

## Respuesta inmune humoral contra toxoides de *Clostridium perfringens* en vaquillonas Holando seropositivas al virus de la Leucosis Bovina Enzoótica

### Humoral immune response against *Clostridium perfringens* toxoids in Leukosis Bovine Enzootic virus seropositive Holando heifers

L. de Brun<sup>1</sup> 0000-0002-3331-9566

V. da Silva<sup>2</sup> 0000-0002-8990-9100

R. O. S. Silva<sup>3</sup>

F. C. F. Lobato<sup>3</sup>

R. Puentes<sup>4</sup> 0000-0002-4618-9721

<sup>1</sup>Área de Bacteriología, Departamento de Ciencias Microbiológicas, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (UdelaR), Uruguay. Email: laureanadebrun@gmail.com

<sup>2</sup>Área de Inmunología, Departamento de Ciencias Microbiológicas, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (UdelaR), Uruguay.

<sup>3</sup>Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.

<sup>4</sup>Área de Virología, Departamento de Ciencias Microbiológicas, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (UdelaR), Uruguay.

Veterinaria (Montevideo) Volumen 55  
Nº 212 (2019) 79-85

DOI: 10.29155/VET.55.212.6

Recibido: 15/11/2018

Aceptado: 09/09/2019



#### Resumen

Leucosis Bovina Enzoótica es la principal virosis que afecta al ganado lechero en Uruguay. La infección subclínica causa disfunciones importantes del sistema inmune impactando directamente en la salud animal. El objetivo de este estudio fue evaluar si la respuesta inmune humoral de vaquillonas holando serológicamente positivas al virus de la leucosis bovina (BLV) es afectada frente a la inmunización a campo con una vacuna clostridial. Se realizó el seguimiento de la respuesta inmune humoral posvacunación durante 12 meses de un grupo de animales serológicamente positivos (n=29) y otro serológicamente negativos a BLV(n=19). Los animales recibieron tres dosis de una vacuna comercial contra Clostridios (días 0, 30, 173) y se extrajeron muestras de sangre los días 0, 30, 60, 90, 180 y 365 luego de la primovacunación. Se cuantificaron anticuerpos totales mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISAs) contra las toxinas alfa, beta y épsilon del *C. perfringens* y anticuerpos neutralizantes mediante Seroneutralización (SN) *in vitro* para la toxina épsilon. Los resultados evidenciaron una baja respuesta de anticuerpos neutralizantes contra la toxina épsilon utilizando la técnica de SN *in vitro* lo cual no se correlacionó con los resultados obtenidos en el ELISA comercial. La respuesta de anticuerpos totales utilizando ELISA comerciales fue variable según el toxoide evaluado. No se evidenciaron diferencias significativas en la concentración de anticuerpos contra *Clostridium perfringens* entre animales seropositivos y seronegativos a BLV. La utilidad de los test de ELISA comerciales para analizar la respuesta a la vacunación contra clostridiosis, debe ser discutida y analizada a partir de los resultados encontrados en este ensayo.

**Palabras clave:** Retrovirus, Clostridiosis, Vacunación, Serología, Inmunoglobulinas.

#### Summary

Enzootic bovine leukosis is the main virosis that affects dairy cattle in Uruguay. The subclinical infection causes important dysfunctions in the immune system impacting directly in the animal health. The aim of this study was to evaluate the immune response of Holstein heifers with positive serology against Leukosis bovine virus (BLV) when they were ordinary immunized against *Clostridium perfringens*. It was evaluated a seropositive group to BLV animals (n=29) and other seronegative group (n=19) during twelve months. The animals received three immunizations with a commercial polyvalent vaccine against several Clostridiosis (days 0, 30, 173). Blood samples were taken in days 0, 30, 60, 90, 180 y 360 post vaccination and then the humoral immune response was analyzed through the use of the ELISA technique to quantify total antibodies against *C. perfringens* toxins alpha, beta and epsilon. Besides it was *in vitro* analyzed the amount of neutralizing antibodies against epsilon toxin using the reference technique, seroneutralization. The results demonstrated a low response of neutralizing antibodies to epsilon toxin by SN technique showing no correlation with the results obtained by the commercial ELISA kit. Total antibodies response evaluated using commercial ELISA Kit was variable according to the studied toxoid. No significant differences were found in the immune response against *Clostridium perfringens* vaccination between BLV seropositive and seronegative animals using the techniques mentioned. The commercial ELISA kit use to analyze the response to vaccination against Clostridiosis, must be discussed and analyzed according to the results of this work.

**Keywords:** Retrovirus, Clostridiosis, Vaccination, Serology, Immunoglobulins.

---

## Introducción

---

El virus de la Leucosis Bovina Enzootica es el principal patógeno viral que afecta la lechería en muchos países del mundo. En Uruguay las prevalencias son muy altas, mayores al 70% en rodeos de leche (Furtado *et al.*, 2013), incluso en animales jóvenes hemos reportado previamente prevalencias mayores al 50% (Puentes *et al.* 2016a). El virus afecta células de la línea linfóide, principalmente los linfocitos B CD5+ que expresan inmunoglobulina M en su superficie, además de monocitos y macrófagos (OIE, 2012). El 90% de los animales infectados son asintomáticos, produciendo pérdidas productivas asociadas principalmente a la dificultad de exportación de animales en pie, disminución de la producción láctea como también la longevidad del animal y desregulación a nivel inmunológico (Erskine *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2012; Bartlett *et al.*, 2013, Della Libera *et al.*, 2015; Frie *et al.*, 2016, Puentes *et al.*, 2016b; Frie *et al.*, 2017). Se ha demostrado que la infección subclínica por este virus causa disfunciones importantes del sistema inmune que impactan directamente en la sanidad (Bartlett *et al.*, 2014), como por ejemplo disminución de la función de los polimorfonucleares *in vitro* inducido por *Escherichia coli* (*E. coli*) en vacas infectadas (Souza *et al.*, 2012). El BLV no sólo causa inmunodepresión sino que además genera disturbios inmunológicos a nivel de la inmunidad celular, modificando el perfil de las células T (Frie y Coussens, 2015), que son claves en la regulación del sistema inmune tanto en infecciones naturales como en la respuesta a inmunizaciones por vacunación. Las células T infectadas con el virus, expresan mayor cantidad de receptores inmunoinhibitorios, lo que aumenta la habilidad de los patógenos que causan infecciones crónicas a evadir la respuesta inmune del hospedador, aumentando por ejemplo la expresión de IL-10 o disminuyendo la de IL2, IL12 e IFN- $\gamma$  (Konnai *et al.*, 2003; Amills *et al.*, 2004). Estas alteraciones del sistema inmune, destacados con mayor magnitud en animales con linfocitosis persistente podrían tener un impacto negativo en la capacidad de ganado para resistir al avance de la enfermedad infecciosa o a la respuesta a vacunas; en este mismo sentido algunos estudios reportaron una correlación positiva entre BLV y otras enfermedades (Emanuelson *et al.*, 1992; Trainin *et al.*, 1996) o cuestionan la habilidad de bovinos infectados con BLV para responder inmunológicamente contra otros patógenos (Erskine *et al.*, 2011; Puentes *et al.*, 2016b; Frie *et al.*, 2016; Frie *et al.*, 2017).

Las enfermedades clostridiales constituyen una amenaza constante en la cría de ganado bovino, causando diversas afecciones como “mancha”, “gangrena gaseosa”, enterotoxemias, hemoglobinuria bacilar, hepatitis necrótica, tétanos y botulismo. En cuanto al *Clostridium perfringens*, bacteria anaeróbica, los más importantes en medicina veterinaria son el tipo C y el D. El tipo C produce toxinas alfa y beta y el D produce las toxinas alfa y épsilon. Estas tres toxinas son las más importantes en la patogénesis de las enterotoxemias de etiología clostridial en animales de producción (Moreira *et al.*, 2016).

La evaluación de la potencia en vacunas clostridiales que

contienen toxoides de *C. perfringens* se basa en la cuantificación de anticuerpos específicos desarrollados posvacunación en conejos empleando la prueba de neutralización *in vivo* en ratones, el ensayo de ELISA o el test de seroneutralización *in vitro* en cultivos celulares. Ensayos comerciales para evaluar la respuesta serológica frente a las toxinas letales no están disponibles fácilmente para el diagnóstico en laboratorios (Simpson *et al.*, 2018). En este sentido, se ha desarrollado la técnica de SN *in vitro* empleando la línea celular de riñón canino (MDCK) para evaluar anticuerpos anti toxinas épsilon que puede ser empleada para controlar la potencia de las vacunas clostridiales (Salvarani *et al.*, 2013).

La prevención de enfermedades infecciosas en los rodeos lecheros es un componente crítico de la producción y el mantenimiento del bienestar animal, siendo las vacunas de gran utilidad para prevenir enfermedades. Desde el punto de vista práctico, la probabilidad de vacunar animales que estén infectados con BLV es muy alta en Uruguay, donde la seroprevalencia puede llegar a más del 70% en algunas zonas (Furtado *et al.*, 2013). Existen diversos cuestionamientos a nivel veterinario sobre la eficacia de las vacunas clostridiales comercializadas (Nascimento *et al.*, 2004; Miranda *et al.*, 2008; Salvarani *et al.*, 2010). Sin embargo, el foco de atención ha estado centrado sobre todo en la composición y fabricación de las vacunas y no tanto a las posibles fallas inmunológicas por infecciones virales crónicas que cursan con inmunodepresión como es el caso de BLV. Dada la importancia de la vacunación en la producción lechera y la evidente desregulación del sistema inmune en animales asintomáticos infectados con BLV, el objetivo de este estudio fue evaluar si la respuesta inmune humoral de vaquillonas holando serológicamente positivas al virus de la leucosis bovina (BLV) es afectada frente a la inmunización a campo con una vacuna clostridial. Este trabajo pretende por lo tanto aportar información referente a una problemática común que experimentan los veterinarios cuando implementan planes sanitarios para el ganado bovino.

---

## Materiales y Métodos

---

### Origen de los animales y grupos de ensayo

Se utilizaron 48 bovinos hembra de raza holando de aproximadamente 6 a 8 meses de edad, sin antecedentes de vacunación contra enfermedades clostridiales. Los animales pertenecían a un campo de cría de ganado holando ubicado en ruta 5 km 123, La Cruz, departamento de Florida, Uruguay. Las terneras comenzaron el estudio con un peso promedio de 162  $\pm$  18Kg.

Se confeccionaron dos grupos uno seropositivo a BLV de 29 animales (Grupo BLV+) y otro seronegativo a BLV de 19 animales (Grupo BLV-), que permanecieron juntos durante todo el ensayo en el mismo establecimiento. El seguimiento serológico para el status para BLV fue realizado durante todo el ensayo.

### Vacunación de los animales y toma de muestras

Se procedió a la inmunización con una vacuna comercial que

contenía bacterinas y toxoides para la prevención de Clostridiosis provocadas por *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium perfringens* tipo B y C, *Clostridium perfringens* tipo D. Se administró una dosis de dos mililitros vía subcutánea en la tabla del cuello (día 0 del ensayo) y una primera revacunación a los 30 días y otra a los 173 días. La extracción de sangre fue realizada en el momento de la primovacunación (día 0), y luego a los 30, 60, 90, 180 y 365 días postvacunación (dpv). Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción de la vena coccígea en tubos sin anticoagulante rotulados debidamente y centrifugados por 20 minutos a 400 g a temperatura ambiente. Los sueros extraídos se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento y posterior análisis.

El ensayo fue previamente aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) - Facultad de Veterinaria - Universidad de la República, Uruguay (protocolo N° PI 07/14 - Exp. 111130-000302 / 14).

#### Detección de anticuerpos contra BLV mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)

Se utilizó un kit comercial de ELISA indirecto para detectar anticuerpos contra la gp51 del virus de BLV en suero bovino con un 98% de sensibilidad y 100% de especificidad (Rama *et al.*, 2010) de marca VMRD, cod. 5505.20 (Pullman, Washington, USA), aprobado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos-USDA). Las muestras se procesaron de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se utilizaron tres controles positivos débiles por placa, y se estableció la línea de corte para cada placa a partir del promedio de las lecturas de las densidades ópticas (D.O) de estos sueros controles.

#### Detección de anticuerpos anti-toxina alfa, beta y épsilon de *Clostridium perfringens* mediante ELISA

Para cuantificar anticuerpos específicos contra las toxinas alfa, beta y épsilon de *C. perfringens*, se utilizaron kits comerciales de ELISA de bloqueo BIO K 222/2 (toxina alfa) - BIO K 317/2 (toxina beta) y BIO K 291/2 (toxina épsilon) (Bio-X Diagnostics, Rochefort, Bélgica). Las muestras se procesaron individuales de acuerdo a las indicaciones del fabricante y la lectura de la densidad óptica (D.O) se realizó a 450 nm en un espectrofotómetro de rango visible (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

El cálculo para la cuantificación de los anticuerpos se realizó mediante el porcentaje de inhibición (% inh) para cada toxina según la siguiente fórmula: (D.O negativos - D.O positivos) / D.O negativos \* 100. El grado de positividad especificado por fabricante se observada en el Cuadro 1.

#### Seroneutralización (SN) *in vitro* para detección de anticuerpos neutralizantes anti-toxina épsilon de *Clostridium perfringens*

Se utilizó la técnica de SN *in vitro*, para cuantificar los títulos de anticuerpos neutralizantes contra la toxina épsilon de *C. perfringens*, los días 0, 30, 60, 90 y 180. Se empleó la línea celular *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK) según descrito

**Cuadro 1:** Grado de positividad según el porcentaje de inhibición a las toxinas del *Clostridium perfringens* según las indicaciones del fabricante de ELISA de bloqueo (Bio-X Diagnostics, Rochefort, Bélgica).

Valor calculado	Nivel de positividad
%inhibición <20	0
20 ≤ %inh < 40	+
40 ≤ %inh < 60	++
60 ≤ %inh < 80	+++
%inh ≥ 80	++++

anteriormente (Souza *et al.*, 2010; Salvarani *et al.*, 2013). La misma se realizó en la Universidad Federal de Minas Gerais - Brasil. Para el grupo BLV- (n = 19 animales), fueron procesados tres pools de cuatro animales y un pool de 7 animales, conteniendo por pool 100 µL de suero por muestra. En el grupo BLV+ (n=29), fueron procesados 6 pools de cuatro animales y otro pool de cinco animales, conteniendo cada pool 100 µL de suero por muestra. El límite de detección de anticuerpos del ensayo fue de 0.4 UI/mL, considerándose a los *pools* de sueros con concentraciones menores a 0.4 UI/mL como cero UI/mL.

#### Análisis Estadístico

Para el análisis de los porcentajes de inhibición obtenidos anti-toxinas *C. perfringens* se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) con medidas repetidas, seguido por el test de comparación múltiple de Bonferroni. El test de Mann-Whitney fue usado para comparar los resultados de los grupos. Se utilizó un intervalo de confianza de 95% y el nivel de significancia fue de p<0.05 y los valores de p comprendidos entre 0,05 y 0,10 se consideraron como tendencia. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software).

## Resultados

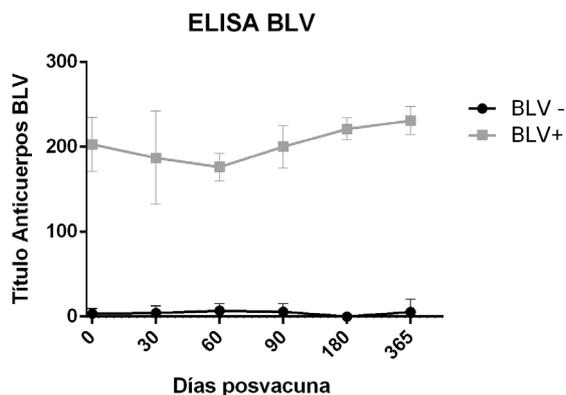
#### Anticuerpos anti-BLV durante el estudio

Los grupos BLV+ y BLV- permanecieron seropositivos y seronegativos respectivamente durante todo el experimento (Figura 1). Los animales culminaron el estudio con un peso promedio de 331±19 Kg y no manifestaron signos de enfermedad durante todo el estudio.

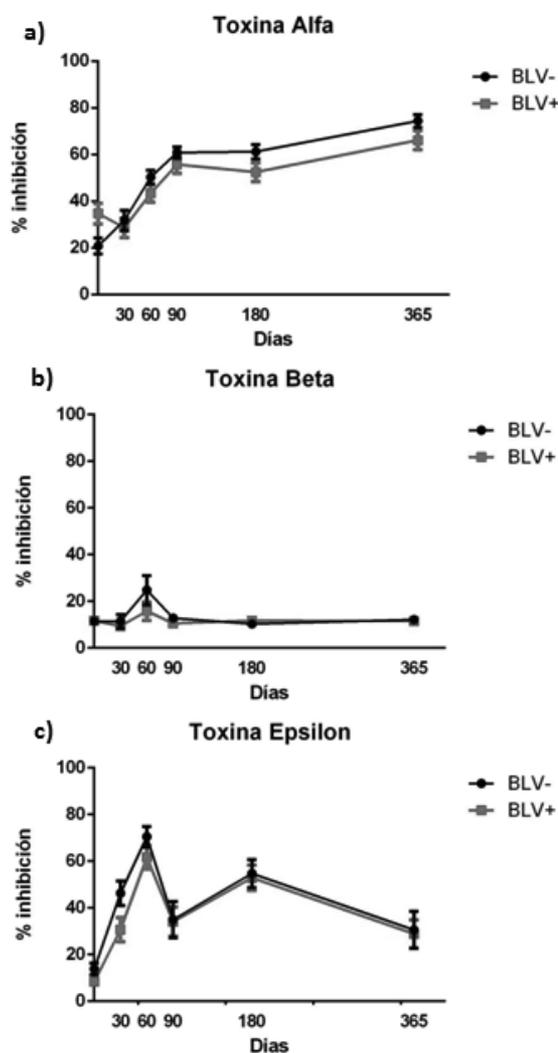
#### Respuesta a los diferentes antígenos según status a BLV

El porcentaje de inhibición anti-toxina generado luego de las inmunizaciones contra *Clostridium perfringens* en bovinos serológicamente positivos a BLV no difirió significativamente del porcentaje de inhibición de bovinos seronegativos para las tres toxinas en todo el estudio (p>0.05) (Figura 2).

Al inicio del experimento (día 0), todos los bovinos presentaron niveles bajos de anticuerpos contras las tres toxinas del *Clostridium perfringens* (alfa, beta y épsilon) que se interpretaron como "niveles 0" de positividad según el kit de ELISA utilizado.



**Figura 1:** Cinética de los títulos de anticuerpos contra BLV mediante ELISA en los distintos grupos de animales a lo largo del ensayo de Clostridios. Para cada media se muestra el error estándar. El grupo BLV + (29), cuadrado gris y BLV - (19), círculo negro, permanecieron positivos y negativos durante todo el ensayo respectivamente.



**Figura 2:** Porcentaje de Inhibición anti *Clostridium perfringens*, determinando por ELISA de bloqueo. 2a. Toxina Alfa del *Clostridium perfringens*. 2b. Toxina Beta del *Clostridium perfringens*. 2c. Toxina Épsilon del *Clostridium perfringens*. Círculo negro grupo seronegativo, cuadrado gris animales seropositivos. Barra desvío de la media. No hubo diferencias significativas entre grupos seronegativo y seropositivos al virus de la Leucosis bovina (BLV)  $p > 0.05$ .

Se observó diferente cinética en la curva de anticuerpos entre las tres toxinas analizadas, pero entre grupos (BLV+ y BLV-) fue similar para los tres casos (Figura. 2a, b, c), al igual que la duración de la inmunidad, que no difirió según el status para BLV. Para la toxina épsilon se observó un descenso del título de anticuerpos aproximadamente a los 90 días, mostrando posteriormente un leve aumento de anticuerpos luego que los animales fueron revacunados a los 173 días (Figura. 2c). En el grupo BLV - el porcentaje de inhibición contra esta toxina fue mayor (nivel de positividad ++) que el grupo BLV + (nivel de positividad +) (Cuadro 1). Sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ). No se observó dicho comportamiento para la toxina alfa, en la cual el título de anticuerpos aumentó a lo largo de todo el estudio (Figura. 2a).

En cuanto a la respuesta humoral contra la toxina beta, se observó una menor respuesta comparada con los resultados de las toxinas épsilon y alfa. La toxina beta para el grupo BLV+ obtuvo un porcentaje de inhibición por debajo del 20% correspondiente a un grado de positividad de 0 (Figura. 2b), mientras que en el grupo BLV- se observó un nivel de positividad + sólo el día 60 posvacunación.

#### Respuesta de los animales a la vacunación

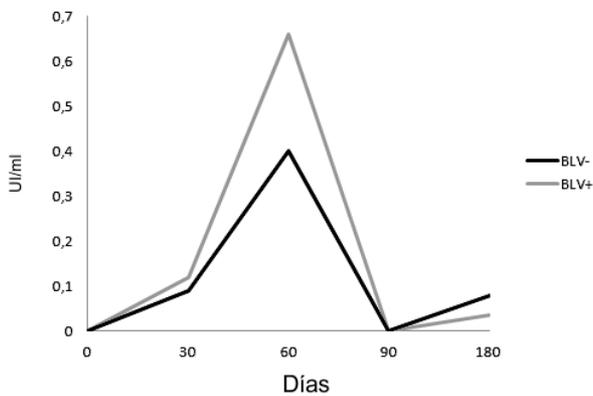
Luego de la primo-vacunación con la vacuna polivalente comercial, se evidenció a los 30 días (dpv) un aumento claro en el título de anticuerpos únicamente contra la toxina épsilon. Para las demás toxinas (alfa y beta), el efecto de la primo-vacunación a los 30 dpv, no fue significativo según los resultados obtenidos por ELISA. Sin embargo, luego de la revacunación (día 60), se encontró un aumento significativo de los anticuerpos contra las tres toxinas analizadas con niveles de positividad entre + y +++ para las toxinas alfa, beta y épsilon, descrito en Figura 2.

#### Anticuerpos neutralizantes anti-toxina épsilon del *Clostridium perfringens*

Se observó un bajo título de anticuerpos neutralizantes tanto para el grupo BLV+ como el BLV- durante todo el ensayo. Al día 0 no se detectaron anticuerpos neutralizantes y luego de la primo-vacunación a los 30 días se observaron bajos títulos anticuerpos neutralizantes que fueron aumentando a los 60 días luego de la inmunización, siendo en este punto la obtención del mayor título. Esta diferencia fue mayor en los animales seropositivos a BLV, pero no fue significativa ( $p > 0.05$ ). A los 90 días del ensayo ya no se detectaron anticuerpos neutralizantes contra la toxina en ninguno de los dos grupos hasta el final del experimento (Figura 3).

## Discusión

Las pérdidas ocasionadas a los productores en Uruguay por muertes súbitas que muchas veces no llegan a diagnóstico definitivo, principalmente afectando categorías jóvenes, implican sistemáticamente un plan de vacunación estratégico que permitan lograr protección contra las principales enfermedades infecciosas asociadas a estos cuadros clínicos. En este sentido



**Figura 3:** Anticuerpos neutralizantes anti toxina épsilon del *Clostridium perfringens* determinado por seroneutralización *in vitro*. Se muestra la media de los pools para cada momento evaluado. Línea gris clara grupo seropositivo, línea negra grupo seronegativo.

las vacunas clostridiales son un componente fundamental en los esquemas de sanidad del ganado ya que constituyen el principal mecanismo para controlar dichas enfermedades (Borrmann *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 2016).

Teniendo en cuenta la alta seroprevalencia de BLV en rodeo del Uruguay y considerando el impacto que el mismo produce en el sistema inmune, se evaluó la posible interferencia entre la infección viral y la respuesta a la vacunación contra una de las principales vacunas utilizadas en la región.

Se utilizó la técnica de ELISA para determinar el status frente a la Leucosis Bovina debido a que la detección de anticuerpos específicos contra las proteínas virales gp51 y p24 en suero bovino, por ELISA, constituye el procedimiento de rutina más utilizado para la identificación de animales infectados asintomáticos (Trono *et al.*, 2001; Gutiérrez *et al.*, 2009; Erskine *et al.*, 2011). Los anticuerpos séricos contra las proteínas estructurales del virus persisten durante toda la vida del animal, si bien se han reportado descensos de anticuerpos en vacas preparto no detectables por esta técnica (Rama *et al.*, 2010). Sin embargo, el presente estudio se realizó en terneras durante un año resultando que todos los animales de los grupos permanecieron con la misma condición serológica y las mismas obtuvieron una ganancia de peso promedio de 500 gramos por día, esperable en las condiciones de crianza de este campo de recría. En base a estos resultados se entiende que los factores nutricionales que pueden afectar el desarrollo de la respuesta inmune pos-vacunación, incidieron en todos los bovinos del ensayo por igual y probablemente no hayan tenido efecto negativo sobre la respuesta evaluada.

No se encontraron diferencias en la respuesta inmune de anticuerpos totales inducida por la vacuna contra *Clostridium perfringens* entre animales seropositivos y seronegativos a BLV a nivel de campo. Trabajos reportados por Erskine *et al.* (2011) encontraron que la inmunización con una vacuna comercial conteniendo *Escherichia coli*, produjo un título significativamente menor de IgG2 en animales infectados con BLV. Asimismo, en un estudio reciente llevado a cabo por nuestro

grupo de investigación, con animales seropositivos a BLV, se reportó un menor título de IgM e IgG1 cuando los animales fueron inmunizados contra el virus de Fiebre aftosa, pero esta diferencia no fue significativa cuando se compararon el nivel de anticuerpos totales (Puentes *et al.*, 2016b). En otros estudios han reportado menor producción de IgM en animales inmunizados a campo contra vacunas para *Leptospiras* y herpesvirus tipo 1 y a su vez para este último también menor título de IgG2 (Frie *et al.*, 2016). Estos antecedentes pueden explicar el hecho de que en el presente ensayo no se hayan encontrado diferencias significativas, habiendo analizado anticuerpos totales contra las toxinas clostridiales y no discriminada por isotipos (IgM, IgG1 o IgG2) como lo hicieron los trabajos citados anteriormente. Se ha demostrado desde hace mucho tiempo que IgG1 e IgG2 bovinas promueven la opsonización y fagocitosis por macrófagos, y que solo IgG2 promueve la opsonización vía neutrófilos *in vitro* (Howard, 1984). También los isotipos IgM, IgG1 e IgG2 están asociados a funciones neutralizantes dependiendo del agente infeccioso (Lin *et al.*, 2001; Pega *et al.*, 2013). En este mismo sentido, las variaciones encontradas en estos datos pueden deberse a las diferencias entre los agentes evaluados en los estudios mencionados (virus ARNss desnudo, virus ADNds envueltos, y bacterias gram negativas y antígenos purificados), siendo el agente infeccioso de este estudio una bacteria gram positiva que induce la inmunidad fundamentalmente por medio de exotoxinas. Por lo tanto se podría esperar que las respuestas inmunes protectoras inducidas en cada caso sean diferentes en cuanto a isotipos de inmunoglobulinas. Trabajos recientes sugieren que los niveles de anticuerpos circulantes no explican completamente la protección generada por las vacunas anticlostridiales (Rossi *et al.*, 2018). Bajo las condiciones de este estudio y con las técnicas diagnósticas disponibles, no se pudo demostrar que las vaquillonas seropositivas (BLV+) presentaran una respuesta inmune diferente al rodeo de animales seronegativos (BLV-) después de la vacunación con toxoides de *Clostridium perfringens*. En futuros ensayos se deberán discriminar los isotipos de inmunoglobulinas u otros componentes del sistema inmune (ejemplo citoquinas), para determinar si existen diferencias a otro nivel que no fueron detectadas en la presente investigación.

Los animales vacunados respondieron exhibiendo un título de anticuerpos contra las toxinas alfa y épsilon luego de las dos primeras inmunizaciones con la vacuna comercial polivalente utilizada. Sin embargo la respuesta generada durante todo el estudio para la toxina beta corresponde a grados de positividad "0" que podría indicar una baja inmunogenicidad para esta toxina. De acuerdo a los resultados encontrados utilizando la técnica de SN *in vitro*, técnica de referencia (Salvarani *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2010; Salvarani *et al.*, 2013), todos los animales del estudio presentaron un bajo nivel de anticuerpos neutralizantes para la toxina épsilon luego de los 60 días post inmunización. Otros trabajos han encontrado disminución de los anticuerpos anti *C. chauvoei* luego de los 90 dpv en bovinos medidos por ELISA (Rivera Patrón, 2014), así como un marcado descenso de los anticuerpos 90 dpv para nueve especies de clostridios diferentes luego de la inmunización de

corderos (Rossi *et al.*, 2018). Por otro lado, y contradictorio a las demás toxinas, la respuesta de anticuerpos totales contra la toxina alfa en el presente ensayo fue aumentando a lo largo del tiempo hasta la finalización del experimento.

En cuanto a la duración de la inmunidad a lo largo del estudio de manera global, si bien la curva de respuesta fue diferente para las tres toxinas, se observa una disminución del título de anticuerpos anti toxina épsilon tanto por ELISA como por SN *in vitro*, luego de los 60 días. En este sentido, es importante destacar que la mayoría de las vacunas comerciales contra clostridios, recomiendan su revacunación anual.

En particular, se observaron algunos animales que al inicio del experimento presentaban bajos títulos de anticuerpos, principalmente contra la toxina alfa. Esto permite suponer, al no tener un grupo control de animales no inmunizados contra *C. perfringens*, que los animales estuvieron expuestos a la toxina de manera natural previo al ensayo. Esto se puede explicar por el hecho de que el género *Clostridium* está ampliamente distribuido en la naturaleza, principalmente en el suelo y en el tracto intestinal de los animales. Según otros autores (Matches *et al.*, 1974), es considerada la bacteria patógena más distribuida en el mundo, siendo el *C. perfringens* una de las especies más comunes en bovinos en nuestro país capaz de perdurar en el suelo durante años (Algorta y Cabrera, 2015; Banchoero *et al.*, 2016).

En cuanto a la técnica ELISA de bloqueo utilizada para la determinación de la respuesta de anticuerpos totales en este ensayo, la misma está avalada por algunos autores que reportan la viabilidad de utilizarla para evaluar la respuesta serológica contra clostridios como alternativa a los ensayos biológicos (Krt, 1999). Sin embargo, no existen suficientes evidencias que asocien los títulos de anticuerpos mediante ELISA y la protección *in vivo* contra la enfermedad. Un estudio reciente de Goossens *et al.*, (2016) encontraron altos títulos de anticuerpos anti-toxina *alfa* del *C. perfringens*, seis semanas luego de la vacunación, mediante ELISA (Bio-X Diagnostics) y los mismos inhibieron la actividad de la toxina alfa *in vitro*. Sin embargo no confirieron protección a la necrosis en el desafío a nivel intestinal en terneros. Existiendo por lo tanto una discrepancia entre los títulos de anticuerpos anti toxina *alfa* cuantificados por ELISA y la capacidad protectora de estos anticuerpos en el modelo de necrosis intestinal. Otro estudio similar, evidenció una muy buena correlación (0.5-0.8) entre un ensayo de ELISA desarrollado para detectar anticuerpos anti toxinas del *C. perfringens* y la seroneutralización (Borrmann *et al.*, 2006). Tanto los resultados de ELISA como los de SN *in vitro* en el presente estudio encuentran bajos títulos de anticuerpos. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este ensayo deben ser profundizados y comparados con pruebas de desafío a campo, con el fin de establecer si los títulos de anticuerpos pueden asociarse con la protección contra estas enfermedades.

## Conclusiones

Este es el primer ensayo a campo en Uruguay que evaluó la respuesta humoral posvacunación para una vacuna policlostridial

en bovinos y lo relacionó con la infección subclínica con el BLV. En cuanto a la infección con BLV, con las técnicas serológicas empleadas no se encontraron en el presente estudio diferencias significativas en la respuesta humoral contra toxoides de *C. perfringens* entre animales seronegativos y seropositivos a BLV. La inmunización contra *Clostridium perfringens* en vaquillonas Holando presentó una pobre respuesta de anticuerpos neutralizantes contra la toxina épsilon. La producción de anticuerpos totales cuantificados mediante ELISA comercial, difirió entre las tres toxinas evaluadas, encontrándose sólo para la toxina alfa una respuesta de anticuerpos que se mantuvo elevada a lo largo del ensayo.

La utilidad de la técnica de ELISA para cuantificar la respuesta a la vacunación contra clostridiosis debe ser analizada con mayor profundidad, a partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo.

## Conflictos de Interés

Los autores declaran no haber conflictos de interés.

## Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por la Agencia de Investigación e Innovación (ANII): FSSA\_X\_2014\_1\_105283, POS\_NAC\_2015\_1\_109630 y la Comisión de Investigación y Desarrollo Científico (CIDEDEC) de la Facultad de Veterinaria - Universidad de la República, Montevideo Uruguay. Agradecemos al personal del “Campo de Recría La Cruz” (Florida, Uruguay) por el soporte de las actividades de campo, a su veterinario el Dr. Gustavo Sacco y a la Dra. Agustina Algorta.

## Referencias

- Algorta, B., Cabrera, E. (2015). Hemoglobinuria bacilar: descripción de un brote, presentación, diagnóstico y control (Tesis de grado). Udelar, Montevideo.
- Amills, M., Norimine, J., Olmstead, C. A., Lewin, H. A. (2004). Cytokine mRNA expression in B cells from bovine leukemia virus-infected cattle with persistent lymphocytosis. *Cytokine*, 28, 25-28.
- Banchoero, G., Chalkling, D., Mederos, A. (2016). Relevamiento de problemas sanitarios y de manejo durante la terminación en bovinos en sistemas de confinamiento en Uruguay. *Veterinaria (Montev.)*, 202, 4-13.
- Bartlett, P. C., Norby, B., Byrem, T. M., Parmelee, A., Ledergerber, J. T., Erskine, R. J. (2013). Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. *J Dairy Sci*, 96, 1591-1597.
- Bartlett, P. C., Sordillo, L. M., Byrem, T. M., Norby, B., Grooms, D. L., Swenson, C. L., Zalucha, J., Erskine, R. J. (2014). Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc*, 244, 914-22.
- Borrmann, E., Schulze, F., Cussler, K., Hanel, I., Diller, R. (2006). Development of a cell culture assay for the quantitative determination of vaccination-induced antibodies in rabbit sera against *Clostridium perfringens* epsilon toxin and *Clostridium novyi* toxin. *Vet Microb*, 114, 41-50.
- Della Libera, A. M., de Souza, F. N., Batista, C. F., Santos, B. P., de Azevedo, L. F., Sánchez, E. M., Diniz, S. A., Silva, M. X., Haddad, J. P., Blagitz, M. G. (2015). Effects of bovine leukemia virus

- infection on milk neutrophil function and the milk lymphocyte profile. *Vet Res*, 46(1), 2.
- Emanuelson, U., Scherlinga, K., Pettersson, H. (1992). Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. *Prev Vet Med*, 12, 121-131.
- Erskine, R. J., Bartlett, P. C., Sabo, K. M., Sordillo, L. M. (2011). Bovine Leukemia Virus Infection in Dairy Cattle: Effect on Serological Response to Immunization against J5 Escherichia coli Bacterin. *Vet Med Int*, 2011, 9157473.
- Frie, M., Coussens, P. (2015). Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle. *Vet Immunol Immunopathol*, 163, 103-114.
- Frie, M. C., Sporer, K. R. B., Benitez, O. J., Wallace, J. C., Droscha, C. J., Bartlett, P. C., Coussens, P. M. (2017). Dairy Cows Naturally Infected with Bovine Leukemia Virus Exhibit Abnormal B- and T-Cell Phenotypes after Primary and Secondary Exposures to Keyhole Limpet Hemocyanin. *Front Vet Sci*, 4, 112.
- Frie, M., Sporer, K., Wallace, J., Maes, R., Sordillo, L., Bartlett, P., Coussens, P. (2016). Reduced humoral immunity and atypical cell-mediated immunity in response to vaccination in cows naturally infected with bovine leukemia virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 182, 125-135.
- Furtado, A., Rosadilla, D., Franco, G., Piaggio, J., Puentes, R. (2013). Leucosis Bovina Enzoótica en cuencas lecheras de productores familiares del Uruguay. *Veterinaria (Montev.)*, 191, 29-37.
- Goossens, E., Verherstraeten, S., Valgaeren, B. R., Pardon, B., Timbermont, L., Schauvliege, S., Rodrigo-Mocholi, D., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Deprez, P. R., Van Immerseel, F. (2016). Toxin-neutralizing antibodies protect against Clostridium perfringens-induced necrosis in an intestinal loop model for bovine necrohemorrhagic enteritis. *BMC Vet Res*, 12, 101.
- Gutiérrez, G., Álvarez, I., Fondevila, N., Politzki, R., Lomónaco, M., Rodríguez, S., Dus Santos, M. J., Trono, K. (2009). Detection of bovine leukemia virus specific antibodies using recombinant p24-ELISA. *Vet Microbiol*, 137, 224-234.
- Howard, C. J. (1984). Comparison of bovine IgG1, IgG2 and IgM for ability to promote killing of Mycoplasma bovis by bovine alveolar macrophages and neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol*, 6, 321-326.
- Konnai, S., Usui, T., Ohashi, K., Onuma, M. (2003). The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RTPCR. *Vet Microbiol*, 94, 283-294.
- Krt, B. (1999). Development and evaluation of various enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of Clostridium perfringens beta anti-toxins. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 24(3), 293-7.
- Lin, X., O'Reilly, K. L., Burrell, M. L., Storz, J. (2001). Infectivity-neutralizing and hemagglutinin-inhibiting antibody responses to respiratory coronavirus infections of cattle in pathogenesis of shipping fever pneumonia. *Clin Diagn Lab Immunol*, 8, 357-362.
- Matches J. R., Liston, J., & Curran, D. (1974). Clostridium perfringens in the Environment. *Appl Microbiol*, 28(4), 655-660.
- Miranda, A., Fort, M., Bedotti, D., Bentancor, A. M., Bentancor, L. D., Carloni, G. (2008). Evaluación de la respuesta serológica de vacunas comerciales frente a Clostridium chauvoei, con revacunación. *Rev Vet Arg*, 25, 13.
- Moreira, G., Salvarani, F., Cunha, C., Mendonça, M., Moreira, A., Gonçalves, L., Pires, P., Lobato, F., Conceição, F. (2016). Immunogenicity of a trivalent recombinant vaccine against Clostridium perfringens alpha, beta, and epsilon toxins in farm ruminants. *Sci Rep*, 6, 22816.
- Nascimento, R. A. P., Lobato, F. C. F., Abreu, V. L. V., Martins, N. E., Assis, R. A., Carvalho Filho, M. B. (2004). Avaliação de vacinas contra Clostridium novyi tipo B. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 56(1), 1-6.
- OIE (2012). *Manual de las pruebas de Diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres* (7a ed.). Paris: OIE.
- Pega, J., Bucafusco, D., Di Giacomo, S., Schammas, J. M., Malacari, D., Capozzo, A. V., Arzt, J., Pérez-Beascoechea, C., Maradei, E., Rodríguez, L. L., Borca, M. V., Pérez-Filgueira, M. (2013). Early adaptive immune responses in the respiratory tract of foot-and-mouth disease virus-infected cattle. *J Virol*, 87, 2489-95.
- Puentes, R., De Brun, L., Algorta, A., Alvarez, J. P., Sacco, G., Oliveira, M., Llambí, S. (2016a). Horizontal transmission dynamics of Bovine leukemia virus (BLV) and negative effect on reproductive performance in naturally infected holstein heifers. *Sci Anim Health*, 4(3), 294-309.
- Puentes, R., De Brun, L., Algorta, A., da Silva, V., Mansilla, F., Sacco, G., Llambí, S., Capozzo, A. V. (2016b). Evaluation of serological response to foot-and-mouth disease vaccination in BLV infected cows. *BMC Vet Res*, 21, 119.
- Rama, G., Meikle, A., Puentes, R., Moratorio, G., Nicolini, P., Pessina, P., Furtado, A., Pritsch, O. (2010). Estudio comparativo de tres técnicas diagnósticas para la Leucosis Enzoótica Bovina y análisis del efecto de enfermedades concurrentes sobre la fórmula leucocitaria. *Veterinaria (Montev.)*, 46(177-180), 15-22.
- Rivera Patrón, M. (2014). Caracterización de la respuesta inmune humoral anti Clostridium chauvoei en bovinos (Tesis de grado). Udelar, Montevideo.
- Rossi, A., Mónaco, A., Guarnaschelli, J., Silveira, F., Iriarte, A., Benecke, A., Chabalgoity, J. (2018). Temporal evolution of anti-Clostridium antibody responses in sheep after vaccination with polyvalent clostridial vaccines. *Vet Immunol Immunopathol*, 202, 46-51.
- Salvarani, F., Lobato, Z., Pires, P., Silva, R., Alves, G., Pereira, P., Lobato, F. (2013). In vitro potency test for evaluation of Clostridium perfringens type D epsilon toxoid. *Arq Inst Biol*, 80(4), 450-452.
- Salvarani, F., Lobato, Z., Assis, R., Lima, C., Silva, R., Pires, P., Lobato, F. (2010). In vitro evaluation of Clostridium septicum alpha toxoid. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 2(4), 778-783.
- Simpson, K., Callan, R., Van Metre, D. (2018). Clostridial Abomasitis and Enteritis in Ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 34, 155-184.
- Souza, F., Blagitz, M., Latorre, A., Sánchez, E., Batista, C., Weigel, R., Renno, F., Sucupira, M., Della Libera, A. (2012). Intracellular reactive oxygen species production by polymorphonuclear leukocytes in bovine leukemia virus-infected dairy cows. *J Vet Med Sci*, 74, 221-225.
- Souza, M., Lobato, Z., Pires, P., Silva, R., Salvarani, F., Assis, R., Lobato, F. (2010). Standardization of the titration of the epsilon toxin of Clostridium perfringens type D in cell line as an alternative to animal bioassay. *Cienc Rural*, 40, 600-603.
- Trainin, Z., Brenner, J., Meirum, R., Ungar-Waron, H. (1996). Detrimental effect of bovine leukemia virus (BLV) on the immunological state of cattle. *Vet Immunol Immunopathol*, 54, 293-302.
- Trono, K. G., Pérez-Filgueira, D. M., Duffy, S., Borca, M. V., Carrillo, C. (2001). Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet Microbiol*, 83, 235-248.

### Nota de Contribución:

- L. de Brun 20%
- V. da Silva 20%
- R. O. S. Silva 20%
- F. C. F. Lobato 20%
- R. Puentes 20%