq 2$  e 5 UI / mL contra as toxinas épsilon e botulínica tipo C, respectivamente, para aprovação de vacinas no teste de potência oficial. No presente estudo, todos os animais do grupo C apresentaram títulos superiores a esses valores contra toxinas épsilon, enquanto no grupo CB somente 66,6% dos animais ( $P = 0,13$  - Tabela 1). Em relação aos títulos contra toxinas tipo C, 42,8% dos animais do grupo C apresentaram resultados superiores à recomendação, enquanto no grupo CB somente 16,7% dos animais ( $P = 0,02$  - Tabela 1).

Esses resultados sugerem que a vacinação com a B19 interfere na resposta imune humoral da vacina contra clostridioses quando realizada simultaneamente. Com o objetivo de entender se há também interferência na resposta à vacina contra brucelose, foi realizada avaliação da resposta imune celular 28 dias após a vacinação, similar a estudos anteriores (Dorneles et al., 2015). Não foi observada diferença no percentual de linfócitos totais ( $P = 0.15$ ); linfócitos totais proliferados ( $P = 0.48$ ); linfócitos CD4+ ( $P = 0.46$ ); linfócitos CD4+ proliferados ( $P = 0.37$ ); linfócitos CD8+ ( $P = 0.88$ ) e linfócitos CD8+ proliferados ( $P = 0.09$ ) nos animais do grupo B e CB.

Esses resultados sugerem que a vacina contra brucelose interfere na resposta imune humoral dos antígenos clostridiais testados quando ambas vacinas são administradas simultaneamente. O contrário, porém, não parece ocorrer: a resposta à vacina B19 permanece inalterada mesmo com a administração simultânea da vacina contra clostridioses.

A redução das concentrações de anticorpos antitoxina épsilon de *C. perfringens* e antitoxina C de *C. botulinum* observada no tratamento CB possivelmente se deve ao perfil diferenciado de produção de citocinas por ambas as vacinas, quando aplicadas simultaneamente. A vacinação com B19 produz elevadas concentrações IFN- $\gamma$ , responsável em promover a diferenciação de células T CD4+ para o subgrupo Th1, com o objetivo de amplificar a resposta frente ao antígeno atenuado. Porém o IFN- $\gamma$  também é responsável em inibir a diferenciação de células Th2 (Abbas et al., 2015), o que pode ter comprometido a resposta à vacinação contra clostridioses.

**Tabela 1.** Títulos de anticorpos antitoxina C de *C. botulinum* e antitoxina epsilon de *C. perfringens* (UI/mL) dos animais do tratamento *Brucella* (B), *Clostridium* (C) e associação *Clostridium* + *Brucella* (CB)

Tratamentos <sup>1</sup>	Títulos de antitoxina C (UI/mL)			Títulos de antitoxina épsilon (UI/mL)		
	Média	EPM <sup>2</sup>	< 5 <sup>3</sup>	Média	EPM <sup>2</sup>	< 2 <sup>3</sup>
B	0 A	0	-	0 A	0	-
C	4,92 B	4,00	8 (57,14 %) A	14,57 B	7,62	0 (100 %) A
CB	1,44 C	2,00	15 (83,33 %) B	9,20 C	10,80	6 (33,33 %) B

Legenda: <sup>1</sup> Tratamentos: *Brucella* (B), *Clostridium* (C) e associação *Brucella* + *Clostridium* (CB); <sup>2</sup>EPM = erro padrão da média; <sup>3</sup> Número e porcentagem de animais com títulos de anticorpos  $\geq 2$  e 5 UI/mL contra toxina épsilon e botulínica tipo C, respectivamente, conforme recomendação do Código de Regulamentos Federais (CFR) e pela Farmacopeia Europeia (2017) para aprovação de vacinas no teste de potência oficial.

### Conclusões

A vacinação concomitante contra brucelose e clostridioses resultou em decréscimo significativo nos títulos de anticorpos contra *Clostridium*, o que resulta em animais não protegidos para essa afecção nas propriedades leiteiras. O mesmo efeito não foi observado na resposta imunológica celular à *Brucella*. O protocolo sanitário das propriedades deve ser alterado, de forma que a vacina contra brucelose e clostridioses devem ser realizadas separadamente. Entretanto, mais estudos são necessários para definir seguramente o tempo necessário entre a utilização de ambas as vacinas.

### Agradecimentos

Agradeço à Embrapa Gado de Leite pela oportunidade, ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Ciência Animal (INCT-CA), a Universidade Federal de Minas Gerais, a Universidade Federal de Juiz de Fora, a Embrapa- Gado de Leite em especial minha orientadora Mariana Magalhães Campos.

### Referências

- ABBAS., A.K. LICHTMAN, A.H. PILLAI. Shiv. Imunologia celular e molecular. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- DORNELES, E.M., G.K. LIMA, A. TEIXEIRA-CARVALHO, M.S. ARAÚJO, O.A. MARTINS-FILHO, N. SRIRANGANATHAN, H. AL QUBLAN, M.B. HEINEMANN, E A.P. LAGE. Immune response of calves vaccinated with *Brucella abortus* S19 or RB51 and revaccinated with RB51. PLoS One. 10, 2015.
- LOBATO, F.C.F., F.M. SALVARANI, L.A. GONÇALVES, P.S. PIRES, R.O.S. SILVA, G.G. ALVES, M. NEVES, C.A.O. JÚNIOR, E P.L.L. PEREIRA. Clostridioses dos animais de produção. Veterinária e Zootecnia. 20:29-48, 2013.
- PALMER, M.V., S.C. OLSEN, E N.F. CHEVILLE. Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in pregnant cattle. Am J Vet Res. 58:472-477, 1997.
- POESTER, F.P., L.E. SAMARTINO, E R.L. SANTOS. Pathogenesis and Pathobiology of brucellosis in livestock. Revue scientifique et technique. International Office of Epizootics. 32:105-115, 2013.
- SILVA, R.O.S, M.C. DUARTE, C.A. OLIVEIRA JUNIOR, R.A. A.M.Q. LANA, E F.C.F. Comparison of humoral neutralizing antibody response in rabbits, guinea pigs, and cattle vaccinated with epsilon and beta toxoids from *Clostridium perfringens* and *C. botulinum* types C and D toxoids. Anaerobe. 54:19-22, 2018.