

Artigo

Eficácia comparativa de vacinas intranasais e injetáveis na estimulação de respostas do anticorpo anamnóstico reativo à *Bordetella bronchiseptica* em cães domésticos

John A. Ellis, Sheryl P. Gow, Lindsey B. Lee, Stacey Lacoste, Eileen C. Ball

Resumo — A fim de determinar a eficácia comparativa de vacinas injetáveis e intranasais para estimular anticorpos anamnósticos reativos à *Bordetella bronchiseptica* (*Bb*), foi realizado um estudo utilizando 144 cães domésticos adultos de várias raças e idades, que receberam previamente a vacina intranasal contra *Bb* aproximadamente 12 meses antes do recrutamento. Os cães foram randomizado para 2 grupos e sangue, *swabs* nasais, e *swabs* faríngeos foram coletados antes da administração de vacina de componente único contra *Bb* por via intranasal ou parenteral. Dez a 14 dias depois, todos os cães foram reamostrados para medir mudanças no anticorpo sistêmico e local anti-*Bb*. Não houver diferenças nas mudanças na IgG sérica reativa à *Bb* e na IgA nasal entre os grupos, ao passo que os cães vacinados pela via intranasal apresentaram IgA sérica reativa à *Bb* significativamente maior. Estes dados indicam que a geração atual tanto de vacinas intranasais (viva modificada) e injetável (acelular) contra *Bb* podem estimular respostas do anticorpo anamnóstico local e sistêmico em cães domésticos adultos soropositivos para *Bb* vacinados anteriormente.

Résumé — Efficacité comparative des vaccins intranasaux et injectables pour stimuler les réponses des anticorps anamnóstiques réagissant à *Bordetella bronchiseptica* chez les chiens domestiques. Afin de déterminer l'efficacité comparative des vaccins injectables et intranasaux pour stimuler les anticorps anamnóstiques réagissant à *Bordetella bronchiseptica* (*Bb*), un essai a été réalisé à l'aide de 144 chiens domestiques adultes de diverses races et d'âges différents, auxquels l'on avait déjà administré le vaccin *Bb* intranasal environ 12 mois avant le recrutement. Les chiens ont été assignés au hasard à deux groupes et des échantillons sanguins, et écouvillons nasaux et pharyngés ont été prélevés avant l'administration de vaccins *Bb* à composant unique soit par voie intranasale ou parentérale. Dix à 14 jours plus tard, on a prélevé de nouveaux échantillons pour tous les chiens afin de mesurer les changements dans les anticorps systémiques et locaux pour *Bb*. Il n'y avait aucune différence au niveau des changements pour l'IgG sérique et l'IgA nasal réactif à *Bb* entre les groupes, tandis que les chiens vaccinés par voie intranasale présentaient un niveau significativement supérieur d'IgA sériques réactives à *Bb*. Ces données indiquent que les deux générations actuelles de vaccins *Bb* intranasal (vivant modifié) et injectable (acellulaire) peuvent stimuler les réponses locale et systémique des anticorps *Bb* chez les chiens adultes domestiques antérieurement vaccinés.

(Traduit par Isabelle Vallières)

Can Vet J 2017;58:809-815

Departamento de Microbiologia Veterinária (Ellis, Lacoste), Departamento de Ciências Clínicas de Animais de Grande Porte (Gow), Colégio Ocidental de Medicina Veterinária, 52 Campus Drive, Universidade de Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, S7N 5B4; Hospital Veterinário Thomas Crossroads, 32 Oak Hill Blvd, Newman Georgia 30265, USA (Lee); Zoetis, 100 Campus Drive Florham Park, Nova Jersey 07932, EUA (Ball).

Envie todas as correspondências para o Dr. John Ellis; e-mail: john.ellis@usask.ca

Declaração de conflito de interesse

Um dos autores (EB) é funcionário da Zoetis. A Zoetis não teve um papel direto na aquisição de dados, ou na análise dos dados. Nenhum dos autores tem qualquer outro relacionamento financeiro ou pessoal que pudesse influenciar inadequadamente ou afetar o conteúdo do trabalho.

O uso deste artigo é limitado a uma única cópia para estudo pessoal. Qualquer pessoa interessada em obter reimpressões deve entrar em contato com o escritório da CVMA (hbroughton@cvma-acmv.org) para solicitar cópias adicionais ou autorização para utilizar este material em outro lugar.

Introdução

Bordetella bronchiseptica (*Bb*) é uma bactéria Gram-negativa que é um de aproximadamente 12 patógenos causalmente associados com o complexo de doença respiratória infecciosa canina (CIRDC) (1). Várias vacinas parenterais e mucosas contra *Bb* estão disponíveis e têm sido frequentemente utilizadas nas práticas veterinárias por mais de 30 anos (2). Ao longo desse período, houve controvérsia sobre a eficácia relativa dessas vacinas em estimular respostas imunes protetoras primárias e em sua utilidade comparativa como “vacinas de reforço” (2).

Cofatores ambientais, como a exposição natural à *Bb*, que possam proporcionar um efeito “impulsionador” para respostas imunes iatrogenicamente preparadas provavelmente contribuem significativamente para a eficácia da vacina e duração da imunidade (DOI) em cães do próprio cliente (3,4). O envolvimento desses cofatores, incluindo a dose e a frequência da exposição à *Bb* em cenários como canis de acolhimento e operações de cuidado, é virtualmente impossível demonstrar em um cenário laboratorial, exigindo o uso de cães domésticos para melhor mensurar o *Gestalt* de imunidade à *Bb* e a outros patógenos. Por vários motivos, talvez mais particularmente as dificuldades logísticas relacionadas à participação e conformidade do dono, há poucos estudos que examinaram sequencialmente as respostas imunes às vacinas contra *Bb* em cães do mundo real (5). Nem existem muitos dados recentes relativos ao transporte de *Bb* em cães domésticos clinicamente normais, que pudessem afetar as respostas à vacinação e a DOI (6,7). O propósito deste estudo era estender os achados laboratoriais existentes relacionados à imunogenicidade das vacinas contra *Bb* comparando as respostas do anticorpo anamnóstico sistêmico e mucoso induzidas pela geração atual de vacinas de componente único contra *Bb* injetáveis ou intranasais em cães domésticos adultos que se apresentam para suas “vacinas de reforço” anuais.

Materiais e métodos

População do estudo e desenho experimental

Cães domésticos do próprio cliente clinicamente normais de várias idades e raças (Tabela 1) com histórico documentado de vacinação intranasal para *Bb* aproximadamente 1 ano antes do recrutamento (um intervalo comum e frequentemente recomendado entre as vacinações para *Bb*) (2) foram participantes, e tinham consentimento escrito do dono. Os donos foram questionados com relação ao estilo de vida de seus cães com relação às exposições potenciais a outros cães. Os pacientes foram randomizados em 2 grupos utilizando um gerador de números aleatórios computadorizado. Os cães do grupo 1 receberam uma única vacina injetável contra *Bb*; aqueles do outro grupo receberam uma única vacina intranasal. Quando havia 2 ou mais cães em uma casa, todos os cães recebiam o mesmo tratamento. Sangue venoso (para soro), *swabs* nasais (com ponta de poliéster estéril), e *swabs* faríngeos foram coletados no dia 0 antes da vacinação e novamente 10 a 14 dias depois. A coleta individual com *swabs* foi realizada em ambas as narinas, a esquerda primeiro e, então, na faringe profunda (incluindo a amígdala sempre que possível). Toda amostragem foi realizada longe dos donos, e cães agitados eram levemente sedados, se necessário. Somente a coleta de *swab* faríngeo foi realizada em cães com narinas estenóticas (isto é, muito pequenas para se introduzir o *swab*). Os *swabs* nasais foram colocados em 1 mL, e os *swabs* faríngeos em 2 mL, de meio de transporte e congelados a -20°C, então a -80°C antes da análise.

Vacinas

Vacinas de componente único injetáveis (Bronchicine; Zoetis, Parsippany, Nova Jersey, EUA) e intranasais (Vanguard B; Zoetis) *Bb* foram obtidas de um distribuidor.

Quantificação de anticorpos reativos à *Bb*

Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISAs) para medir IgG e IgA reativa à *Bb* foram realizados conforme descrito anteriormente (8) utilizando soros positivos e negativos de anticorpos anti-*Bb* e saliva como controles.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Uma PCR em tempo-real para *Bb* (e outros patógenos respiratórios; teste RealPCR código 2524; Idexx Reference Laboratories, Calgary, Alberta) foi realizada em *swabs* faríngeos profundos.

Análise estatística

Análises estatísticas foram realizadas utilizando um pacote de software comercial (SPSS Statistics 23.0; IBM, Markham, Ontário). As mudanças na IgG sérica reativa à *Bb*, IgA sérica, e IgA nasal entre a visita de recrutamento/vacinação e a visita de acompanhamento foram as 3 variáveis de resultado examinadas. Testes de Mann-Whitney U não paramétricos foram utilizados para determinar as diferenças entre os grupos de tratamento (9). Dados iniciais coletados da visita primária também foram utilizados para examinar a hipótese secundária de que as atividades que aumentam a probabilidade de interação com outros cães aumentam a chance de exposição natural à *Bb*, e subsequentemente proporcionam um efeito “impulsionador” para respostas imunes iatrogenicamente preparadas. Um escore foi criado para cada cão categorizando o risco potencial de exposição natural à *Bb* com base nas atividades (acolhimento, cuidado, etc.) que poderiam aumentar a interação com outros cães nos 12 meses anteriores ao início do estudo (Tabela 2). Essas categorias foram, então, somadas para cada cão a fim de criar um escore de risco total. O risco de exposição natural à *Bb* foi considerado maior para cães com um escore total maior para esses parâmetros. As relações entre a IgG ou IgA inicial e o escore de risco total para exposição natural à *Bb* foram examinadas utilizando uma correlação de Spearman (10).

Resultados

Um total de 144 cães foi recrutado entre 04 de setembro de 2014 e 28 de outubro de 2015. Setenta e sete cães foram aleatoriamente designados para o grupo de vacina injetável contra *Bb* e 67 para o grupo de vacina intranasal contra *Bb*. Antes do início do estudo, dados históricos revelaram que havia 22 cães no grupo de vacina injetável contra *Bb* que foram vacinados para *Bb* entre janeiro e novembro de 2013, e 55 cães vacinados entre janeiro e outubro de 2014. No grupo de vacina intranasal contra *Bb*, havia 16 cães vacinados entre julho e dezembro de 2013, 50 cães vacinados entre janeiro e outubro de 2014, e 1 cão em maio de 2012. Não houve diferença estatística nas datas de vacinação anterior entre os 2 grupos de tratamento ($P = 0,87$).

Também não houve diferença estatística entre a classificação por raça (grande, média, pequena) entre os 2 grupos de tratamento (Tabela 1, $P = 0,24$). Os cães do grupo de vacina injetável contra *Bb* e do grupo de vacina intranasal contra *Bb* também não foram diferentes um do outro quanto a quaisquer das outras variáveis potenciais de confusão exploradas (variáveis de exposição à *Bb*, Tabelas 2, 3 e anticorpos reativos à *Bb* iniciais, Tabela 4).

Tabela 1. Raças de cães categorizadas por grupo de tratamento e tamanho da raça

| Raças de cães | Grupo de tratamento | | | Raças | Grupo de tratamento | | |
|----------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------|-----------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------|
| | Vacina injetável contra <i>Bb</i> | Vacina intranasal contra <i>Bb</i> | Total | | Vacina injetável contra <i>Bb</i> | Vacina intranasal contra <i>Bb</i> | Total |
| Cães de raça grande | | | | Cães de raça pequena | | | |
| Alaskan malamute | 0 | 1 | 1 | Bichon frisé | 0 | 3 | 3 |
| American foxhound | 1 | 0 | 1 | Boston terrier | 0 | 1 | 1 |
| Boxer mix | 1 | 1 | 2 | Cairn terrier | 1 | 0 | 1 |
| Bullmastiff | 0 | 1 | 1 | Chihuahua | 1 | 1 | 2 |
| Dalmatian | 0 | 1 | 1 | Chihuahua mix | 1 | 0 | 1 |
| Doberman | 0 | 1 | 1 | Dachshund | 1 | 3 | 4 |
| Flat-coated retriever | 1 | 0 | 1 | Dachshund mix | 0 | 2 | 2 |
| Fox terrier (wire-haired) | 2 | 0 | 2 | Jack Russell terrier | 1 | 1 | 2 |
| German shepherd | 7 | 1 | 8 | Maltese | 0 | 1 | 1 |
| German shepherd mix | 0 | 2 | 2 | Maltese mix | 1 | 1 | 2 |
| Great Dane mix | 1 | 0 | 1 | Miniature dachshund | 1 | 0 | 1 |
| Greyhound | 0 | 1 | 1 | Miniature schnauzer | 3 | 0 | 3 |
| German shorthaired pointer | 0 | 1 | 1 | Papillon | 1 | 0 | 1 |
| Hound mix | 1 | 0 | 1 | Pekingese | 1 | 0 | 1 |
| Husky | 0 | 1 | 1 | Pomeranian | 1 | 0 | 1 |
| Husky mix | 0 | 1 | 1 | Pomeranian mix | 0 | 1 | 1 |
| Labrador | 3 | 8 | 11 | Poodle mix | 0 | 1 | 1 |
| Labrador mix | 2 | 0 | 2 | Pug | 0 | 1 | 1 |
| Old English sheepdog | 0 | 1 | 1 | Scottish terrier | 1 | 0 | 1 |
| Rhodesian ridgeback | 2 | 0 | 2 | Shih tzu | 3 | 4 | 7 |
| Schnauzer | 0 | 2 | 2 | Terrier mix | 3 | 1 | 4 |
| Weimaraner | 1 | 0 | 1 | Toy poodle | 1 | 2 | 3 |
| Total | 24 | 23 | 47 | West Highland terrier | 1 | 2 | 3 |
| | | | | West Highland terrier mix | 0 | 1 | 1 |
| Cães de raça média | | | | Welsh corgi | 2 | 0 | 2 |
| Australian shepherd | 1 | 0 | 1 | Welsh corgi mix | 1 | 0 | 1 |
| Australian shepherd mix | 1 | 0 | 1 | Yorkshire terrier | 2 | 1 | 3 |
| Basset hound | 0 | 2 | 2 | Yorkshire terrier mix | 1 | 0 | 1 |
| Beagle | 2 | 2 | 4 | Total | 28 | 27 | 55 |
| Beagle mix | 1 | 1 | 2 | | | | |
| Border collie | 0 | 1 | 1 | Sem classificação | | | |
| Brittany spaniel | 0 | 1 | 1 | Misturados | 14 | 5 | 19 |
| Cocker spaniel | 1 | 1 | 2 | | | | |
| Collie | 0 | 1 | 1 | | | | |
| French bulldog | 1 | 0 | 1 | | | | |
| King Charles spaniel | 1 | 0 | 1 | | | | |
| Pitbull | 1 | 1 | 2 | | | | |
| Pitbull Mix | 1 | 0 | 1 | | | | |
| Pointer Mix | 0 | 1 | 1 | | | | |
| Shar Pei | 1 | 0 | 1 | | | | |
| Shetland sheepdog | 0 | 1 | 1 | | | | |
| Total | 11 | 12 | 23 | | | | |

Em um subconjunto de cães, a IgG sérica reativa à *Bb* ($n = 9$ cães), a IgA sérica ($n = 12$ cães) e a IgA nasal ($n = 30$ cães) diminuíram entre a visita de recrutamento/ vacinação e as visitas de acompanhamento. Portanto, ao calcular a mudança nesses parâmetros em relação aos valores iniciais, um valor negativo foi obtido. Uma vez que é biologicamente menos provável ter uma diminuição nesses parâmetros no período de 10 a 14 dias entre a vacinação inicial e a visita de acompanhamento, houve incerteza quanto à melhor maneira de gerenciar esses dados. Para garantir que incluir ou excluir cães que apresentavam IgG, IgA séricas, e/ou IgA nasal menores após a vacinação não afetaria os resultados, os dados foram analisados utilizando-se 5 abordagens; cães que apresentavam uma IgG sérica menor na visita pós-vacinação excluídos, cães que apresentaram IgA sérica menor na visita pós-vacinação excluídos, cães que apresentavam uma IgA nasal menor na visita pós-vacinação excluídos, cães com IgG, IgA séricas ou IgA nasal na visita pós-vacinação excluídos e nenhum cão excluído. A interpretação das análises tanto para ambas as variáveis explanatórias ou resultados primários de interesse não mudaram independentemente do conjunto de dados utilizado; portanto, para abreviar, somente a

análise para todos os cães recrutados é apresentada.

As mudanças na IgG sérica reativa à *Bb* e na IgA nasal não foram significativamente diferentes entre os 2 tipos de vacinação (Tabela 5; Figuras 1, 2); ao passo que a mudança na IgA sérica reativa à *Bb* foi significativamente maior nos cães vacinados por via intranasal (mediana = 32, variação de -42 a 154) versus os cães injetados (mediana de 16, variação de -32 a 103) (Tabela 5; Figura 3) ($P = 0,007$).

Não houve associação estatística entre o escore total calculado de risco de estilo de vida para a exposição natural potencial à *Bb* e a IgG inicial ($P = 0,12$) ou a IgA ($P = 0,93$). Os swabs faríngeos de 4/101 cães de 2014 (3 vacinados com o produto injetável/1 vacinado com o produto intranasal) foram positivos para DNA de *Bb*. Devido à baixa predominância e às respostas iniciais e pós-vacinação variáveis, os dados do swab faríngeo não foram analisados adicionalmente.

Tabela 2. Categorização de fatores de risco potenciais por serem expostos naturalmente à *Bordetella bronchiseptica*

| Variáveis da exposição potencial à <i>Bordetella</i> | Categoria de risco da exposição à <i>Bordetella</i> |
|---|---|
| Acolhidos (últimos 12 meses) | |
| a. Nenhum | 0 |
| b. 1 vez | 1 |
| c. 1 a 2 vezes | 2 |
| d. 2 vezes | 3 |
| e. 2 a 3 vezes | 4 |
| f. 3 vezes | 5 |
| g. 3 a 4 vezes | 6 |
| h. > 4 vezes | 7 |
| i. Outros | 8 |
| Cuidados (últimos 12 meses) | |
| a. Nenhum | 0 |
| b. Mensalmente | 6 |
| c. Meses alternados | 5 |
| d. 4 a 5 vezes ao ano | 4 |
| e. 2 a 3 vezes ao ano | 3 |
| f. 1 vez ao ano | 2 |
| g. Outros (declarado regularmente, mas não especificado) | 1 |
| Outros fatores nos últimos 12 meses para o risco de exposição | |
| a. Nenhum | 0 |
| b. Parque para cães | 1 |
| c. Viagem com a família | 1 |
| d. Interação com outros cães | 1 |
| e. Adoção de outros cães (75 cães em uma casa) | 2 |

Discussão

Os resultados deste estudo ampliam nossas investigações anteriores relacionadas à imunogenicidade da geração atual de vacinas parenterais para *Bb* em cães, uma preparação de filtrado não adjuvantado acelular utilizada contra *Bordetella pertussis* (*Bp*) em humanos (5,10). Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a comparar a capacidade de vacinas injetáveis e intranasais de estimular respostas do anticorpo anamnóstico mucoso e sistêmico em uma grande coorte de cães domésticos adultos variavelmente soropositivos para *Bb* vacinados anteriormente por via intranasal.

Na medida em que não houve diferenças significativas na mudança nas respostas da IgG reativa à *Bb* no soro entre os grupos que receberam as vacinas injetáveis versus intranasais, esses resultados estão em contraste com um estudo anterior que documentou respostas do anticorpo sistêmico significativamente maiores, que se desenvolveram mais rapidamente em Beagles de laboratório adultos soropositivos para *Bb* vacinados por via parenteral em comparação com um grupo semelhante de cães vacinados por via intranasal (8). Esse estudo examinou uma bacterina adjuvantada com alume, de célula inteira; portanto, talvez não seja surpreendente que esta última vacina fosse aparentemente mais imunogênica uma vez que ela continha ordens de magnitude mais do antígeno proteico (5,8,10). Também, a bacterina de célula inteira continha mais e diferentes padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou "sinais de perigo" que provavelmente apresentavam atividade adjuvante (5,10,11,12) além da inclusão de hidróxido de alumínio.

Tabela 3. Contagens e valores de *P* associados para variáveis de exposição potencial à *Bordetella bronchiseptica*

| Variáveis da exposição à <i>Bordetella</i> | Grupo de tratamento | | Valor de <i>P</i> |
|--|---|--|-------------------|
| | Vacina injetável contra <i>Bb</i> Número de cães | Vacina intranasal contra <i>Bb</i> Número de cães | |
| Acolhidos (últimos 12 meses) | | | 0,98 |
| a. Nenhum | 21 | 17 | |
| b. 1 vez | 4 | 6 | |
| c. 1 a 2 vezes | 1 | 1 | |
| d. 2 vezes | 21 | 17 | |
| e. 2 a 3 vezes | 10 | 12 | |
| f. 3 vezes | 2 | 3 | |
| g. 3 a 4 vezes | 5 | 2 | |
| h. > 4 vezes | 7 | 5 | |
| i. Outros | 6 | 4 | |
| Total | 77 | 67 | |
| Cuidados (últimos 12 meses) | | | 0,87 |
| a. Nenhum | 47 | 40 | |
| b. Mensalmente | 6 | 5 | |
| c. Meses alternados | 8 | 9 | |
| d. 4 a 5 vezes ao ano | 4 | 7 | |
| e. 2 a 3 vezes ao ano | 6 | 4 | |
| f. 1 vez ao ano | 0 | 0 | |
| g. Outros (regularmente) | 6 | 2 | |
| Total | 77 | 67 | |
| Outros fatores de exposição (últimos 12 meses) | | | 0,64 |
| a. Nenhum | 67 | 60 | |
| b. Parque para cães | 2 | 1 | |
| c. Viagem com a família | 4 | 3 | |
| d. Interação com outros cães | 0 | 1 | |
| e. Adoção de outros cães | 4 | 2 | |
| Total | 77 | 67 | |
| Exposição potencial (1 mês antes da amostra) | | | 0,40 |
| a. Nenhum | 55 | 52 | |
| b. Acolhidos | 5 | 1 | |
| c. Cuidados | 7 | 11 | |
| d. Adoção de cães | 3 | 1 | |
| e. Outros (viagem, dia de cuidado do cão, 7 exposição de cães, interação do cão com a família estendida) | | 2 | |
| Total | 77 | 67 | |
| Exposição potencial (entre 2 períodos de teste) | | | 0,84 |
| a. Nenhum | 61 | 54 | |
| b. Acolhidos | 8 | 7 | |
| c. Cuidados | 2 | 5 | |
| d. Adoção de cães | 3 | 0 | |
| e. Outros (viagem, dia de cuidado do cão, 3 exposição de cães, interação do cão com a família estendida) | | 1 | |
| Total | 77 | 67 | |

Na medicina humana, até aproximadamente o início dos anos 90, várias vacinas de célula inteira contra a *Bp* foram utilizadas para controlar com sucesso a coqueluche em populações vacinadas (10). No entanto, essas vacinas eram associadas com uma incidência de aproximadamente 50% de reações adversas, reações inflamatórias locais mais frequentes e/ou mal-estar passageiro e piroxia (10). É mais provável que os PAMPs nas vacinas de célula inteira fossem repositivos não apenas pelos efeitos adjuvantes, mas, também, por induzir as respostas inflamatórias que constituíam a maioria das reações adversas (10,12). Essas reações adversas foram um principal instigador do desenvolvimento de vacinas acelulares menos reativas contendo tanto menos PAMPs quanto menos antígenos potenciais (10). A taxa de reação adversa para as vacinas de célula inteira contra a *Bb* anteriormente amplamente utilizadas em cães foi aparentemente consideravelmente menor do que com as vacinas contra a *Bp* de acordo com dados disponíveis, principalmente anedóticos; no entanto, existe uma escassez de dados de predominância confiáveis sobre reações adversas às vacinas contra *Bb* em cães. Não obstante, um desejo semelhante de reduzir as taxas de reação percebidas foi um motivo maior para o desenvolvimento da vacina acelular contra a *Bb* atual. Portanto, uma "evolução paralela" motivada pela segurança ocorreu na medicina humana e veterinária com relação às vacinas para *Bordetella* spp. relevante, resultando em vacinas acelulares menos reativas. No entanto, como parte desse processo, é importante conhecer o "compromisso" esperado entre a imunogenicidade geral e menos reatogenicidade; geralmente, não é biologicamente possível ter ambas (10,12,13).

Tabela 4. Estatística descritiva e valores de *P* associados para sexo, idade, IgA sérica específica para *Bb* inicial e IgA nasal específica para *Bb* dos cães

| Variável | Grupo de tratamento | | | | | | | Valor de <i>P</i> |
|--|-----------------------------------|---------|-------------|------------------------------------|---------|--------------|-------------------|-------------------|
| | Vacina injetável contra <i>Bb</i> | | | Vacina intranasal contra <i>Bb</i> | | | Valor de <i>P</i> | |
| | Número de cães | Fêmeas | Machos | Número de cães | Fêmeas | Machos | | |
| Sexo (macho/fêmea) | 77 | 44 | 33 | 67 | 40 | 27 | 0,8 | |
| | Número de cães | Mediana | Variação | Número de cães | Mediana | Variação | Valor de <i>P</i> | |
| Idade (anos) | 77 | 6,5 | 1 a 15 | 67 | 6 | 1 a 13 | 0,85 | |
| IgG sérica específica para <i>Bb</i> inicial | 77 | 72,1 | 5,5 a 111,1 | 67 | 75,1 | -3,5 a 128,9 | 0,62 | |
| IgA sérica específica para <i>Bb</i> inicial | 77 | 67 | 0 a 169 | 67 | 63,5 | 0 a 173 | 0,99 | |
| IgA nasal específica para <i>Bb</i> inicial | 62 | 66 | 3 a 116 | 58 | 73 | 0 a 137 | 0,41 | |

Tabela 5. Estatística descritiva e valores de *P* associados para os 3 resultados de interesse; mudanças na IgG sérica específica para *Bordetella bronchiseptica* (*Bb*), mudança na IgA sérica específica para *Bb*, e mudança na IgA nasal específica para *Bb* entre as amostragens inicial e final

| Variável | Grupo de tratamento | | | | | | | Valor de <i>P</i> |
|---|-----------------------------------|---------|-----------|------------------------------------|---------|-----------|-------------------|-------------------|
| | Vacina injetável contra <i>Bb</i> | | | Vacina intranasal contra <i>Bb</i> | | | Valor de <i>P</i> | |
| | Número de cães | Mediana | Variação | Número de cães | Mediana | Variação | | |
| Mudança na IgG sérica específica para <i>Bb</i> | 77 | 15 | -39 a 69 | 67 | 13 | -16 a 95 | 0,31 | |
| Mudança na IgA sérica específica para <i>Bb</i> | 77 | 16 | -32 a 103 | 67 | 32 | -42 a 154 | 0,007 | |
| Mudança na IgA sérica específica para <i>Bb</i> | 60 | 6,5 | -83 a 76 | 55 | 12 | 69 a 134 | 0,23 | |

Era de interesse que em alguns cães, os anticorpos reativos à *Bb* no soro e nas secreções nasais aparentemente diminuíssem 10 a 14 dias depois da vacinação. No caso das secreções nasais, isso poderia simplesmente ser um "artifício" de amostragem relacionado ao volume de secreção nasal coletado nos swabs antes da colocação em uma quantidade padrão de meio de transporte; houve um alto grau de variação na coleta dessas amostras. Esse fator é difícil de controlar, principalmente quando a coleta de cães do próprio cliente, com narinas de tamanho variável, frequentemente pequenas. Esta restrição se refere à dificuldade logística de realizar estudos minimamente invasivos em cães domésticos, e garante o uso do substituto imunológico, IgA sérica, como um indicador de uma resposta mucosa relevante (14). No caso de anticorpos séricos, esse possível efeito da diluição não é relevante, uma vez que uma diluição padrão de soro é testada nos ELISAs. Uma diminuição nos anticorpos 10 a 14 dias depois da exposição ao antígeno no soro ou nas secreções nasais pode ser um indicador de uma falta de resposta variável à vacina em um animal já positivo para o anticorpo, em combinação com uma diminuição dos anticorpos com relação à meia-vida esperada dessas proteínas no plasma e nas superfícies mucosas, e/ou complexação imune do anticorpo com antígenos vacinais (15). Alternativamente, uma diminuição aparente nos anticorpos medidos nos ELISAs que utilizaram uma preparação de células inteiras de *Bb* como antígeno, pode ser devido à falha de medir com exatidão respostas a antígenos imunodominantes à *Bb* ou diferentes respostas do anticorpo ao subtipo IgG em diferentes cães (13,16,17). Em outras palavras, após o reforço com vacina, alguns cães podem responder preferencialmente a antígenos particulares *versus* outros, que podem, então, ser detectados em uma diminuição geral aparente na reação com a constelação de antígenos padronizada na preparação de células inteiras utilizada como antígeno para o ELISA.

O sítio de produção e relevância imunológica de IgA sérica canina tem sido controverso (18,19). O achado de que a maioria dos cães adultos deste estudo que recebeu vacina intranasal apresentou aumentos na IgA reativa para *Bb* no soro pós-vacinação é consistente com o conceito, baseado principalmente em estudos no intestino, de que a produção mucosa após a exposição ao antígeno é a fonte de IgA dimérica no soro (20-22). Este conceito é sustentado por nosso achado recente de aumentos substanciais na IgA sérica subsequente à administração de uma dose única de *Bb* oral ou intranasal, em filhotes de Beagle jovens soronegativos para *Bb* (14). Talvez mais controversa seja a capacidade de imunização parenteral para reforçar a IgA mensurável em superfícies mucosas não afetadas pela doença, e havia poucos dados comparativos que tratassem dessa questão. Embora os números de amostras de swab nasal fossem reduzidos em comparação com soro, o achado de que não havia diferenças significativas na IgA mucosa reativa à *Bb* nos grupos de cães que receberam vacinas injetáveis ou intranasais é consistente com o conceito de que a administração parenteral da vacina pode resultar em aumentos na IgA específica do antígeno nas secreções nasais em indivíduos com mucosa preparada (23). Mais relevante para a *Bb*, demonstrou-se que a vacinação parenteral de adolescentes humanos naturalmente expostos anteriormente com a vacina acelular contra a *Bp* (DTaP) estimulou não apenas as respostas da IgG anamnésica específica para *Bp*, mas a IgA também (24). Este não foi o caso após a imunização parenteral primária com a vacina DTaP indicando que o preparo da mucosa era necessário para afetar a resposta posterior (24). A implicação prática dessas observações é que o preparo dos filhotes com vacina intranasal seguida pela administração parenteral em uma série inicial alcança o reforço das respostas do anticorpo tanto sistêmico quanto mucoso (25,26).

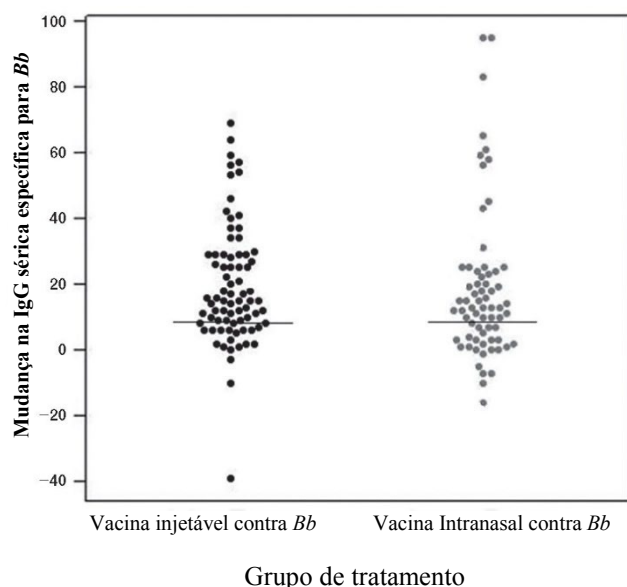


Figura 1. Gráfico de pontos espalhados da mudança nas concentrações de IgG sérica reativa à *Bordetella bronchiseptica* entre as amostragens inicial e final. As linhas sólidas representam os valores medianos para cada grupo de tratamento.

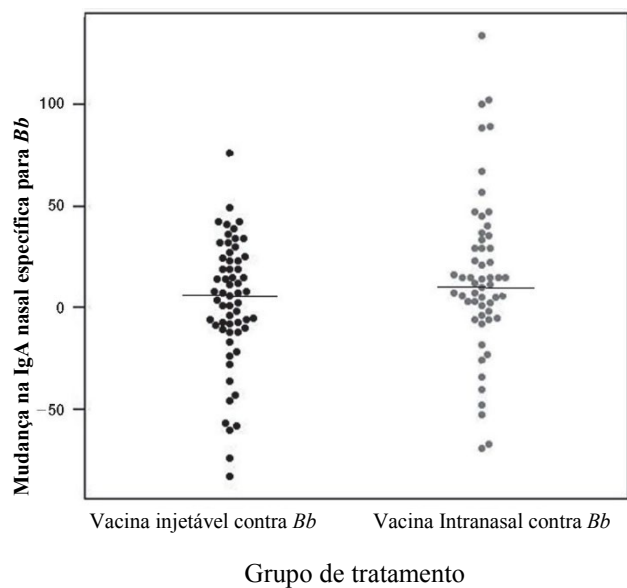


Figura 2. Gráfico de pontos espalhados da mudança nas concentrações de IgA nasal reativa à *Bordetella bronchiseptica* entre as amostragens inicial e final. As linhas sólidas representam os valores medianos para cada grupo de tratamento.

Sugeriu-se 40 anos atrás que a transmissão natural de *Bb* de cães portadores clinicamente afetados, convalescentes ou assintomáticos pudesse contribuir para a duração da imunidade à *Bb*, e que esse efeito poderia variar com o "estilo de vida" de um cão (3). Nós fomos incapazes de associar o cofator de estilo de vida de exposição potencial a outros cães com as respostas iniciais do anticorpo à *Bb* nessa coorte de cães.

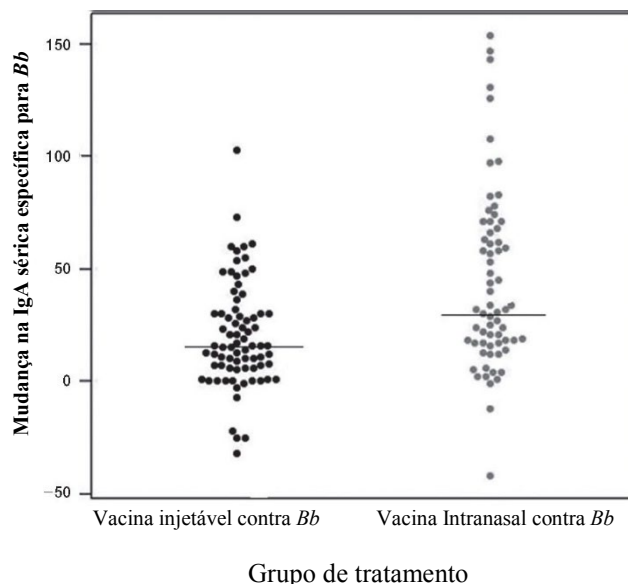


Figura 3. Gráfico de pontos espalhados da mudança nas concentrações de IgA sérica reativa à *Bordetella bronchiseptica* entre as amostragens inicial e final. As linhas sólidas representam os valores medianos para cada grupo de tratamento.

Isso pode ser devido às limitações dos dados como viés de *recall* dos donos, inadvertidamente perdendo ou classificando erroneamente risco(s) importante de exposição, ou uma incapacidade de quantificar o risco de exposição adequadamente; por exemplo, uma falta de conhecimento relacionada à "circulação" de *Bb* em subconjuntos da população canina. Os dados relativos ao porte de *Bb* por cães assintomáticos são de alguma forma conflitantes. Estudos anteriores baseados na cultura não relataram isolamento de *Bb* em 2 populações de Beagles de laboratório [$n = 467$ (27); $n = 25$ (28)], e 3/50 (6,0%) cães assintomáticos que entraram ou ficaram alojados em uma clínica veterinária universitária (29) foram positivos para a cultura de *Bb*. Em estudos recentes utilizando PCR potencialmente mais sensível, 2/22 (9,1%) dos cães normais que se apresentaram na clínica veterinária (7) e 98/503 (19,5%) dos cães assintomáticos que se apresentaram em abrigos eram positivos para DNA de *Bb* (30). Infelizmente, o status imune à *Bb* não foi conhecido/relatado em quaisquer desses estudos. Com base na baixa predominância de cães positivos para *Bb* (4%) nessa população de cães vacinados rotineiramente, o porte de *Bb* não pode ser implicado como um cofator importante na resposta às vacinas contra *Bb* nesse estudo. No entanto, a exposição à *Bb* de individual infectados de forma aguda, animais portadores, ou fômites é, sem dúvida, um cofator importante, se difícil para medir, na resposta às vacinas contra a *Bb* (4), que pede investigação adicional.

Em conclusão, esses dados demonstram que a administração tanto intranasal quanto parenteral de vacinas atuais para *Bb* em cães domésticos adultos soropositivos para *Bb* variavelmente vacinados previamente por via intranasal pode estimular respostas de anticorpos anamnésicos sistêmicos e mucosos que foram associadas com modulação da doença em infecções por *Bordetella* (10,25). Portanto, estes dados sugerem que qualquer vacina pode ser considerada para uso como um reforço em animais com memória imunológica estabelecida por imunização prévia (25) e/ou exposição natural.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado, em parte, por um subsídio irrestrito da Zoetis para estudar a imunidade clínica às vacinas contra *Bb*, por fundos discricionários do autor principal para estudar a imunologia clínica.

Referências

- Priestnall SL, Mitchell JA, Walker CA, Erles K, Brownlie J. New and emerging pathogens in canine infectious respiratory disease. *Vet Pathol* 2014;51:492-504.
- Ellis JA. How well do vaccines for *Bordetella bronchiseptica* work in dogs? A critical review of the literature 1997-2014. *Vet J* 2015;204:5-16.
- Bemis DA, Carmichael LE, Appel MJG. Naturally occurring respiratory disease in a kennel caused by *Bordetella bronchiseptica*. *Cornell Vet* 1977;67:282-293.
- Lavine JS, King AA, Bjørnstad ON. Natural immune boosting in pertussis dynamics and the potential for long-term vaccine failure. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 2011;108:7259-7264.
- Ellis JA, Rhodes C, Lacoste S, Krakowka S. Antibodies to *Bordetella bronchiseptica* in vaccinated and infected dogs. *Can Vet J* 2014;55:1-8.
- Ellis JA, Anseeuw E, Gow S, et al. Seroepidemiology of respiratory (group 2) canine coronavirus, canine parainfluenza virus and *Bordetella bronchiseptica* infections in urban dogs in a humane shelter and in rural dogs in small communities. *Can Vet J* 2011;52:861-868.
- Joffe DJ, Lelewski R, Weese JS, et al. Factors associated with the development of Canine Infectious Respiratory Disease Complex (CIRDC) in dogs in 5 Canadian small animal practices. *Can Vet J* 2016;57:46-51.
- Ellis JA, Krakowka GS, Dayton AD, Konoby C. Comparative efficacy of an injectable vaccine and an intranasal vaccine in stimulating *Bordetella bronchiseptica*-reactive antibody responses in seropositive dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2002;220:43-48.
- Dohoo I, Martin W, Henrik S. *Veterinary Epidemiologic Research*. Charlottetown, Prince Edward Island: VER, 2009.
- Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:326-382.
- Benn CS, Netea MG, Selin LK, Aaby P A small jab — A big difference: Nonspecific immunomodulation by vaccines. *Trends Immunol* 2013;34:43-439.
- Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 2011;30:16—34.
- Vaughan K, Seymour E, Peters B, Sette A. Substantial gaps in knowledge of *Bordetella pertussis* antibody and T cell epitopes relevant for natural immunity and vaccine efficacy. *Hum Immunol* 2014;75:440-451.
- Ellis JA, Gow SP, Waldner CL, et al. Comparative efficacy of intranasal and oral vaccines against *Bordetella bronchiseptica* in dogs. *Vet J* 2016;212:71-77.
- Dixon FJ, Talmage DW, Maurer PH, Deichmille M. The half-life of homologous gamma globulin (antibody) in several species. *J Exptl Med* 1952;96:313-318.
- Hijnen M, He Q, Schepp R, et al. Antibody responses to defined regions of the *Bordetella pertussis* virulence factor pertactin. *Scan J Infect Dis* 2008;40:94-104.
- Leininger E, Bowen S, Renauld-Mongenie G, et al. Immunodominant domains present on the *Bordetella pertussis* vaccine component filamentous hemagglutinin. *J Infect Dis* 1997;175:1423-1431.
- Davis RB, Jayappa H, Abdelmagid OY, Armstrong R, Sweeney D, Lehr C. Comparison of the mucosal immune response in dogs vaccinated with either an intranasal avirulent live culture or a subcutaneous antigen extract vaccine of *Bordetella bronchiseptica*. *Vet Ther* 2007;8:32-40.
- Larson LJ, Thiel BE, Sharp P, Schultz RD. A comparative study of protective immunity provided by oral, intranasal and parenteral canine *Bordetella bronchiseptica* vaccines. *Int J Appl Res Vet Med* 2013;11:153-160.
- Vaerman JP, Heremans JE. Origin and molecular size of immunoglobulin-A in the mesenteric lymph of the dog. *Immunol* 1970;18:27-38.
- Batt RM, Barnes A, Rutgers HC, Carter SD. Relative IgA deficiency and small intestinal bacterial overgrowth in German shepherd dogs. *Res Vet Sci* 1991;50:106-111.
- Olsson M, Frankowiack M, Tengvall K, et al. The dog as a genetic model for immunoglobulin A (IgA) deficiency: Identification of several breeds with low serum IgA concentrations. *Vet Immunol Immunopathol* 2014;160:255-259.
- Brown TA, Murphy BR, Radl J, Haaijman JJ, Mestecky J. Subclass distribution and molecular form of immunoglobulin A hemagglutinin antibodies in sera and nasal secretions after experimental secondary infection with influenza A virus in humans. *J Clin Microbiol* 1985;22:259-264.
- Thuan L, Cherry JD, Chang ST, et al. Immune responses and antibody decay after immunization of adolescents and adults with an acellular pertussis vaccine: The APERT study. *J Infect Dis* 2004;190:535-544.
- Ellis JA, Haines DM, West KH, et al. Effect of vaccination on experimental infection with *Bordetella bronchiseptica* dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2001;218:367-375.
- Feunou PF, Kammoun H, Debie A-S, Loch C. Heterologous prime-boost immunization with live attenuated *B. pertussis* BPZE1 followed by acellular pertussis vaccine in mice. *Vaccine* 2014;32:4281-4288.
- Brennan PC, Simkins RC. Throat flora of a closed colony of beagles. *Proc Soc Exptl Biol Med* 1970;134:566-570.
- Clapper WE, Meade GH. Normal flora of the nose, throat, and lower intestine of dogs. *J Bacteriol* 1956;85:399-420.
- Bailie WE, Stowe EC, Schmitt AM. Aerobic bacterial flora of oral and nasal fluids of canines with reference to bacteria associated with bites. *J Clin Microbiol* 1978;7:223-231.
- Lavan R, Knesl O. Prevalence of canine infectious respiratory pathogens in asymptomatic dogs presented at US animal shelters. *J Small Anim Pract* 2015;56:572-576.