

# Início de imunidade comparativo de vacinas orais e intranasais contra a provocação com *Bordetella bronchiseptica*

Maya M Scott-Garrard, Yu-Wei Chiang, Frederic David

**Para citar:** Scott-Garrard MM, Chiang Y-W, David F. Início de imunidade comparativo de vacinas orais e intranasais contra a provocação com *Bordetella bronchiseptica*. *Veterinary Record Open* 2018;**5**:e000285. doi:10.1136/vetreco-2018-000285

Recebido em 12 de março de 2018  
Revisado em 31 de maio de 2018  
Aceito em 21 de junho de 2018

## RESUMO

Três grupos de Beagles de aproximadamente oito semanas de idade foram vacinados uma vez com 1 ml de vacina de placebo (oral, n=9), 1 ml de Recombitek® Oral Bordetella (oral, n=10) ou 1 ml Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub> (intranasal, 0,5 ml/narina, n=10). Sete dias depois da vacinação, os três grupos foram submetidos à provocação com *Bordetella bronchiseptica* virulenta através de aerossolização. Oito de nove cães do grupo tratado com placebo e nenhum cão nos grupos tratados com as vacinas Recombitek® Oral Bordetella ou Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub> desenvolveram tosse espontânea de dois ou mais dias consecutivos (definição de caso de doença). Os cães dos grupos tratados com Recombitek® Oral Bordetella e Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub> apresentaram uma incidência significativamente menor de doença (P<0,0001) com uma fração prevenível 100 por cento. O estudo demonstrou que a vacinação com Recombitek® Oral Bordetella ou Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub> é eficaz na prevenção da doença sete dias após a vacinação em comparação com cães vacinados com placebo.

## INTRODUÇÃO

*Bordetella bronchiseptica* é um componente bacteriano importante no complexo de doença respiratória canina.<sup>1,2</sup> Até o momento, existem vacinas injetáveis, orais e intranasais monovalentes e combinadas disponíveis para a vacinação de cães a fim de reduzir ou evitar os sinais clínicos de infecção por *B bronchiseptica*. Diversos estudos, alguns comparativos, avaliaram a eficácia dessas vacinas contra a provocação com *B bronchiseptica* com resultados variáveis.<sup>1-9</sup>

A maioria dos estudos utilizou um sistema de pontuação para avaliar os sinais clínicos depois da provocação, e as vacinas intranasais tenderam a ter melhor eficácia do que as vacinas administradas por outras vias. As vacinas intranasais foram observadas como sendo difíceis de administrar, e as vacinas injetáveis têm potencial para causar reações no local da injeção.<sup>7</sup> As vacinas injetáveis contra *Bordetella* também têm um início de proteção mais prolongado uma vez que requerem duas doses separadas por poucas semanas para iniciar a imunidade. Uma vantagem particular das vacinas orais é a facilidade de administração enquanto mantêm a imunidade mucosa local de uma administração intranasal.<sup>2</sup>

Como as vacinas intranasais foram mais frequentemente observadas por terem melhor eficácia, este estudo foi desenhado para comparar a eficácia de uma vacina oral desenvolvida recentemente com uma vacina intranasal estabelecida contra uma provocação com *B bronchiseptica* sete dias depois da vacinação. Ao invés de utilizar um sistema de pontuação, os sinais clínicos neste estudo foram avaliados como presentes ou ausentes para proporcionar uma comparação mais estrita das vacinas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os animais foram tratados em conformidade com as diretrizes do Comitê Institucional de Cuidado e Uso Animal e foi obtida aprovação antes do início do estudo. O estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes da Boa Prática Clínica. Três grupos de Beagles de aproximadamente oito semanas de idade foram vacinados uma vez com 1 ml de vacina de placebo (oral, n=9), 1 ml de Recombitek® Oral Bordetella (oral, n=10) (Merial) ou 1 ml Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub> (intranasal, 0,5 ml/narina, n=10). (Merck Animal Health). Trinta e um dias antes da vacinação, todos os cães foram triados e determinados como sendo sorologicamente negativos para anticorpos anti-*B bronchiseptica* e negativos para a presença de *B bronchiseptica* por cultura traqueal. Os cães foram testados novamente no dia 0 e quaisquer cães positivos sorologicamente ou para cultura foram excluídos. Todos os cães foram alojados em um prédio de isolamento e foram randomizados para o grupo por ninhada e sexo. Os cães foram separados por grupo (um canil por grupo) na época da vacinação e foram alojados separadamente por grupo até o dia da provocação para prevenir que a contaminação cruzada se disseminasse. Aproximadamente 30 minutos antes de serem submetidos à provocação, os cães de todos os três grupos foram misturados na sala da provocação para manter o cegamento do pessoal responsável por realizar as observações clínicas e coletar as amostras. O pessoal envolvido na análise das amostras também não tinha ciência das designações por grupo de tratamento. O pessoal envolvido na vacinação não estava envolvido com as observações clínicas, coleta de amostras ou análise das amostras. O estatístico acessou os dados depois que a base de dados foi travada pela gerência de dados e, então, unificou a randomização (designações dos grupos) com os dados e executou a análise estatística de acordo com o plano de análise de dados.



© O(s) Autor(es) (ou seu(s) empregador(es)) 2018. Reutilização permitida de acordo com a CC BY-NC. Não para reutilização comercial. Consulte os direitos e permissões. Publicado pela BMJ.

Merial, Athens, Geórgia, EUA

**Correspondência para**  
Dra. Maya M Scott-Garrard;  
maya.scott-garrard@merial.com

O grupo tratado com Recombitek® Oral Bordetella recebeu uma vacina em série, pré-licença, monovalente, avirulenta, modificada, viva, em escala industrial na dose comercial desejada. O grupo tratado com Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub> recebeu uma vacina de vírus vivo modificado de adenovírus canino tipo 2, *B bronchiseptica*, comercial e uma vacina de cultura viva avirulenta. Os cães do grupo tratado com placebo receberam água estéril.

Sete dias depois da vacinação, todos os cães foram submetidos à provocação com uma mistura de duas cepas de *B bronchiseptica* virulenta através de aerossolização. Os isolados utilizados na provocação foram cultivados em placas de ágar sangue Bordet-Gengou e incubados a 37 °C por 24 horas. O crescimento bacteriano nas placas para cada isolado foi colhido e agrupado em PBS. O processo da provocação foi semelhante àquele descrito por Hess *et al* e Larson *et al*. Os cães foram randomizados para a câmara de provocação com cães de cada grupo representados em cada câmara. Cães de diferentes grupos foram misturados depois da provocação e foram randomizados para dois canis de forma que cada grupo de vacinação foi representado em cada canil.

Durante a fase pós-provocação de 14 dias, os cães foram observados quanto à tosse espontânea, mal-estar, secreção nasal, secreção ocular e outros sinais de infecção respiratória. Mal-estar foi definido como um cão com aparência de doença generalizada, fraqueza ou fadiga. Dias consecutivos de sinais clínicos respiratórios foram considerados clinicamente relevantes e descritos. As temperaturas retais foram registradas diariamente. Febre foi definida como uma temperatura retal de pelo menos 39,7 °C e 0,5 °C acima da temperatura retal do dia 0. *Swabs* traqueais foram coletados sob sedação leve com propofol antes da vacinação e no dia final do estudo e foram avaliados quanto à presença de *B bronchiseptica* utilizando um procedimento descrito anteriormente.<sup>7</sup> *Swabs* traqueais foram coletados de maneira a evitar contaminação da cavidade oral. Amostras de soro foram coletadas nos dias 0, 7 (antes da provocação), 14 e 21 e analisadas quanto à presença de anticorpos anti-*B bronchiseptica* por ensaio de microaglutinação.<sup>7</sup>

Para este estudo, um cão era classificado com apresentando doença devido à *B bronchiseptica* se desenvolvesse tosse espontânea por dois ou mais dias consecutivos. Esta definição de caso foi selecionada para proporcionar uma comparação robusta das vacinas evitando super-representar circunstâncias isoladas de tosse. A incidência de doença foi comparada entre cada grupo de vacina em teste e o grupo tratado com vacina de placebo utilizando o teste exato de Fisher. A fração prevenível em cada vacina em teste e seu IC de 95% também foram calculados. Todas as análises

estatísticas foram realizadas utilizando o pacote SAS V.9.4 Enterprise Guide (SAS Institute) e PF em R V.3.1.1. Todos os testes foram bilaterais e a significância estatística foi declarada com um valor de P de 0,05 ou menos. Análises estatísticas não foram realizadas para outros sinais clínicos de infecção, títulos sorológicos ou isolamento em *swab* traqueal.

## RESULTADOS

### Segurança da vacina

Nenhum animal experimentou quaisquer reações adversas durante o estudo.

### Tosse espontânea e incidência de doença

Antes de serem submetidos à provocação, nenhum cão de qualquer grupo apresentou sinais clínicos de doença. Oito de 10 cães do grupo tratado com placebo e nenhum cão nos grupos tratados com as vacinas Recombitek® Oral Bordetella ou Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub> desenvolveram tosse espontânea de dois ou mais dias consecutivos (Tabela 1). A fração prevenível foi de 1,00 e o IC de 95% foi (0,67 a 1,00) para ambos os grupos tratados com vacina.

### Outros sinais de infecção

Dois cães do grupo tratado com placebo foram observados com um dia de mal-estar cada. Nenhum mal-estar foi observado no grupo tratado com vacina Recombitek® Oral Bordetella ou Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub>. Os grupos tratados com as vacinas Recombitek® Oral Bordetella e Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub> apresentaram, cada um, um cão com um dia de febre enquanto houve cinco cães do grupo tratado com placebo com um dia de febre. Um cão do grupo tratado com placebo apresentou febre em dois dias consecutivos (Tabela 2).

Nenhum cão do grupo tratado com a vacina Recombitek® Oral Bordetella ou Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub> apresentou dias consecutivos de secreção ocular mucopurulenta enquanto esse sinal foi observado em quatro cães do grupo tratado com placebo. Secreção ocular serosa foi observada em dias consecutivos em seis cães do grupo tratado com Recombitek® Oral Bordetella, quatro cães do grupo tratado com Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub> e seis cães do grupo tratado com placebo.

Nenhum cão do grupo tratado com Recombitek® Oral Bordetella foi observado com dias consecutivos de secreção nasal serosa ou mucopurulenta. Quatro cães do grupo tratado com Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub> e dois cães do grupo tratado com placebo foram observados com dias consecutivos de secreção nasal serosa. Três cães do grupo tratado com placebo e um cão do grupo tratado com Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub> foram observados com secreção nasal mucopurulenta em dias consecutivos.

**TABELA 1:** A incidência de doença positiva devido à infecção por *Bordetella bronchiseptica* por grupo com valores de P do teste exato de Fisher, fração prevenível e IC de 95%

Grupo	Cães com dois ou mais dias consecutivos de tosse	Número de cães com doença (dias consecutivos de tosse)*	Percentual de cães com doença	Fração prevenível (IC de 95%)
Recombitek® Oral Bordetella (n=10)	2	0	0,00	1,00 (0,67 a 1,00)
Vacina de placebo (n=9)	8	8	88,9	
Nobivac® Intra-Trac <sub>3</sub> (n=10)	1	0	0,00	1,00 (0,67 a 1,00)

\*Diferença significativa entre os grupos (Teste exato de Fisher P<0,0001).

**TABELA 2:** Número de cães expressando sinais clínicos por dois ou mais dias depois da provocação

Vacina	Cães com dois ou mais dias consecutivos de sinal clínico					Cães com dias consecutivos de sinal clínico				
	Febre	Secreção Nasal		Secreção ocular		Febre	Secreção Nasal		Secreção ocular	
		S	MP	S	MP		S	MP	S	MP
Recombitek® Oral Bordetella (n=10)	0	2	0	10	2	0	0	0	6	0
Nobivac® Intra-Trac <sub>3</sub> (n=10)	0	6	1	6	0	0	4	1	4	0
Vacina de placebo (n=9)	1	3	3	9	6	1	2	3	6	4

MP, mucopurulenta; S, serosa.

### Títulos de aglutinação sérica

Todos os cães dos grupos tratados com vacina Recombitek® Oral Bordetella e Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub> eram soronegativos antes da vacinação (Tabela 3). No dia 7, dois cães do grupo tratado com a vacina Recombitek® Oral Bordetella testaram soropositivo para anticorpos anti-*Bordetella* com um máximo de cinco cães no dia 21. Nenhum dos animais do grupo tratado com Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub> testou positivo para anticorpos anti-*Bordetella* durante o estudo. Dois cães do grupo tratado com placebo testaram soropositivo no dia 21 (14 dias depois da provocação). Os cães do grupo tratado com a vacina Recombitek® Oral Bordetella apresentaram títulos médios geométricos consistentemente maiores do que os cães dos grupos tratados com Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub> ou placebo (Tabela 4).

### Isolamento de *B bronchiseptica* dos swabs traqueais

Os swabs traqueais de todos os cães foram negativos para *B bronchiseptica* antes da vacinação (Tabela 5). Todos os cães (100 por cento) dos grupos tratados com as vacinas Recombitek® Oral Bordetella e Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub> e oito cães (88,9 por cento) do grupo tratado com placebo apresentaram isolamento traqueal positivo no dia 21 (14 dias depois da provocação). O cão do grupo tratado com placebo com o swab traqueal negativo no dia 21 foi observado com secreção ocular serosa e secreção ocular mucopurulenta em dias não consecutivos, com dias consecutivos de secreção nasal serosa, secreção nasal mucopurulenta e tosse, e testou soropositivo no dia 21.

**TABELA 3:** Cães soropositivos para anticorpos anti-*Bordetella bronchiseptica* (título >8) por ensaio de microaglutinação

Grupo	Dia			
	0	7*	14	21
Recombitek® Oral Bordetella (n=10)	0	2	4	5
Nobivac® Intra-Trac <sub>3</sub> (n=10)	0	0	0	0
Vacina de placebo (n=9)	0	0	0	2

\*Dia da provocação.

### DISCUSSÃO

A vacinação com Recombitek® Oral Bordetella e Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub> proporcionou proteção contra uma provocação com duas cepas virulentas de *B bronchiseptica* sete dias depois da vacinação. Com base na definição de caso de dois dias consecutivos de tosse espontânea, oito de nove cães (88,9 por cento) do grupo tratado com placebo desenvolveram doença enquanto nenhum cão (0,0 por cento) vacinado com Recombitek® Oral Bordetella ou Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub> desenvolveu doença. Esses resultados são consistentes com aqueles relatados por Larson *et al*<sup>2</sup> onde uma vacina oral contra *B bronchiseptica* proporcionou proteção semelhante como uma vacina intranasal quando provocada 42 dias depois da vacinação.

Os sinais clínicos de doença respiratória eram considerados clinicamente relevantes quando ocorressem em dois ou mais dias consecutivos. Quarenta por cento dos cães do grupo tratado com Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub> foram observados com secreção nasal serosa em comparação com 22,2 por cento dos cães do grupo tratado com placebo e nenhum (0 por cento) cão do grupo tratado com Recombitek® Oral Bordetella. Existe uma hipótese de que a vacinação intranasal pode ter irritado a mucosa nasal em alguma extensão tornando a secreção nasal serosa mais frequente depois da provocação no grupo tratado com Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub>. Nenhum cão do grupo tratado com Recombitek® Oral Bordetella apresentou dias consecutivos de secreção nasal mucopurulenta em comparação com um cão do grupo tratado com Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub> e três cães do grupo tratado com placebo.

**TABELA 4:** Títulos médios geométricos por ensaio de microaglutinação para anticorpo anti-*Bordetella bronchiseptica*

Grupo	Dia			
	0	7*	14	21
Recombitek® Oral Bordetella (n=10)	8,00	9,19	12,13	13,93
Nobivac® Intra-Trac <sub>3</sub> (n=10)	8,00	8,00	8,00	8,00
Vacina de placebo (n=9)	8,00	8,00	8,00	10,08

\*Dia da provocação.

**TABELA 5:** Cães com isolamento traqueal positivo para *Bordetella bronchiseptica*

Grupo	Número de cães com isolamento traqueal positivo	
	Dia 0	Dia 21
Recombitek® Oral Bordetella (n=10)	0	10
Nobivac® Intra-Trac <sub>3</sub> (n=10)	0	10
Vacina de placebo (n=9)	0	8

Embora a proteção contra a doença de duas vacinas fosse claramente demonstrada, nenhuma das vacinas impediu a colonização do trato respiratório superior por *B bronchiseptica* depois da provocação, conforme detectado por reisolamento dos organismos da provocação a partir de *swabs* traqueais.

Curiosamente, os títulos médios de anticorpos séricos anti-*B bronchiseptica* foram maiores no grupo tratado com Recombitek® Oral Bordetella do que nos grupos tratados com Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub> ou placebo tanto após a vacinação quanto após a provocação. O número total de cães soropositivos também foi maior no grupo tratado com Recombitek® Oral Bordetella com 50 por cento dos cães soropositivos 14 dias depois da provocação em comparação com 22,2 por cento no grupo tratado com placebo e 0,0 por cento no grupo tratado com Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub>. Não se sabe por que o grupo tratado por via intranasal não apresentou uma resposta sorológica após a vacinação uma vez que se previu que o grupo tratado com Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub> teria uma resposta sorológica semelhante à do grupo tratado com Recombitek® Oral Bordetella conforme relatado anteriormente na literatura.

Este estudo demonstra que a vacina recém-desenvolvida Recombitek® Oral Bordetella é equivalente à vacina intranasal Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub> na prevenção da doença causada por *B bronchiseptica* quando comparada com cães vacinados com placebo. Os cães vacinados com Recombitek® Oral Bordetella e Nobivac® Intra-Trac<sub>3</sub> apresentaram uma incidência significativamente menor de doença ( $P < 0,0001$ ) com uma fração prevenível de 100 por cento. Os resultados deste estudo apresentam clara evidência de que a vacinação com a vacina Recombitek® Oral Bordetella é eficaz na prevenção de tosse em cães quando submetidos à provocação com *B bronchiseptica* sete dias depois da vacinação e oferece uma alternativa à administração intranasal, mais difícil, sem reações no local da injeção potenciais de um produto administrado por via parenteral.

**Agradecimentos** Os autores agradecem a Ashley House, Jeff Cook, Kris DeWitt, Dana Parker, Xinshuo Wang e Hongyu Ru por sua assistência.

**Colaboradores** Todos os autores fizeram contribuições substanciais para o desenho do estudo e interpretação dos dados. MMSG elaborou a versão inicial do manuscrito e os outros autores se envolveram na edição do manuscrito e aprovaram a versão final. Todos os autores concordam em serem responsáveis por todos os aspectos do trabalho e por garantir que quaisquer questões envolvendo a integridade ou a exatidão do estudo serão investigadas e tratadas.

**Financiamento** Este estudo foi patrocinado pela Merial (agora parte da Boehringer Ingelheim).

**Interesses concorrentes** Os autores são funcionários da Merial (agora parte da Boehringer Ingelheim).

**Aprovação ética** Comitê Institucional de Cuidado e Uso Animal da Merial.

**Procedência e revisão por pares** Não comissionado; revisado por pares externamente.

**Declaração de compartilhamento de dados** Os dados que sustentam os achados deste estudo estão disponíveis mediante solicitação razoável ao autor correspondente.

**Acesso aberto** Este é um artigo de acesso aberto distribuído de acordo com a licença da Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0), que permite que outros distribuam, recombinem, adaptem, aproveitem este trabalho não comercialmente, e licenciem seus trabalhos derivados em diferentes termos, desde que o trabalho original seja adequadamente citado, receba o crédito apropriado, quaisquer mudanças sejam indicadas e o uso seja não comercial. Consulte: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

## REFERÊNCIAS

- Ellis JA, Gow SP, Lee LB, *et al.* Comparative efficacy of intranasal and injectable vaccines in stimulating *Bordetella bronchiseptica*- reactive anamnestic antibody responses in household dogs. *Can Vet J* 2017;58:809-15.
- Larson LJ, Thiel BE, Sharp P *et al.* A comparative study of protective immunity provided by oral, intranasal and parenteral canine *Bordetella bronchiseptica* vaccines. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* 2013;11:153-60.
- Ellis JA, Haines DM, West KH, *et al.* Effect of vaccination on experimental infection with *Bordetella bronchiseptica* in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2001;218:367-75.
- Gore T, Headley M, Laris R, *et al.* Intranasal kennel cough vaccine protecting dogs from experimental *Bordetella bronchiseptica* challenge within 72 hours. *Vet Rec* 2005;156:482-3.
- Jacobs AA, Bergman JG, Theelen RP, *et al.* Compatibility of a bivalent modified-live vaccine against *Bordetella bronchiseptica* and CPiV, and a trivalent modified-live vaccine against CPV, CDV and CAV-2. *Vet Rec* 2007;160:41-5.
- Davis R, Jayappa H, Abdelmagid OY, *et al.* 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.
- Hess TJ, Parker DS, Hassall AJ, *et al.* Evaluation of efficacy of oral administration of *Bordetella bronchiseptica* intranasal vaccine when used to protect puppies from tracheobronchitis due to *B bronchiseptica* infection. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* 2011;9:300-5.
- Ellis JA. How well do vaccines for *Bordetella bronchiseptica* work in dogs? A critical review of the literature 1977-2014. *Vet J* 2015;204:5-16.
- Ellis JA, Gow SP, Waldner CL, *et al.* Comparative efficacy of intranasal and oral vaccines against *Bordetella bronchiseptica* in dogs. *Vet J* 2016;212:71-7.