

SACCHAROMYCES BOULARDII AMPLIFICA A RESPOSTA VACINAL DE OVINOS VACINADOS CONTRA *CLOSTRIDIUM CHAUVOEI*

DIAGO LIMA¹; VITÓRIA SEQUEIRA GONÇALVES², FRANCISCO DENIS SANTOS³; RODRIGO CASQUERO CUNHA⁴; NEIDA CONRAD⁵; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁶

¹Universidade Federal de Pelotas - diagolima@gmail.com;

²Universidade Federal de Pelotas - vitoriasgon@gmail.com;

³Universidade Federal de Pelotas - denis.santos195@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas rodrigocunha_vet@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – conradneida@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com; fabio_leite@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Os probióticos modulam o sistema imune do hospedeiro promovendo benefícios à saúde e a prevenção de certas doenças (BANAN-MWINE DALIRI & LEE, 2015). São microrganismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, conferem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (HILL et al., 2014; FAO/WHO, 2002). *Saccharomyces boulardii* é uma levedura não patogênica que possui propriedades probióticas e é amplamente utilizada para humanos e animais (JAWHARA & POULAIN, 2007). Os probióticos são considerados seguros para animais e produzem nutrientes e fatores de crescimento que podem modular o equilíbrio e as atividades da microbiota intestinal, provendo benefícios na saúde e na nutrição animal (ABD EL-TAWAB et al., 2016).

O *Clostridium chauvoei* é uma bactéria Gram-positiva, histotóxica, anaeróbica, formadora de endósporos, altamente patogênica, que causa o carbúnculo sintomático. O carbúnculo Sintomático é uma doença grave de bovinos, ovinos e outros ruminantes domésticos levando a importantes perdas econômicas (GROSETH ET AL., 2011; NAGANO et al., 2008;). A patogênese do carbúnculo sintomático é amplamente desconhecida, mas acredita-se que esporos de *C. chauvoei* do ambiente que são ingeridos no intestino são fagocitados e então transportados pelos macrófagos para os músculos, onde permanecem em estado latente. A profilaxia e o controle desta enfermidade são realizados mundialmente pela vacinação com preparações contendo bactérias inteiras inativadas e toxóides (UZAL, 2012).

O *S. boulardii* modula a resposta imune ampliando e aprimorando a eficácia de vacinas convencionais, recombinantes e de DNA em ovinos, suínos e murinos (ROOS et al., 2018; 2012; SILVEIRA et al., 2017;).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da resposta imune de uma vacina contra *C. chauvoei* com suplementação de *S. boulardii* durante 5 dias antes da primeira e segunda vacinação em ovinos.

2. METODOLOGIA

O probiótico *Saccharomyces boulardii* utilizado neste estudo faz parte da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia do Núcleo de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPEl). A levedura *S. boulardii* foi semeada em meio de cultivo contendo extrato de levedura, peptona bacteriológica e dextrose (YPD) acrescido de 2% de ágar e incubadas durante 72 horas a 28 °C. Após crescimento, 3 colônias foram inoculadas em *Erlenmeyers* de

500 mL, contendo 150 mL de meio YPD líquido e incubados em agitador orbital à 200 rpm durante 24 horas. Estes cultivos foram inoculados em biorreator (Braun Biotech International CERTOMAT®) contendo 9 L de meio YPD com 60% de oxigênio dissolvido no meio. A agitação foi mantida a 200 rpm e a temperatura a 28 °C durante 72 horas. Ao final do cultivo o conteúdo foi centrifugado em centrífuga Sorvall® RCTM a 5000 x g durante 20 minutos a 4 °C e concentrado a um volume de 1L de PBS. A concentração de *S. boulardii* obtida nestes cultivos foi de aproximadamente 2×10^9 UFC/mL.

Foram utilizadas 16 ovelhas da raça Corriedale, fêmeas, adultas, divididas em dois grupos experimentais contendo 8 animais em cada, denominados: *Sb* (*S. Boulardii*) e controle. Todos os animais foram mantidos em pastagem natural. O grupo *Sb* recebeu diariamente uma suspensão de 30 mL de PBS contendo 3×10^8 UFC de *S. Boulardii*. O período de suplementação foi durante 5 dias antes da primeira e da segunda vacinação. O grupo controle não recebeu a suplementação com o probiótico. Os animais foram vacinados pela via subcutânea com 2 mL de uma vacina comercial formulada com cultivos totais inativados de *C. chauvoei* adsorvida em hidróxido de alumínio (alumen) como adjuvante, seguindo as indicações do fabricante (Laboratório Bio-Vet S/A, Brasil). Os animais foram vacinados no dia 0 e receberam um reforço vacinal no dia 21 do experimento. Amostras de sangue foram colhidas a partir de punção da veia jugular nos dias 0, 21 e 42. Após a colheita, o soro foi separado, identificado e armazenado a -20 °C até o momento da realização das análises.

Todos os procedimentos realizados estão de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEAA 375-2017).

O ensaio imunoenzimático (ELISA) foi realizado segundo Crichton et al. (1990), com modificações. Placas de 96 cavidades (CRAL®, Brasil) foram sensibilizadas com 100 µL por cavidade da suspensão do antígeno de *C. chauvoei* diluído em tampão carbonato bicarbonato (pH 8,0), *overnight* a 4 °C. As amostras de soros individuais foram diluídas em série na base 2 iniciando em 1:10 até 1:102.400 e adicionadas nas placas, em triplicata. A seguir foi adicionado 100 µL de anticorpos conjugados anti-IgG de ovelha (Sigma-Aldrich, USA) diluído 1:10.000 e incubação durante 60 minutos a 37 °C. Por fim, foi adicionado 100 µL de solução de revelação (10 mL de tampão para substrato, 0,004g de Ortho-Phenylenediamine (Sigma-Aldrich) e 15µL de H₂O₂), deixando reagir por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Para interromper a reação, foram adicionados 50 µL por poço de H₂SO₄ 2N. Entre as etapas as placas foram incubadas a 37 °C e lavadas 5X PBS-T. As absorbâncias foram medidas em leitor de microplacas EZ Read 400 (Biochrom, UK) com filtro de 492 nm. Os resultados foram representados como os valores das médias transformados em log₁₀, expressos como o recíproco da diluição mais elevada, que resultou em absorbâncias de três desvios padrão acima do valor do soro controle negativo.

Para a avaliação de isotipagem específica IgG1/IgG2 foi utilizado anticorpos anti- IgG1 e anti-IgG2 de ovelha (Bio-rad), Berkeley, CA, USA) na diluição de 1:2000. A seguir foi adicionado conjugado seguindo as descritas acima.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais que receberam a suplementação com *S. boulardii* apresentaram, no dia 21, um aumento médio nos títulos de IgG totais de aproximadamente 9.5 vezes em relação ao grupo não suplementado ($p < 0,05$), no

dia 42 o aumento foi de 4 vezes, também comparado ao controle ($p < 0,005$) (Figura 1).

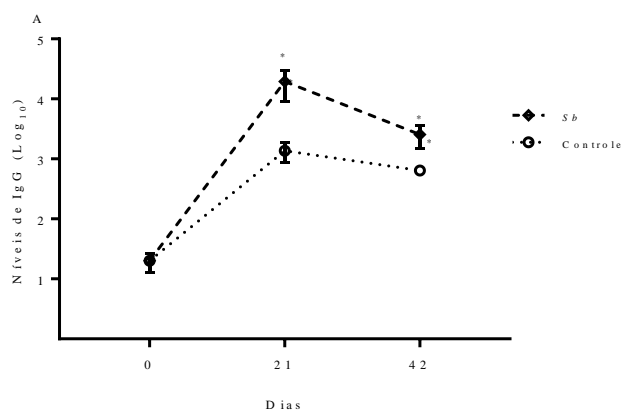


Figura 1: Dinâmica de IgG totais em ovinos vacinados com uma vacina contra *C. chauvoei* e suplementados com o probiótico *S. boulardii*. Os dados representam os valores das médias transformados em log10 e expressos como o recíproco da diluição mais elevada. Os asteriscos significam diferença estatística ($p < 0,05$) entre o grupo *S. boulardii* e Controle nos dias 21 e 42. Análise estatística realizada por two-way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey.

O aumento dos níveis de IgG nos ovinos suplementados com o probiótico demonstram a modulação exercida pelo probiótico, acentuando a resposta da vacina. Segundo CERVIÑO et al. (2011), a resposta mediada pelos anticorpos induzida pela vacinação contra as clostridioses pode ser aceita como um parâmetro imunológico de proteção. Os antígenos somáticos (parede celular) e principalmente os flagelos são os únicos antígenos particulares para os quais há qualquer evidência de envolvimento na indução da imunidade protetora contra o carbúnculo sintomático, além de desempenharem um papel na virulência de *C. chauvoei* (TAMURA et al., 1995; STEVENSON & STRONGER, 1980). Os anticorpos produzidos nesta resposta são importantes na opsonização do patógeno, protegendo os animais da infecção pelo *C. chauvoei* (TAMURA & TANAKA, 1987).

O presente estudo mostra que a suplementação com o probiótico *S. boulardii*, em curto prazo, induziu títulos significativos dos isotipos IgG1 e IgG2 em ovinos, enquanto que o grupo não suplementado apresentou níveis significativamente mais baixos. Em ruminantes, semelhantes a humanos e camundongos, a expressão do isotipo IgG1 parece estar associada a uma resposta Th2, enquanto IgG2 está mais relacionada a uma resposta Th1 (ESTES & BROWN, 2002). Nossos dados sugeriram que a suplementação com probióticos pode ser capaz de desencadear uma resposta imune Th1 / Th2 mista (Figura 2).

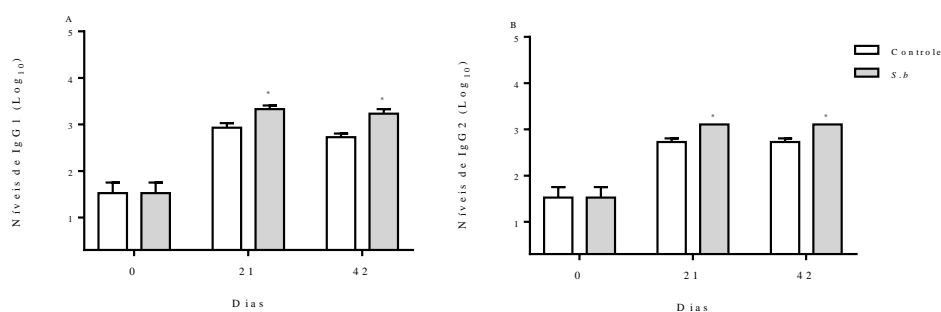


Figura 2: Dinâmica de IgG1(A) e IgG2 (B) em ovinos vacinados contra *C. Chauvoei* e suplementados com *S. Boulardii*. Os dados representam os valores das médias transformados em log10 e expressos como o recíproco da diluição mais elevada. Os asteriscos significam diferença estatística ($p < 0,05$) entre o grupo *S. boulardii* e Controle nos dias 21 e 42. Análise estatística realizada por two-way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey.

4. CONCLUSÕES

A suplementação por um curto período com o probiótico *S. boulardii* aumenta a resposta imune humoral de ovinos vacinados *C. chauvoei*. A suplementação por 5 dias antes da vacinação abre uma nova perspectiva na utilização de probióticos e facilita sua utilização em animais de produção.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD EL-TAWAB, M.M., YOUSSELF, I.M.I., BAKR, H.A., FTHENAKIS, C.G., GIADIMIS, N.D. Role of probiotics in nutrition and health of small ruminants. **Polish Journal Veterinary Science**. 19, 893-906, 2016.
- BANAN-MWINE DALIRI, E., LEE, B.H. New perspectives on probiotics in health and disease. **Food Science Human**. Wellness 4, 56-65, 2015.
- CERVIÑO, M., FIGUERAS, MARTÍN, L., ELVIRA, S., L., CALLUS, M., DOWLUT, S., ENGELHARD, I., CALVO, E., MAKOSCHEY, B. Specific humoral response and effect on rectal temperature of two clostridial vaccines in lambs. **Veterinary Record** 168, 458. 2011.
- ESTES, D. M. BROWN, W. C. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. **Veterinary Immunology Immunopathology**. Nov; 90(1-2):1-10, 2002.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS / WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO), 2002. Guidelines or the Evaluation of Probiotics in Food. Reporto f a Joint FAO/WHO working group on drafting guidelinesfor theevaluation of probiotics in food. Available at: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf?ua=1 > 10 Nov. 2016.
- GROSETH, P.K., ERSDAL, C., BJELLAND, A.M., STOKSTAD, M. Large outbreak of blackleg in housed cattle. **Veterinary Record** 169, 339, 2011
- HILL, C., GUARNER, F., REID, G., GIBSON, G.R., MERENSTEIN, D.J., POT, B., MORELLI, L., CANANI, R. B., FLINT, H.J., SALMINEN, S., CALDER, P.C. AND SANDERS, M.E., The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Gastroenterology and Hepatology** 11: 506-514, 2014.
- JAWHARA, S., POULAIN, D., *Saccharomyces boulardii* decreases inflammation and intestinal colonization by *Candida albicans* in a mouse model of chemically-induced colitis. **Medical Mycology** 45, 691-700, 2007.
- NAGANO, N., ISOMINE, S., KATO, H., SASAKI, Y., TAKAHASHI, M., SAKAIDA, K., NAGANO, Y., ARAKAWA, Y. Human fulminant gas gangrene caused by *Clostridium chauvoei*. **Journal Clinical Microbiology**, 46, 1545-1547, 2008.
- UZAL, F.A. Evidence-based medicine concerning efficacy of vaccination against *Clostridium chauvoei* infection in cattle. **Veterinary Clinical North Amercian Food Animal Practice**. 28, 71-77, 2012.
- ROOS, T.B., MORAES, C.M., STURBELLE, R.T. DUMMER, L.A., FISCHER, G., LEITE, F.P.L. Probiotics *Bacillus toyonensis* and *Saccharomyces boulardii* improve the vaccine imune response to Bovine herpesvírus type 5 in sheep. **Research Veterinary Science** 117, 260-265, 2018.
- STEVENSON, J.R., STONGER, K.A. Protective cellular antigen of *Clostridium chauvoei*. **American Journal Veterinary Research**. 41, 650-653, 1980.
- SILVEIRA, M.M., CONCEIÇÃO, F.R., MENDONÇA, M., MOREIRA, G.M., DA CUNHA, C.E., CONRAD, N.L., OLIVEIRA, P.D., HARTWIG D.D., DE LEON P.M., MOREIRA A.N. *Saccharomyces boulardii* improves humoral immune response to DNA vaccines against leptospirosis. **Journal of Medical Microbioly**, 66, 184-190, 2017.
- TAMURA, Y., KIJIMA-TANAKA M., AOKI, A., OGIKUBO, Y, TAKAHASHI, T. Reversible expression of motility and flagella in *Clostridium chauvoei* and their relationship to virulence. **Microbiology** 141, 605-610, 1995.
- TAMURA, Y., TANAKA, M. Opsonic Activity of Anti-flagellar Serum against *Clostridium chauvoei* by Mouse Polymorphonuclear Leucocytes. **Veterinary Microbiology** 14, 81-86, 1987.