

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação Do Efeito De Posbióticos Na Resposta Imune
Da Vacina B19 Em Bezerras Nelore

Autora: Caroline Paes dos Santos
Orientadora: Dr^a. Carina Elisei de Oliveira
Co-orientador: Dr. Heitor Miraglia Herrera

Campo Grande
Mato Grosso do Sul

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação Do Efeito De Posbióticos Na Resposta Imune
Da Vacina B19 Em Bezerras Nelore

Autora: Caroline Paes dos Santos
Orientadora: Dr^a. Carina Elisei de Oliveira
Co-orientador: Dr. Heitor Miraglia Herrera

"Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: Biotecnologia

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Julho-2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade Católica Dom Bosco
Bibliotecária Mourâmise de Moura Viana - CRB-1 3360

S237 Santos, Caroline Paes dos
Avaliação do efeito de posbióticos na resposta imune da vacina B19 em bezerras Nelore/ Caroline Paes dos Santos, sob orientação da Profa. Dra. Dra. Carina Elisei de Oliveira. -- Campo Grande, MS : 2021.
81 p.: il.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande-MS, Ano 2021
Bibliografia: p. 23-30

1. Suplementação animal - Antígeno solúvel - Bezerros.
2. Imunidade celular - Biotecnologia. I.Oliveira, Carina Elisei de. II. Título.

CDD: 660.6

**"AVALIAÇÃO DO EFEITO DE POSBIÓTICO NA RESPOSTA IMUNE DA
VACINA B19 EM BEZERRAS NELORE"**

Autora: Caroline Paes dos Santos

Orientadora: Prof^ª. Dr.^ªCarina Elisei de Oliveira

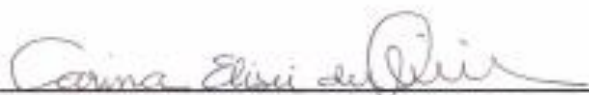
Coorientador: Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia.

APROVADO em 12 de julho de 2021.

A presente defesa foi realizada por webconferência. Eu, Carina Elisei de Oliveira, como presidente da banca assinei a folha de aprovação com o consentimento de todos os membros, ainda na presença virtual destes. A Web conferência foi gravada e o link (meet.google.com/npk-bute-mfa) ficará disponível por três anos, a partir da data de realização da mesma.



Dr^ª. Carina Elisei de Oliveira (orientadora) – UCDB

Dr. Heitor Miraglia Herrera (coorientador) - UCDB

Dr^ª. Cristiano Marcelo Espinola Carvalho - UCDB

Dr. Pedro Fernandez LLário – Universidade Extremadura

Ensinou a amar a vida, não desistir de lutar, renascer da derrota,
renunciar às palavras e pensamentos negativos.
Acreditar nos valores humanos e a ser otimista.
Aprendi que mais vale tentar do que recuar...
Antes acreditar que duvidar, o que vale na vida não é o ponto de
partida e sim a nossa caminhada.

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pela vida e pelos caminhos. Por me permitir chegar até aqui e pelos anjos que colocou em meu caminho;

Á minha querida orientadora, Dra. Carina Elisei de Oliveira, por ter me acolhido em seu grupo, por me incentivar e aceitar minhas ideias, por todo o conhecimento compartilhado, que sem dúvidas me fizeram crescer e mudaram minha forma de ver a ciência;

Aos meus pais, Gleice e Wagner, por todo o amor e apoio, por me incentivarem a buscar o conhecimento e por me mostrar que nunca estou sozinha. Sem vocês, nada disso seria possível;

Á minha família, por todo carinho e preocupação;

Ao Vitor, por todos os momentos incríveis que vivemos, por todo o auxílio e por sempre ter acreditado em mim;

Ao meu co-orientador, Dr. Heitor Herrera, por ter confiado a mim esse trabalho e possibilitado a realização do mesmo;

Ao Prof. Carlos Alberto, Prof. Ludovico Migliolo, Breno Frihling, Filipe Martins e Carolina Trindade, pelo auxílio no desenvolvimento e realização dos experimentos;

Aos amigos e colegas, agradeço pelos momentos de descontração, pelas palavras de apoio e incentivo;

Aos colaboradores e técnicos, que sempre estiveram dispostos a me ajudar e a solucionar os problemas do caminho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) pelo apoio financeiro, assim como à Universidade Católica Dom Bosco, pela estrutura que tornou possível a realização desse trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Nascida em Ponta Porã, no dia 03 de outubro de 1998, Caroline Paes dos Santos é filha de Gleice Kelly Crespo Paes dos Santos e Wagner Batista dos Santos. Possui o título de Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), onde concluiu o curso no ano de 2018 e atualmente é mestranda em Biotecnologia pela Universidade Católica Dom Bosco (UCDB). Iniciou a trajetória na pesquisa como aluna de Iniciação Científica do Grupo de Pesquisa em Biologia Molecular de Micro-organismos, com linha de pesquisa em mecanismos de resistência de bactérias isoladas de amostras clínicas, e desenvolvimento de técnicas de diagnóstico.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUÇÃO.....	1
1. <i>Brucella</i>	2
2. Brucelose.....	4
3. Resposta Imune.....	6
4. Epidemiologia da brucelose no Brasil.....	7
5. Diagnóstico.....	10
a. Diagnóstico direto.....	11
b. Diagnóstico indireto.....	12
6. Vacinação contra brucelose.....	14
a. B19.....	16
b. RB51.....	18
7. Probiótico e Pósbióticos.....	19
a. Uso de posbióticos na produção animal.....	22
REFERÊNCIAS.....	24
OBJETIVOS.....	32
Capítulo 1 - Desenvolvimento de I-ELISA baseado no antígeno solúvel de <i>Brucella abortus</i> S2308 para detecção de IgG anti-<i>Brucella</i> bovina.....	33
RESUMO.....	33
1. INTRODUÇÃO.....	34
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
2.1 Cepas Bacterianas.....	36
2.2 Amostras De Soro.....	36
2.3 Teste Antígeno Acidificado Tamponado (AAT).....	36

2.4 Preparo Do Antígeno Solúvel De <i>Brucella abortus</i> S2308.....	37
2.5 SDS-PAGE E Western Blot	37
2.6 Ensaio Indireto De Imunoadsorção Enzimatica Indireto: I-ELISA.....	38
2.7 Análises Matemáticas E Estatísticas	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
3.1 Perfil imunorreativo.....	40
3.2 Validação do teste	41
4. CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS.....	46
Capítulo 2 - Use of postbiotics as an immunomodulatory of the immune response against brucellosis in Nellore calves immunized with S 19 vaccine	49
ABSTRACT.....	49
1. INTRODUCTION	50
2. MATERIAL AND METHODS / EXPERIMENTAL	52
2.1 Experimental Design.....	52
2.2 Sampling.....	53
2.3 Evaluation of cellular immune response	53
2.4 Evaluation of humoral immune response.....	53
2.5 Statistical Analysis.....	55
3. RESULTS AND DISCUSSION	55
3.1. Cellular Immune Response.....	55
3.2. Humoral Immune Response	57
4. CONCLUSION.....	60
REFERENCES	62

LISTA DE TABELAS

Página

Capítulo 1

Tabela 1 – Comparação dos resultados obtidos pelo Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e do I-ELISA baseado no antígeno solúvel de <i>B. abortus</i> S2308.....	42
---	----

Capítulo 2

Table1 – White blood cell counting in Nellore calves treated with postbiotics.....	56
--	----

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1 – Representação esquemática da molécula de lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana de bactérias do gênero *Brucella* spp. A cepa lisa, representada pelas bactérias (*B. abortus*, *B. suis* e *B. melitensis*) possuem a molécula de LPS completa, enquanto as cepas rugosas há ausência do antígeno O e o LPS é incompleto (*B. canis* e *B. ovis*).....4

Figura 2 – Esquema de transmissão de *brucella abortus* em bovinos e humanos. A principal fonte de infecção no campo são fêmeas de bovinos infectadas, que eliminam a bactéria em secreções biológicas e abortos, que contaminam o ambiente. Os humanos se infectam, por meio de alimentos contaminados, manipulação de animais infectados, vacinas e trabalhadores de laboratórios, que tem contato direto com colônias de *Brucella*.....5

Figura 3 – Mapa representativo do Brasil, a – prevalência de casos de brucelose bovina por UF; b- prevalência de focos de brucelose bovina por UF. Fonte: MAPA, 2020.....9

Figura 4 – Fluxograma para diagnóstico de brucelose bovina de acordo com o PNCEBT. Fonte: BRASIL, 2006.11

Capítulo 1

Figura 1 – (A) Análise da fração solúvel de *Brucella abortus* S2308 através de SDS-PAGE 12% corado com nitrato de prata. M: Marcador de massa molecular (kDa), 2308: Antígeno solúvel de *B. abortus* S2308. (B) Western blot representando as proteínas imunorreativas do antígeno solúvel de *B. abortus* S2308.....40

Figura 2- Amostras de soro bovino submetidas ao teste I-ELISA para detecção de anticorpos contra brucelose bovina (n=134). O eixo horizontal

representa	o	valor	de	<i>cut-off</i>	de
0,666.....					41

Capítulo 2

Figure 1 - Values of the optical density of IgG anti-Brucella antibodies by the indirect ELISA method at 490nm using Multiskan™ GO UV/Vis microplate spectrophotometer.....	57
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AAT – Antígeno Acidificado Tamponado

AGCC – Ácidos Graxos de Cadeia Curta

ANOVA – Análise de Variância

ATP – Adenosina Trifosfato

Bcsp – *Brucella* Cell Surface Protein

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CD4⁺/CD8⁺ - Grupamento de Diferenciação 4⁺/8⁺

CO² - Gás Carbônico

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

Ery - Eritritol

FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

FC – Fixação do Complemento

FPA – Teste de Polarização Fluorescente

HCl – Ácido Clorídrico

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IBGE – Instituto Brasileiro

I-ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Indireto

IFN- γ – Interferon- γ

IL - Interleucina

InRum – *Ingulbal Ruminant*®
InPro – *Ingulbal Protein*®
IS711 – Insertion Sequence 711
LPS - Lipopolissacarídeo
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
Mm – Milímetros
Mp - Milipolarização
NB-3 – Nível de Biossegurança 3
OD – Optical Density
OIE – Organização Mundial da Saúde Animal
Omp – Outer Membrane Protein
OPD - o-Phenylenediamine dihydrochloride
ORF – Open Reading Frames
Nm - Nanomêtro
Pb – Pares de Base
PBS – Phosphate Buffered Saline
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
pH – Potencial Hidrogeniônico
PIB – Produto Interno Bruto
PNCEBT – Plano Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose
RumPro – *Ingulbal Ruminant*® + *Ingulbal Protein*®
Rpm – Rotações por Minuto
SAL – Soroaglutinação Lenta
SDS – Sodium Dodecyl Sulphate
Spp - espécie
TAL – Teste do Anel do Leite
TCR – Receptor de Células T

Th1 – T helper tipo 1

TSB – Tryptic Soy Broth

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral

T_{reg} – T regulatório

UCDB – Universidade Católica Dom Bosco

UF – Unidade Federativa

WBC – White Blood Cells

2-ME – 2- mercaptoetanol

ng - Nanograma

μ L - Microlitros

μ m - Micrómetro

$^{\circ}$ C – Graus Celsius

RESUMO

A brucelose é uma doença infecciosa de grande importância para a saúde pública e a produção animal mundial. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade imunomoduladora de um posbiótico em bezerras Nelore imunizadas com a cepa vacinal B19. Para isso, 40 bezerras soronegativas e com ausência de DNA de *Brucella* spp. circulantes foram submetidas a quatro tratamentos: InRum (*Ingulbal Ruminant*®); InPro (*Ingulbal Protein*®); RumPro (*Ingulbal Ruminant*® e *Ingulbal Protein*®); e controle. As coletas de material biológico foram realizadas no início do tratamento (T0) e aos 15 (T1), 45 (T2), 75 (T3) e 105 (T4) dias. Em T1, a suplementação com posbiótico foi suspensa e todos os animais receberam a vacina obrigatória B19. Para avaliação da resposta celular, as médias de glóbulos brancos, linfócitos, monócitos e neutrófilos foram determinados. Um teste I-ELISA baseado em antígeno solúvel de *B. abortus* S2308 foi desenvolvido para determinar os níveis de IgG total. InRum apresentou aumento significativo na contagem de linfócitos após 45 dias de tratamento; entretanto, o estímulo na produção de IgG foi significativo apenas em 15 dias do início do tratamento. O grupo InPro apresentou proliferação significativa de linfócitos nos dias 45 e 75, aumento de neutrófilos nos 105 dias e alta produção de níveis de IgG durante todo o período após T1. RumPro resultou em estímulo significativo na produção de anticorpos a partir de 75 dias após o início do tratamento e permaneceu até o final do experimento. Nossos resultados sugerem que a suplementação com posbiótico é uma alternativa promissora para modular a resposta imune celular e humoral quando associado com a vacina B19 contra a brucelose bovina.

Palavras-chave: antígeno solúvel, bezerras, imunidade celular, imunidade humoral, I-ELISA.

ABSTRACT

Brucellosis is an infectious disease of great importance for public health and animal production worldwide. The aim of this study was to evaluate the immunomodulatory capacity of a postbiotic in Nellore calves immunized with S19 vaccine strain. For this, 40 seronegative calves with absence of *Brucella* spp. DNA circulating were subjected to four treatments: InRum (*Ingulbal Ruminant*®); InPro (*Ingulbal Protein*®); RumPro (*Ingulbal Ruminant*® and *Ingulbal Protein*®); and control. The collections of biological material were carried out at the beginning of the treatment (T0) and at 15 (T1), 45 (T2), 75 (T3) and 105 (T4) days. At T1, postbiotic supplementation was suspended and all animals received the mandatory S19 vaccine. To assess the cellular immune response, the means of white blood cells, lymphocytes, monocytes and neutrophils were determined. An I-ELISA test based on soluble *B.abortus* S2308 antigen was developed to determine total IgG levels. InRum showed a significant increase in lymphocyte count after 45 days of treatment; however, the stimulation of IgG production was significant only 15 days after the start of treatment. The InPro group showed significant lymphocyte proliferation on days 45 and 75, increased neutrophils on days 105 and high production of IgG levels throughout the period after T1. RumPro resulted in significant stimulation of antibody production from 75 days after the start of treatment and remained until the end of the experiment. Our results suggest that postbiotic supplementation is a promising alternative to modulate the cellular and humoral immune response when associated with S19 vaccine against bovine brucellosis.

Keywords: calves, cellular immunity, I-ELISA, humoral immunity, soluble antigen.

INTRODUÇÃO

A brucelose bovina causada por *Brucella abortus* é uma zoonose persistente em alguns países da Europa Mediterrânea, norte e leste da África, Ásia central e na América Central e do Sul, ocupando o 3º lugar entre doenças zoonóticas mais negligenciadas (PANDEY *et al.*, 2016; HOP *et al.*, 2016). Ao causar infecções no sistema reprodutor, a brucelose bovina induz aborto no último trimestre da gestação, redução da fertilidade, aborto, declínio de peso e diminuição na produção de leite, sendo responsável por grandes perdas econômicas (YOUSEFI-NOORAIE *et al.*, 2012; FRANC *et al.*, 2018; CARVALHO NETA *et al.*, 2010).

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina, criado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em 2001, estabelece a vacinação obrigatória de bezerras entre 03 e 08 meses de idade com a vacina atenuada *Brucella abortus* B19 além de uma estratégia de certificação de propriedades livres e monitoradas (BRASIL, 2006; POESTER *et al.*, 2009). Embora, essas ações contribuam de forma significativa com os programas de controle e erradicação da brucelose, a vacina B19 apresenta uma eficiência de aproximadamente 70% no rebanho (LUBROTH *et al.*, 2007).

Nesse contexto, o uso de posbióticos pode auxiliar na potencialização da eficácia de B19, pois atuam como imunomoduladores, através do balanço na produção de citocinas pró e anti-inflamatória (BERMUDEZ-BRITO *et al.*, 2012). Os posbióticos referem-se aos fatores solúveis liberados pelas bactérias probióticas vivas ou após a lise celular são capazes de conferir benefícios ao consumidor, ao mimetizar os mecanismos de ação dos probióticos convencionais, além de apresentar vantagens de segurança, por não se tratar de um organismo vivo, ou seja, não há risco de translocação

microbiana, infecção ou resposta inflamatória e possibilidade de transmissão de genes de resistência (WEGH *et al.*, 2019).

1. *Brucella*

O gênero *Brucella* foi descoberto em 1887, por David Bruce, o médico que relatou o primeiro isolado de *Micrococcus melitensis* em soldados americanos na Ilha de Malta (GODFROID *et al.*, 2005). Em 1897, Bernhard Bang isolou e identificou *Bacterium abortus* como causador de infecções em bovinos, equinos, caprinos e ovinos, mas apenas em 1917, Alice C. Evans comparou a morfologia dos isolados e identificou a semelhança entre *M. melitensis* e *B. abortus*, concluindo que pertenciam ao mesmo grupo (NICOLETTI, 2002). Por fim, em 1920, Karl F. Meyer criou oficialmente o gênero *Brucella* nome em homenagem à David Bruce (LEÓN, 1994).

Pertencente ao filo Protobacteria, classe Alphaprotobacteria, ordem Rhizobiales, família Brucellaceae, estima-se que o gênero apresente 12 espécies, com aproximadamente 94% de similaridade genética, sendo as variações associadas às diferenças fenotípicas e de predileção por hospedeiros naturais (DWIGHT and BOWMAN, 2011; PERKINS *et al.*, 2010). Dentre as espécies e seus respectivos hospedeiros, temos: *Brucella abortus* (bovinos), *Brucella melitensis* (caprinos), *Brucella canis* (cães), *Brucella ovis* (ovinos), *Brucella suis* (suínos), *Brucella neotomae* (ratos do deserto), *Brucella ceti* e *Brucella pinnipedialis* (mamíferos aquáticos), *Brucella microti*, *Brucella inopinata* (isolada de humanos), *Brucella papionis* (babuínos) e *Brucella vulpis* (GALIŃSKA E ZAGÓRSKI, 2013; WHATMORE *et al.*, 2014; SCHOLZ *et al.*, 2016).

As bactérias do gênero *Brucella* são cocobacilos Gram-negativos, aeróbicos, não capsulados, não esporulados, com aproximadamente 0,6-

1,5µm, geralmente não formam pares ou cadeias de células, são imóveis, por não possuírem flagelos (ALTON, 1998). Além de serem patógenos intracelulares facultativos, que sobrevivem e se multiplicam no interior de macrófagos durante a infecção, além de se adaptar facilmente em pH ácido, baixos níveis de oxigênio e de nutrientes (KÖHLER *et al.*, 2002).

Mesmo possuindo o metabolismo aeróbico, algumas espécies necessitam de uma atmosfera com 5 a 10% de CO². O crescimento ocorre a 37°C, em meios ricos com pH variando entre 6,6 e 7,4. As colônias tornam-se visíveis em 72 horas, e podem apresentar-se em duas formas: colônias lisas ou rugosas. Essa diferença estrutural ocorre devido ao lipopolissacarídeo (LPS) (ALTON, 1998), que apresenta dois domínios: a porção antigênica chamada cadeia O e a porção tóxica, chamada lipídeo A (Figura 1).

A molécula completa de LPS é considerada completa quando possui os dois domínios e está presente nas colônias lisas de *Brucella*, enquanto que nas colônias rugosas, há ausência de antígeno-O e a molécula de LPS é incompleta (LAPAQUE *et al.*, 2005). A sobrevivência e replicação das bactérias de linhagens lisas no interior de macrófagos nos animais infectados acontecem de forma mais eficiente do que das linhagens rugosas. Acredita-se que este fato ocorra devido à presença do antígeno-O nas linhagens lisas, o qual é descrito como importante fator de virulência (DORNELES *et al.*, 2015).

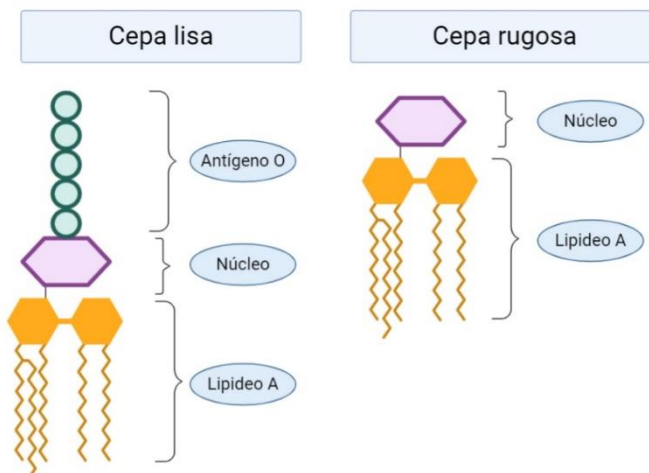


FIGURA 1 — REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MOLÉCULA DE LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) PRESENTE NA MEMBRANA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *BRUCELLA* SPP. A CEPA LISA, REPRESENTADA PELAS BACTÉRIAS (*B. ABORTUS*, *B. SUIIS* E *B. MELITENSIS*) POSSUEM A MOLÉCULA DE LPS COMPLETA, ENQUANTO AS CEPAS RUGOSAS HÁ AUSÊNCIA DO ANTÍGENO O E O LPS É INCOMPLETO (*B. CANIS* E *B. OVIS*).

2. Brucelose

A brucelose é uma zoonose causada por bactérias do gênero *Brucella*, podendo causar infecções em animais domésticos, silvestres e em seres humanos (PAPAS, 2010). Embora seja uma doença controlada em alguns países, ainda existem regiões onde a infecção persiste, principalmente em países da Europa Mediterrânea, norte e leste da África, Ásia central e na América Central e do Sul, ocupando o 3º lugar entre doenças zoonóticas mais negligenciadas (PANDEY *et al.*, 2016; TAN HOP *et al.*, 2016).

A brucelose bovina, causada por *B. abortus*, pode atingir tanto o gado de corte quanto o gado de leite. A principal via de infecção é via oral, mas também pode ocorrer via respiratória, conjuntival ou venérea (Figura 2) (PAIXÃO *et al.*, 2009). Entre as manifestações clínicas da brucelose, ao atingir a maturidade sexual, os sintomas aparecem nos órgãos reprodutores e levam a casos de aborto no último trimestre de gestação ou nascimento de fetos natimortos, placentite necrotizante e retenção placentária que podem

ocasionar infertilidade temporária ou permanente das vacas infectadas (XAVIER *et al.*, 2009; CARVALHO NETA *et al.*, 2010). Em touros, *B. abortus* causa usualmente epididimite, orquite e artrites (CORBEL *et al.*, 2006).

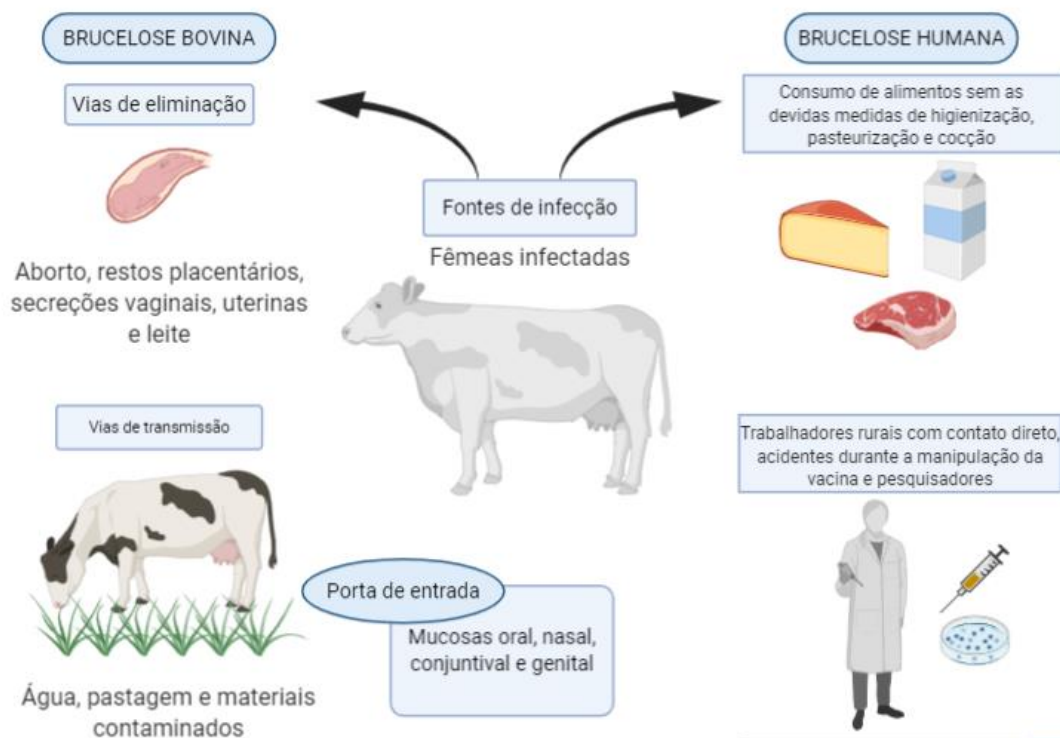


FIGURA 2 – ESQUEMA DE TRANSMISSÃO DE *BRUCELLA ABORTUS* EM BOVINOS E HUMANOS. A PRINCIPAL FONTE DE INFECÇÃO NO CAMPO SÃO FÊMEAS DE BOVINOS INFECTADAS, QUE ELIMINAM A BACTÉRIA EM SECREÇÕES BIOLÓGICAS E ABORTOS, QUE CONTAMINAM O AMBIENTE. OS HUMANOS SE INFECTAM, POR MEIO DE ALIMENTOS CONTAMINADOS, MANIPULAÇÃO DE ANIMAIS INFECTADOS, VACINAS E TRABALHADORES DE LABORATÓRIOS, QUE TEM CONTATO DIRETO COM COLÔNIAS DE *BRUCELLA*.

Considerando a capacidade de infectar o homem, as espécies de *Brucella* são classificadas em diferentes potenciais zoonóticos, sendo *B. melitensis* a mais patogênica para o homem, seguida por *B. abortus* e *B. suis* e por fim, *B. canis* com menor capacidade de infectar o homem. Por outro lado, *B. ovis* não é considerada patogênica para humanos (XAVIER *et al.*, 2009 e 2010). A brucelose humana, com incidência anual de 500.000 casos, também conhecida como febre ondulante, febre de Malta ou febre

mediterrânea tem como principal fonte de infecção o consumo de produtos lácteos não pasteurizados e infecção acidental por meio de manipulação de cepas vacinais vivas atenuadas ou cepas virulentas mantidas em laboratório para pesquisas (CORBEL, 2006; CARVALHO NETA *et al.*, 2010; HOP *et al.*, 2016). As principais complicações da infecção no ser humano são osteomielites, artrites, espondilites, neurobrucelose e endocardite (PENDELA *et al.*, 2017).

3. Resposta Imune

A infecção por *Brucella* nos animais induz uma resposta imune humoral e celular, sendo que a magnitude e a duração desta resposta podem ser afetadas por fatores como: virulência da amostra, inóculo, idade, sexo, gestação, estado imune e espécie animal (SUTHERLAND, 1980). Em infecções intracelulares, como é o caso da brucelose, a resposta via sistema imune inato é a primeira ação de defesa do organismo, sendo capaz de inibir a replicação, reduzir a carga bacteriana e eliminar o microrganismo. A detecção da invasão é realizada quando os padrões expressos pelos patógenos são reconhecidos pelas células dos hospedeiros, desencadeando uma série de eventos visando a eliminação dos mesmos (DIACOVICH E GORVEL, 2010).

As espécies de *Brucella* possuem a habilidade de invadir células hospedeiras, sendo um passo fundamental de sua patogênese, além da capacidade de escapar da vigilância imunológica do hospedeiro, favorecendo assim, sua sobrevivência e proliferação. Sendo assim, para que a resposta imune seja eficaz na proteção, a imunidade celular é de extrema importância para a resistência do hospedeiro em casos de brucelose (HOP *et al.*, 2016). A resposta celular preferencial ao combate de patógenos intracelulares é caracterizada pela predominância de resposta celular T

auxiliar tipo 1 (Th1), que inclui IFN- γ produzido por células T com receptor TCR (CD4+ ou CD8+), anticorpo IgG2 produzido por células B e células T CD8+ citotóxicas (MANTEGAZZA *et al.*, 2013).

A exata contribuição da imunidade humoral na resistência contra brucelose ainda não está bem estabelecida. O antígeno O da molécula de LPS parece ser o antígeno imunodominante de cepas lisas de *B. abortus*, uma vez que maior proporção da resposta de anticorpos em infecções humanas e animais, bem como após imunizações com vacinas atenuadas, é dirigido contra o antígeno O (DORNELES *et al.*, 2015). Normalmente, moléculas como o LPS ativam as células B de uma maneira independente de células T. No entanto, o LPS de *B. abortus* é capaz de se ligar a moléculas de MHC classe II em linfócitos B, sugerindo que sejam eventualmente apresentados as células T (JEZI *et al.*, 2019).

Tanto no homem como nos animais, a infecção natural estimula o aparecimento simultâneo ou ligeiramente diferenciado de imunoglobulinas (Ig) das classes IgM e IgG. A resposta de IgM é rapidamente induzida 2-3 semanas após a exposição e pode desaparecer após alguns meses. Os níveis de IgG total permanecem mesmo após o pico da resposta, que ocorre entre 3 e 4 semanas após a infecção (GODFROID *et al.*, 2010). A cinética de produção e desaparecimento dos principais isotipos de imunoglobulina durante a infecção permite a distinção entre infecções crônicas e agudas. A presença concomitante de IgM e IgG sugere brucelose aguda, enquanto a brucelose crônica é caracterizada pela presença de IgG sozinho. O desaparecimento da IgG significa, geralmente, a eliminação da infecção (MEGID *et al.*, 2000).

4. Epidemiologia da brucelose no Brasil

Considerada uma zoonose de destaque na agropecuária, devido sua importância econômica (DÍAZ, 2013), a brucelose tem sido relacionada com prejuízos por causar redução da fertilidade, aborto, declínio de peso e diminuição na produção de leite (YOUSEFI-NOORAIE *et al.*, 2012; FRANC *et al.*, 2018). A ocorrência da brucelose bovina no território brasileiro, teve seu primeiro relato em 1914, no estado do Rio Grande do Sul (CORTEZ DE SÁ, 2011) e de acordo com os últimos registros, a prevalência de focos entre as Unidades Federativas em 2009, variou entre 0,91% e 30,6% (MAPA, 2020).

O Brasil possui o maior rebanho comercial e ocupa o cargo de líder na exportação de carne mundial. Anualmente, estima-se que a brucelose cause uma perda econômica nacional em torno de R\$892 milhões, que representa 0,3201% do PIB referente a produção animal. Cada 1% de variação na prevalência de brucelose, acarreta em um déficit de R\$ 155 milhões para o país (SANTOS *et al.*, 2013).

Desde 2001, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) atua com ações de controle e prevenção de brucelose através do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCET), afim de determinar as melhores estratégias de contenção da doença, tendo em vista a frequência e distribuição de brucelose nas populações estudadas; além de permitir o acompanhamento da situação epidemiológica de brucelose no país (POESTER *et al.*, 2009). Para atingir esse objetivo, o PNCETB introduziu a vacinação obrigatória contra brucelose bovina e bubalina em todo o território nacional e definiu uma estratégia de certificação de propriedades livres e monitoradas (BRASIL, 2006).

O Mato Grosso do Sul possui um efetivo bovino de 24,5 milhões de cabeças de gado, equivalente a 12% do rebanho brasileiro (IBGE, 2019). Estudo realizado em 2009 apresentou a prevalência de focos de brucelose em 30,6% das propriedades rurais e 7,93% de animais soropositivos, e

segundo a classificação das UF de acordo com grau de risco para brucelose e tuberculose realizada pelo PNCEBT, o estado se apresenta na classe D, ou seja, prevalência de foco $\geq 10\%$ (MAPA, 2020). Ainda de acordo com MAPA, entre 2014 e 2018 o Estado do Mato Grosso do Sul alcançou o índice de vacinação acima do mínimo recomendável, variando entre 81,5% e 89% e tomando a média dos últimos cinco anos verifica-se que o estado alcançou coberturas vacinais acima de 80%.

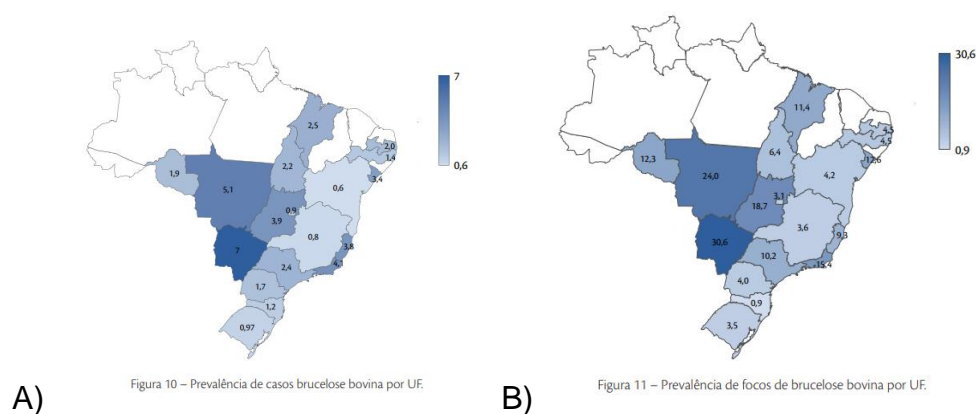


FIGURA 3 – MAPA REPRESENTATIVO DO BRASIL, A – PREVALÊNCIA DE CASOS DE BRUCELOSE BOVINA POR UF; B- PREVALÊNCIA DE FOCOS DE BRUCELOSE BOVINA POR UF. FONTE: MAPA, 2020.

Dentre as regiões do Estado, as propriedades rurais da região do Pantanal sul-mato-grossense exercem essencialmente atividades relacionadas ao gado de corte, sendo o estrato com maior prevalência de focos de brucelose, chegando aos 59% entre as propriedades testadas e 12,6% de animais soropositivos (CHATE *et al.*, 2009). Considerando as perdas devidas à brucelose bovina no Brasil em R\$ 420,12 ou R\$ 226,47 para cada fêmea infectada acima de 24 meses de idade em rebanhos de leite ou corte, respectivamente, estima-se o prejuízo de R\$ 116 milhões, apenas na região do Pantanal (SANTOS *et al.*, 2013).

5. Diagnóstico

O diagnóstico clínico da brucelose é um fator crítico para o acompanhamento epidemiológico da doença, sendo o principal aliado na eliminação de novas fontes de infecção (BARBOSA, 2009). Os testes disponíveis são divididos em métodos diagnósticos diretos, que incluem o isolamento e identificação do agente, e indiretos ou sorológicos, que visam demonstrar a presença de anticorpos anti-*Brucella* nos fluidos corporais (BRASIL, 2006).

Os testes ainda podem ser classificados como teste para triagem, monitoramento e confirmação da doença no animal. O PNCEBT estabelece o Teste de Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) como teste de triagem, o Teste de Anel em Leite (TAL) como teste de monitoramento e os testes de 2-mercaptoetanol, Fixação do Complemento (FC) e Teste de Polarização Fluorescente (FPA) como testes confirmatórios (Figura 4). Os animais reagentes ao teste são retirados do rebanho e encaminhados para o abate sanitário ou eutanásia (BRASIL, 2006).

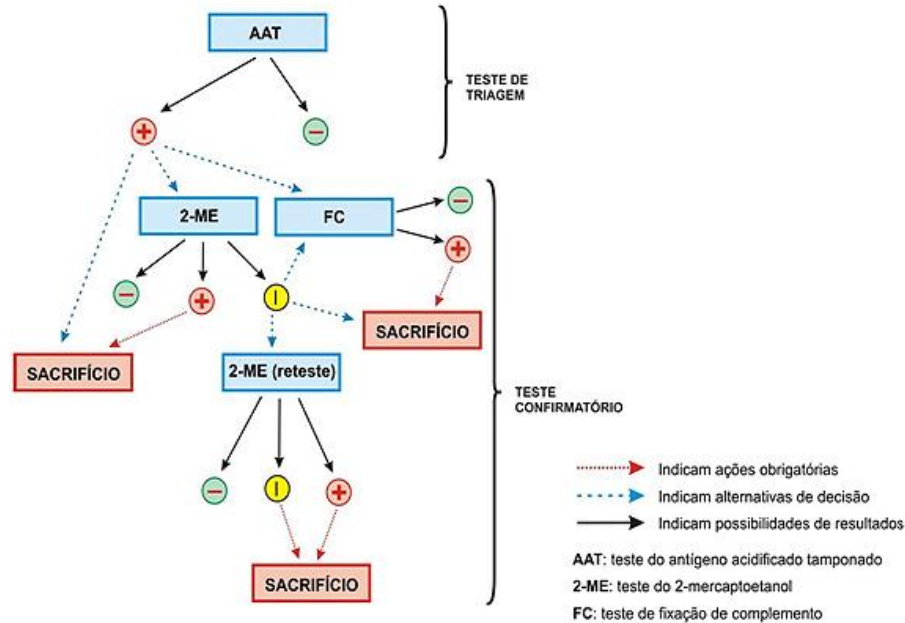


FIGURA 4 – FLUXOGRAMA PARA DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE BOVINA DE ACORDO COM O PNCEBT. FONTE: BRASIL, 2006.

a. Diagnóstico direto

O isolamento e identificação de *B. abortus* a partir de secreções biológicas e materiais de abortos são considerados o padrão ouro de diagnóstico da brucelose. No entanto, o resultado só é satisfatório se houver o correto armazenamento e transporte do material biológico a ser avaliado, necessita de laboratórios de nível de biossegurança NB-3 e equipe habilitada. Considerando que colônias de *Brucella* spp. apresentam crescimento lento, de 48 a 72 horas, torna-se um processo moroso e devido ao risco de contaminação durante o processamento, são poucos laboratórios que adotam essa prática (POESTER *et al.*, 2005).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é capaz de detectar fragmentos de DNA de *B. abortus* em diversos materiais biológicos, sendo eles tecidos, fluidos e secreções sem a necessidade de isolamento do agente. Apresenta alta sensibilidade e especificidade, sendo capaz de

identificar as amostras à nível de biovares e possibilita a diferenciação da cepa selvagem e vacinal (KEID *et al.*, 2007). Entre os genes alvos na identificação de *Brucella* spp. estão: *omp2a*, *omp2b* e *omp31* (genes que codificam proteína externa de membrana) (IMAOKA *et al.*, 2007); região *IS711* (BRICKER E HAILING, 1995); gene *bcsp 31* (BAILY *et al.*, 1992); dentre outros. Para diferenciação da cepa vacinal, utiliza-se o gene ligado ao catabolismo do eritritol, o qual apresenta uma deleção de 702 pb na cepa vacinal (SANGARI *et al.*, 1994).

b. Diagnóstico indireto

Os testes sorológicos não apresentam sensibilidade e especificidade absoluta, portanto, aconselha-se a associação de técnicas afim de obter-se um diagnóstico mais confiável. Existem relatos de reações cruzadas entre as cepas lisas de *Brucella* e outras bactérias, tais como *Yersinia enterocolitica* O:9, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Francisella tularensis* e *Vibrio cholerae*, provavelmente decorrido do compartilhamento de epítomos, gerando resultados falsos positivos para esses testes (NIELSEN *et al.*, 2004; MINHARRO *et al.*, 2009). Outra razão para ocorrência de resultados falsos positivos é a vacinação com B19 após a idade recomendada, pois essa pratica induz a produção de anticorpos persistentes (NICOLETTI, 1981).

O teste Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) é uma prova qualitativa rápida e prática, com boa sensibilidade e baixo custo, razão pela qual é empregado como teste de triagem. Baseia-se em uma solução de antígeno a 8%, tamponado em pH ácido (3,65) e corado com Rosa de Bengal. Seu pH ácido é inibe a aglutinação do antígeno por IgM, sendo assim, nesse teste reagem apenas imunoglobulinas do tipo IgG1, sendo capaz de diagnosticar animais recentemente infectados e mesmo em fase crônica (MEGID *et al.*, 2000).

O Teste de Anel em Leite (TAL) geralmente é utilizado para monitoramento do rebanho, sua alta sensibilidade permite que nessa técnica seja utilizada a mistura de leite de vários animais. Emprega-se como antígeno células inteiras de *B. abortus* coradas com hematoxilina. Baseia-se na formação de uma malha de complexos antígeno-anticorpo, que são arrastados pela gordura, formando um anel azulado na camada superior do leite, indicando reação positiva (SILVA JUNIOR *et al.*, 2007).

O 2-mercaptoetanol (2-ME) é um teste capaz de detectar apenas a presença de IgG no soro, característico da infecção crônica. Sempre deve ser realizado associado ao teste de Soroaglutinação Lenta em Tubo (SAL). O reagente 2-mercaptoetanol possui radicais de tiol, responsáveis pela degradação de IgM do soro, inibindo a aglutinação por essa imunoglobulina. Os resultados são obtidos através da diferença entre os títulos de soro sem tratamento e os tratados com 2-ME, no entanto, o animal só é considerado infectado quando o resultado em ambos os testes é positivo (MEGID *et al.*, 2000).

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) estabelece como teste de referência o Fixação do Complemento (FC). Capaz de detectar tanto IgG1 quanto IgM, sendo IgG1 mais efetivo como fixador do complemento. O complemento consiste em uma complexa série de proteínas que, quando ativadas pela presença de um complexo antígeno-anticorpo, reagem de tal forma sequencial que causam a lise celular (ALTON *et al.*, 1998)

O teste de polarização fluorescente (FPA) baseia-se na diferença rotacional entre a molécula de antígeno solúvel (marcado com fluorocromo) e essa mesma molécula ligada ao anticorpo. O tamanho molecular é o principal fator que influencia a velocidade de rotação de uma molécula, sendo inversamente proporcional a ela. Havendo anticorpos no soro, haverá a formação dos complexos anticorpo-antígeno-conjugado, cuja velocidade de rotação será inferior à do antígeno-conjugado isolado. Essa mudança da

polarização da luz é detectada por um analisador de polarização fluorescente. Os resultados expressos em unidades de luz polarizada ou de milipolarização (mP). O valor em mP será maior quanto maior for a quantidade de anticorpos no soro analisado (NIELSEN *et al.*, 2001).

O Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) permite a detecção dos níveis de IgM, IgG total, IgG1 e IgG2a, de acordo com o conjugado utilizado, assim como o uso de diversos tipos de antígeno, podendo ser extratos proteicos, células totais, frações de LPS e proteínas recombinantes. No momento, existem variações do ensaio em desenvolvimento que se mostraram promissoras na diferenciação de animais vacinados e naturalmente infectados (FARIA *et al.*, 2020).

6. Vacinação contra brucelose

A vacina ideal contra a brucelose deve ser viva e capaz de fornecer uma forte resposta imune T auxiliar do tipo 1 (Th1); não induzir anticorpos que interfiram com a testes de sorologia utilizados no diagnóstico de bovinos infectados, independentemente da via, dose de administração, idade ou sexo do animais; ser atenuada e não causar doença ou infecção persistente em animais imunizados nem ser patogênico para humanos; ser capaz de induzir um forte e duradoura proteção contra infecções sistêmicas e uterinas, além de prevenir o aborto, mesmo em animais gestantes inoculados com dose única; não levar a soroconversão na revacinação; ser estável e não reverter a virulência *in vivo* e *in vitro*; e por fim, ser barata, fácil de produzir e administrar. Embora ainda não haja uma vacina ideal, a vacinação com cepas vacinais disponíveis continua sendo o método mais eficaz para a prevenção e controle da brucelose em bovinos, sendo um componente crítico da maioria dos programas de controle e erradicação da brucelose o mundo (KO *et al.*, 2003).

Numerosos países adotaram medidas de controle contra a brucelose bovina, a fim de reduzir a prevalência ou erradicar a doença a partir da pecuária, em um esforço para evitar a transmissão para os seres humanos e diminuir as perdas econômicas. Vacinação de bezerras é o ponto central de qualquer programa de controle da brucelose, já que teve bom desempenho na redução da prevalência da doença, sendo útil para o controle da mesma. Considerando que a vacinação sozinha não é suficiente para controlar e erradicar a doença, deve ser associado eliminação contínua de animais infectados, pois eles são a fonte de novas infecções. Assim, além da vacinação, a maioria dos programas de erradicação da brucelose bovina também incluem políticas de teste e abate, vigilância e medidas de higiene (ZHANG et al., 2018).

Em estudos experimentais de eficácia de vacinas, os controles vacinados e não vacinados recebem uma dose infecciosa de uma estirpe virulenta de *B. abortus* no período suscetível (meados da gestação), e a proteção é medida pela capacidade da vacina em prevenir o aborto. No entanto, é importante enfatizar que a eficácia obtida experimentalmente pode diferir de eficácia de campo que pode ser influenciada por outros fatores, como nutrição, estresse ambiental, idade na data da vacinação, manejo vacinal ou estado imunológico (GHEIBI et al., 2018).

Outro aspecto importante relacionado ao sucesso dos programas de controle de brucelose é a qualidade da vacina usada. Apesar do custo da vacina ser apenas uma fração do custo total de um programa de controle, sua qualidade afeta diretamente o resultado do programa. A avaliação da qualidade de vacinas vivas de *Brucella* é usualmente baseada em critérios *in vitro*, inclusive físico-químicos e testes microbiológicos *in vitro* quanto à pureza, dissociação, determinação do pH, umidade e contagem de viabilidade de bactérias (MIRANDA et al., 2015). Recentemente, a estabilidade genética também foi proposta como um critério adicional na

avaliação da qualidade de vacinas de *Brucella* spp. (DORNELES *et al.*, 2013).

Cepas atenuadas de *B. abortus* demonstraram os melhores resultados na prevenção da brucelose bovina. Vacinas vivas de *B. abortus* modificadas são altamente eficazes na diminuição da transmissão e de perdas na produção causadas por brucelose, mas são menos eficazes na prevenção da infecção por linhagens de campo (PASCUAL *et al.*, 2018).

A imunização com vacinas vivas de *B. abortus* modificadas é geralmente realizada em bezerros fêmeas jovens em dose única por injeção intramuscular ou subcutânea. Contudo, em zonas de alta prevalência de brucelose, é realizada vacinação maciça, incluindo vacas adultas (CORREA *et al.*, 2012). Entretanto, os bovinos sejam o principal alvo dos programas de vacinação contra *B. abortus* no controle e erradicação da brucelose bovina, eles não são a única espécie infectada por este agente. Cabras, suínos selvagens, alces, bisontes e outros hospedeiros também podem ser infectados por *B. abortus* e alguns deles são capazes de sustentar a doença, sendo considerada uma importante fonte de re-emergência da doença em bovinos (ZHANG *et al.*, 2018).

Apenas algumas vacinas foram usadas massivamente na imunização de bovinos contra *B. abortus*, B19, RB51, 45/20 e SR82, sendo B19 e RB51 as vacinas mais utilizadas (DORNELES *et al.*, 2015). No entanto, muitas candidatas a vacina contra *B. abortus* foram desenvolvidas, incluindo DNA, subunidade, recombinante *B. abortus* e vacinas de vetores recombinantes. Todas foram avaliadas principalmente no modelo murino (JAIN *et al.*, 2013), e com poucas exceções, não foram testadas em bovinos ou não foram protetoras em bovinos.

a. B19

A cepa vacinal *Brucella abortus* B19 foi descoberta acidentalmente, em 1923, pelo Dr. John Buck, que coletou amostras de leite de vacas da raça Jersey esquecendo-as em temperatura ambiente por um longo período (BUCK, 1930). A cepa mutante foi então inoculada em porquinhos da índia, e os resultados demonstraram menor virulência quando comparado com testes anteriores (GRAVES, 1943). Ao avaliar as diferenças entre os isolados de *B. abortus* de campo e a B19, pode-se detectar que esse processo causou mutações espontâneas nas cepas de *B. abortus* levando a um processo de deleção de 703pb do gene envolvido no catabolismo do eritritol. Após essa alteração em seu genoma, a nova cepa se tornou menos virulenta quando comparada com cepas de *B. abortus* de campo, como por exemplo, *B. abortus* 2308 (HOU *et al.*, 2019).

O gene eritritol (*ery*) contém quatro estruturas de leitura aberta (ORFs): *eryA*, *eryB*, *eryC* e *eryD*. A cepa B19 possui uma deleção de nucleotídeo de 703 bp que afeta as regiões codificantes de *eryC* (BAB2_0370) e *eryD* (BAB2_0369), alterando o metabolismo do eritritol, impossibilitando a produção da enzima D-eritrose-1- fosfato-desidrogenase, essencial para o catabolismo deste açúcar, tendo como consequência o acúmulo dos produtos tóxicos intermediários (D-eritrose 1-fosfato) e redução de ATP, inibindo seu crescimento (CRASTA *et al.*, 2008).

Sendo o primeiro isolado atenuado de *B. abortus*, a B19 passou a ser a primeira vacina viva atenuada utilizada nos programas de controle de brucelose, desde 1941. Mesmo contribuindo de forma significativa com os programas de controle e erradicação da brucelose, a B19 tem uma eficiência de aproximadamente 70% no rebanho (LUBROTH *et al.*, 2007).

A imunização induz alta imunogenicidade, protegendo o animal a longo prazo, podendo abranger todo o período reprodutivo do animal, sendo eficaz em combater abortos causados por *B. abortus*. No entanto, apresenta algumas desvantagens, tais como: interferência em testes sorológicos,

redução na produção de leite, além de ser altamente patogênica para humanos (PASCUAL *et al.*, 2018). Os anticorpos provenientes da imunização podem persistir por um longo período em uma parte dos animais, estima-se que seja em aproximadamente 2 de 100 000 bezerras vacinadas. O título de anticorpos residuais aumenta de acordo com a idade do animal, sendo assim, foi estabelecido que a melhor idade para a vacinação é entre três e oito meses de vida (NICOLETTI, 1981).

Existem relatos de que a cepa vacinal persiste na circulação do animal, sendo assim, através de técnicas moleculares, como a PCR, já foi possível detectar a presença de B19 circulante em amostras de: sangue (MARTINEZ-HERRERA *et al.*, 2012); soro (ZAMANIAN *et al.*, 2015); sêmen (JUNQUEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2017); urina e leite (PACHECO *et al.*, 2012); queijo (MIYASHIRO *et al.*, 2007).

Em relação à resposta imune desencadeada pela vacinação com B19, a maior parte do que se sabe é proveniente de estudos em camundongos, que mostraram uma forte resposta imune Th1 com produção de IFN- γ e altos níveis de células T CD4⁺ específicas para antígenos e células T CD8⁺ secretoras de granzima B (YU *et al.*, 2007). Por ser patogênica ao homem, a administração da B19 é geralmente feita por médicos veterinários que receberam treinamento de segurança e o uso de equipamentos de proteção individual como luvas, casacos de manga comprida, óculos de proteção e máscaras N95 (DORNELES *et al.*, 2015).

b. RB51

Na busca de uma cepa mutante rugosa atenuada capaz de colonizar o hospedeiro por tempo suficiente para induzir a resposta imune, surgiu a cepa vacinal RB51. *Brucella abortus* RB51 é uma cepa rugosa, devido à

ausência da cadeia O no polissacarídeo LPS, derivada da cepa virulenta S2308. Adquiriu mutações após várias passagens em meio contendo rifamicina. É capaz de induzir proteção contra *B. abortus* no gado, e vem sendo empregada na imunização de rebanhos desde 1996 (SCHURIG *et al.*, 1991). Desencadeia resposta imune Th1, através da indução de IFN- γ , levando a ativação de linfócitos T citotóxicos, eliminando células infectadas e aumentando a atividade bactericida de macrófagos (DORNELES *et al.*, 2015).

O nível de proteção proporcionado pela RB15 é inferior quando comparado com a B19, porém tem como vantagem não induzir a produção de anticorpos que interferem nos testes sorológicos empregados no diagnóstico da brucelose, graças a ausência da cadeia O, possibilitando a diferenciação entre animais vacinados e naturalmente infectados. Além disso, apresenta alta estabilidade, sendo incapaz de reverter para o fenótipo liso. O fato de ser resistente a rifampicina também é uma desvantagem, visto que esse é o tratamento ouro para casos de brucelose (OLSEN *et al.*, 1999).

7. Probiótico e Pósbióticos

Nos últimos anos, os alimentos funcionais têm sido de grande importância para as indústrias alimentícias e farmacêuticas, devido aos benefícios que trazem para quem o consome. Dentre eles, os probióticos, bactérias vivas, que quando consumidos em concentrações adequadas, conferem vários benefícios ao hospedeiro, tiveram um destaque especial (FAO, 2016).

Os mais conhecidos e utilizados são bactérias ácido lácticas (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*), assim como

Bifidobacterium, *Bacillus* e leveduras. O gênero *Lactobacillus* foi o primeiro a ser empregado como probiótico. Estas bactérias gram-positivas em forma de bacilo, possui até o momento 183 espécies reconhecidas, com diversas aplicações industriais como na produção de conservantes, acidulantes e aromas alimentares, na indústria farmacêutica e de cosméticos, assim como na produção de polímeros biodegradáveis. Dentre o grupo de bactérias ácido lácticas, *Lactobacillus* é o gênero predominante no sistema gastrointestinal e digestório de seres humanos e demais animais, auxiliando na manutenção e recuperação do organismo (O`TOOLE *et al.*, 2017).

No entanto, novos estudos demonstram que os benefícios conferidos por probióticos não estão relacionados à viabilidade da bactéria, e sim aos compostos metabólitos que produz e secreta no trato gastrointestinal do hospedeiro. Sendo assim, uma nova modalidade de compostos funcionais surgiu: os posbióticos. São constituídos por produtos ou subprodutos metabólicos bioativos, secretados por bactérias vivas ou a partir da lise celular (ŻÓŁKIEWICZ *et al.*, 2020). Também chamados de paraprobióticos, probiótico não viável, probiótico inativado ou probiótico fantasma, os posbióticos também são capazes de conferir benefícios ao consumidor, ao mimetizar os mecanismos de ação dos probióticos convencionais, além de apresentar vantagens de segurança, por não se tratar de um organismo vivo, ou seja, não há risco de translocação microbiana, infecção ou resposta inflamatória e possibilidade de transmissão de genes de resistência (WEGH *et al.*, 2019).

Os posbióticos referem-se aos fatores solúveis liberados pelas bactérias vivas ou após a lise celular. Esses bioprodutos do metabolismo bacteriano podem ser ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), enzimas, peptídeos, ácido teicóico, muropeptídeos derivados de peptidoglicano, endo e exopolissacarídeos, proteínas de membrana, vitaminas, plasmalogênios e ácidos orgânicos (KONSTANTINOV *et al.*, 2013).

Os metabólitos considerados como posbióticos podem ser secretados pela bactéria viva, ou liberados após a lise celular. Para ter acesso aos compostos intracelulares, vários métodos de lise são aplicados do processo de obtenção de posbióticos. Os mais comuns são por aquecimento, tratamento enzimático, extração por solventes, assim como sonicação. Os produtos dessa etapa, podem ainda ser encaminhados para posterior purificação, afim de se obter compostos isolados. Para isso, processos de centrifugação, diálise, liofilização e coluna de purificação são utilizados (AGUILAR-TOALÁ *et al.*, 2018). Para a indústria, os posbióticos apresentam grandes vantagens quando se trata de produção, custos e armazenamento. Em geral, os posbióticos possuem várias propriedades atraentes, como estruturas químicas claras, parâmetros de dosagem de segurança e vida útil mais longa (até 5 anos, quando usados como ingrediente para alimentos e bebidas ou como suplementos nutricionais) (TOMAR *et al.*, 2015).

Devido à heterogeneidade das substâncias classificadas como posbióticos, até o momento, os mecanismos de ação desses compostos não foram totalmente elucidados, no entanto, estudos demonstram que esses compostos possuem efeitos pleiotrópicos no organismo, podendo ser local ou sistêmico, exibindo atividade antimicrobiana, antioxidante e imunomodulatória. Também são capazes de interferir na microbiota e nas vias de sinalização metabólica (ŻÓŁKIEWICZ *et al.*, 2020).

O efeito imunomodulatório é dado pela indução da diferenciação e regulação de células T regulatórias (T_{reg}) no intestino, assim como aumento na produção de T_{reg} periférico. Os posbióticos são capazes de induzir a produção de citocinas anti-inflamatórias e promover a resposta imune tipo Th2, assim como induzir a maturação e sobrevivência de células dendríticas e conseqüentemente aumento na secreção de IL-10 e inibição da secreção de TNF- α (ARPAIA *et al.*, 2013). Em modelos murinos, já foi possível

observar o aumento da resposta de linfócitos Th1 em linfonodos mesentéricos (MÉNARD *et al.*, 2005).

Por sua vez, o efeito antimicrobiano pode ser atribuído à presença de vários compostos antimicrobianos, não se limitando a bacteriocinas, enzimas, pequenas moléculas, e ácidos orgânicos, que exibem propriedades bacteriostáticas ou bactericidas contra micro-organismos gram-positivos e gram-negativos (KAREEM *et al.*, 2014). Podem ter efeitos diretos por criar uma barreira intestinal, competir por receptores de ligação, alterar a expressão de genes do hospedeiro ou modular o ambiente local (KOHDAII *et al.*, 2017).

a. Uso de posbióticos na produção animal

O uso de alimentos funcionais, tais como moduladores da microbiota intestinal foram inicialmente introduzidos na nutrição animal como uma alternativa diante de várias restrições de aditivos alimentares para crescimento, como os antibióticos. Visto os benefícios conferidos por posbióticos, o uso se tornou aliado dos produtores para acelerar o ritmo de crescimento, melhorar índices reprodutivos e indicadores de saúde (SANTILLANA, 2020). A microbiota saudável em animais de produção é fundamental para os processos fermentativos, no caso de ruminantes, e para síntese de proteínas de origem microbiana (FRAGA COTELO, 2010). Além disso, proporcionam menores taxas de morbidade e mortalidade durante as fases críticas da produção, acarretando em maior rendimento. Estimular o equilíbrio da microbiota pela suplementação com posbióticos favorece o crescimento de bactérias benéficas e dificulta a colonização de patógenos, auxilia na digestão e reforçam o sistema imune, permitindo uma resposta imune mais adequada em casos de infecções (FAO, 2016).

Embora o uso de posbióticos seja recente como suplemento animal, alguns estudos já demonstram seus benefícios. Em ovelhas e leitões foi possível observar maior ritmo de crescimento na fase de engorda, menores recorrências de diarreias e aumento na capacidade funcional de células vermelhas, além de proporcionar alteração na microbiota (BRAVO *et al.*, 2019; GARCÍA-JIMENEZ *et al.*, 2019). Nas galinhas foram observados aumento na postura de ovos assim como em sua qualidade (LOH *et al.*, 2014). Acredita-se que o emprego de alimentos funcionais facilita a digestão dos alimentos, proporcionando melhor aproveitamento dos nutrientes, favorecendo a absorção de nutrientes essenciais (AGUILAR-TOALÁ *et al.*, 2018). A redução no uso de antibióticos decorre do fato de que posbióticos podem modular a microbiota e favorecer a população de bactérias benéficas, dificultando o estabelecimento de patógenos, e por potencializar o sistema imune, possibilita que o animal enfrente infecções de forma mais eficaz (GARCÍA-JIMENEZ *et al.*, 2019).

Os trabalhos a seguir foram elaborados segundo as normas da revista **Microbiology Research Journal International**, sendo o Capítulo 02 já aceito e publicado.

REFERÊNCIAS

- Aguilar-Toalá J., Garcia-Varela R., Garcia H., Mata-Haro V., González-Córdova A., Vallejo-Cordoba B., et al. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. **Trends in Food Science & Technology**, 75:105-14, 2018;
- Alton, G. G., Jones, L. M., Angus, R. D., Verger, J. M. *Tecnicas for the Brucellosis Laboratory*. 1º Edição Paris: **Institute National de la Recherche Agronomique** (INRA), p.190, 1988;
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veecken, J., deRoos, P., Liu, H., Cross, J.R., Pfeffer, K., Coffey, P.J., et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. **Nature**, 504, 451–455, 2013;
- Baily, G. G., Krahn, J. B., Drasar, S. B., Stoker, N. G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 95:271-275, 1992;
- Barbosa, S. M. Isolamento, tipificação e genotipagem de *Brucella abortus* isoladas de bovino no Brasil. 2009. 77f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 2009;
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT): Brasília, 2006. Manual Técnico;
- Bricker, L.B.J., Hailing, S.M. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strain S19 and RB51. **Journal of Clinical Microbiology**, 33(6):1640-1642, 1995;
- Bravo, M., García-Jiménez W., Risco D., Gonçalves P., López F., García A., et al. Administración de piensos fermentados (Ingubal® Ruminant) en cebo de corderos: mejora de parámetros productivos e indicadores de salud. **Producción Animal**, 314:54-60. 9, 2019;
- Buck, J. M. Studies of vaccination during calthood to prevent bovine infectious abortion. **J. agric. Res**, 41, 9, p. 667-689, 1930;
- Chate S. C., Dias R. A., Amaku M., Ferreira F., Moraes G. M., Neto A. A. C., Monteiro L. A. R. C., Lobão J. R., Figueiredo V. C. F., Gonçalves V. S. P., Neto J. S. F. Situação epidemiológico da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 61(1):45-55, 2009;

Crasta O.R., Folkerts O., Fei Z., Mane S.P., Evans C., Martino-Catt S., et al. Genome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain S19 compared to virulent strains yields candidate virulence genes. **PLoS ONE**, 3:e2193, 2008;

Cousin, F., Jouan-Lanhouet, S., Dimanche-Boitrel, M.T., Corcos, L., Jan, G. Milk Fermented by *Propionibacterium freudenreichii* Induces Apoptosis of HGT-1 Human Gastric Cancer Cells. **PLoS ONE**, 7, e31892, 2013;

Corbel, Michael J. Brucellosis in humans and animals. **World Health Organization**, 2006;

Cortez De Sá, J. Papel do sistema de secreção tipo IV (SST4) na internalização e sobrevivência de *Brucella*, lisa e rugosa: infecção in vivo e in vitro. 2011. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, Maranhão. 2011;

Corrêa, R. L., 2012. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal-PNCEBT: análise saúde-saúde da brucelose animal;

Díaz Aparicio, E. Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*. **Revue Scientifique et Technique**, v. 32, p. 43-51, 53-60, 2013;

Diacovich, L; Gorvel, J. P. Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. **Nature Reviews Microbiology**, 8:117-128, 2010;

Dornelles, E. M. S; Sriranganathan, N; Lage, A. P. Recent advances in *Brucella abortus* vaccines. **Veterinary Research**, 46(76): 1-10, 2015;

Dorneles E.M., De Faria A.P., Pauletti R.B., Santana J.A., Caldeira G.A., Heinemann M.B., Titze-De-Almeida R., Lage A.P. Genetic stability of *Brucella abortus* S19 and RB51 vaccine strains by multiple locus variable number tandem repeat analysis (MLVA16). **Vaccine** 31:4856–4859., 2013;

Dorneles, E. M; Teixeira-Carvalho, A; Araújo, M. S; Lima, G. K; Martins-Filho, O. A; Sriranganathan, N; Lage, A. P. T lymphocytes subsets and cytokine pattern induced by vaccination against bovine brucellosis employing S19 calfhood vaccination and adult RB51 revaccination. **Vaccine**, 32(46):6034-6038, 2014;

Dwight D. and Bowman M.S. Introduction to the Alpha-proteobacteria: *Wolbachia* and *Bartonella*, *Rickettsia*, *Brucella*, *Ehrlichia* and *Anaplasma*. **Top. Companion Anim. Med.**, 26(4): 173–177, 2011;

Faria, A.R. et al. Immunoproteomics of *Brucella abortus* reveals potential of recombinant antigens for discriminating vaccinated from naturally infected cattle. **Microbial Pathogenesis**, v. 147, p. 104345, 2020;

FAO/WHO EC. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. 2001;

Franc, K.A., Krecek, R.C., Häsler, B.N., Arenas-Gamboa, A.M. Brucellosis remains a neglected disease in the developing world: a call for interdisciplinary action. **BMC Public Health**. v. 11, p.125, 2018;

Fraga Cotelo, M. Microbiota ruminal: estrategias de modulación con microorganismos fibrolíticos. 2010;

Galińska, E. M; Zagórski, J. Brucellosis in humans – etiology, diagnostics, clinical forms. **Annals of Agriculture and Environmental Medicine**, 20(2):233-238, 2013;

García-Jiménez W., Bravo M., Risco D., Gonçalves P., Arenas V., Salguero F.J., et al. Empleo de suplementos posbióticos (Ingubal®) para la reducción del uso de antibióticos y mejora de parámetros de salud en porcino. **Producción Animal**, 315:40-9, 2019;

Godfroid, J., Cloeckart, A., Liutard, J.P. et al. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. **Vet. Res.**, v.36, p.313-326, 2005;

Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. **Croat Med J**. 51(4):296-305, 2010;. doi:10.3325/cmj.2010.51.296

Gheibi, A., Khanahmad, H., Kashfi, K., Sarmadi, M., & Khorramizadeh, M. R. Development of new generation of vaccines for *Brucella abortus*. **Heliyon**, 4(12), e01079., 2018;

Graves R.R. The story of John M. Buck's and Matilda's contribution to the cattle industry. **J Am Vet Med Assoc.**, 102:193–195, 1943;

Hop, H.T. et al. Immunization of mice with recombinant *Brucella abortus* organic hydroperoxide resistance (Ohr) protein protects against a virulent *Brucella abortus* 544 Infection. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 26, n. 1, p. 190-196., 2016;

Hou, H., Liu, X., Peng, Q. The advances in brucellosis vaccines. **Vaccine**, v. 37, n. 30, p. 3981-3988, 2019;

Imaoka, K., Kimura, M., Suzuki, M., Kamiyama, T., Yamada, A. Simultaneous Detection of the Genus *Brucella* by Combinatorial PCR. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, 60:137-139, 2007;

- Jain S., Afley P., Kumar S. Immunological responses to recombinant cysteine synthase A of *Brucella abortus* in BALB/c mice. **World J Microbiol Biotechnol.**, 29:907–913., 2013;
- Jezi, F. M., Razavi, S., Mirnejad, R., & Zamani, K. Immunogenic and protective antigens of *Brucella* as vaccine candidates. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, 65, 29-36., 2019;
- Junqueira Junior, D. G.; Lima, A. M. C.; Rosinha, G. M. S.; Carvallho, C. E. G.; Oliveira, C. E.; Sanches, C. C. Detection of *Brucella abortus* B19 strain DNA in seminal plasma by polymerase chain reaction in Brazil. **Transboundary and emerging diseases**, 65(2), 476-479, 2018;
- Keid, L. B. et al. A polymerase chain reaction for the detection of *Brucella canis* in semen of naturally infected dogs. **Theriogenology**, v. 67, n. 7, p. 1203-1210, 2007;
- Khodaii, Z.; Ghaderian, S.M.H.; Natanzi, M.M. Probiotic Bacteria and their Supernatants Protect Enterocyte Cell Lines from Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) Invasion. **Int. J. Mol. Cell. Med**, 6, 183–189, 2017;
- Ko, J.; Splitter, G. A. Molecular host-pathogen interaction in Brucellosis: Current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. **Clinical Microbiology Reviews**, 16(1):65-78, 2003;
- Köhler, S. et al. The intramacrophagic environment of *Brucella suis* and bacterial response. **Veterinary microbiology**, v. 90, n. 1-4, p. 299-309, 2002;
- Kareem, K. Y. et al. Influence of postbiotic RG14 and inulin combination on cecal microbiota, organic acid concentration, and cytokine expression in broiler chickens. **Poultry science**, v. 96, n. 4, p. 966-975, 2017;
- Konstantinov, S. R.; Kuipers, E. J.; Peppelenbosch, M. P. Functional genomic analyses of the gut microbiota for CRC screening. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 10, n. 12, p. 741-745, 2013;
- Lapaque, N. et al. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 1, p. 60-66, 2005;
- Leom, F.C. Brucellosis ovina y caprina. **Paris: Office International des Epizooties**, 451p, 1994;
- Loh, T.C.; Foo, H.L.; Sazili, A.Q.; Bejo, M.H. Effects of feeding different postbiotic metabolite combinations produced by *Lactobacillus plantarum* strains on egg quality and production performance, faecal parameters and plasma cholesterol in laying hens. **BMC veterinary research**, 10(1):149, 2014;

Lubroth, J.; Rweyemamu, M.M.; Viljoen, G.; Diallo, A.; Dungu, B.; Amanfu, W. Veterinary vaccines and their use in developing countries. **Rev Sci Tech**, 26: 179e201, 2007;

Mantegazza, A.R; Magalhaes, J.G; Amigorena, S; Marks, M.S. Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. **Traffic**, 14(2):135–152., 2013;

Martinez-Herrera, D. I; Padron-Tello, O; Peniche-Cardena, A; Villagomez-Cortes, J. A; Pulido-Camarillo, E; Lopez-Merino, A; Morales-Alvarez, J. F; Rodriguez-Chessani, M. A; Barradas-Piña, F. T; Flores-Castro, R. Identification of immunotolerance in the progeny of cows infected with "*Brucella abortus*". **African Journal of Microbiology Research**, 6(29):5841-5846, 2012;

Megid, J. et al . Avaliação das provas de soroaglutinação rápida, soroaglutinação lenta, antígeno acidificado e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 37, n. 5, p. 00, 2000;

Ménard, S.; Laharie, D.; Asensio, C.; Vidal-Martinez, T.; Candalh, C.; Rullier, A.; Zerbib, F.; Megraud, F.; Matysiak-Budnik, T.; Heyman, M. *Bifidobacterium breve* and *Streptococcus thermophilus* Secretion Products Enhance T Helper 1 Immune Response and Intestinal Barrier in Mice. **Exp. Biol. Med. (Maywood, N.J.)**, 230, 749–756, 2006;

Miranda, K.L; Dorneles, E.M; Pauletti, R.B; Poester, F.P; Lage, A.P. *Brucella abortus* S19 and RB51 vaccine immunogenicity test: evaluation of three mice (BALB/c, Swiss and CD-1®) and two challenge strains (544 and 2308). **Vaccine**, 33:507–511., 2015;

Minharro, S. et al. BIOVARIEDADES DE *Brucella abortus* ISOLADAS DE BOVINOS NO BRASIL. **Ciência Animal Brasileira**, p. 442-446, 2009;

Miyashiro, A; Scarcelli, E; Piatti, R. M; Campos, F. R; Vialta, A; Keid, L. B; Dias, R. A; Genovez, M. E. Detection of *Brucella abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the Polymerase Chain Reaction (PCR). **Brazilian Journal of Microbiology**, 38:17-22, 2007;

Nielsen, K. et al. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O: 9 and *Escherichia coli* O157: H7. **Veterinary microbiology**, v. 100, n. 1-2, p. 25-30, 2004;

Nielsen, O. et al. Serologic survey of *Brucella* spp. antibodies in some marine mammals of North America. **Journal of wildlife diseases**, v. 37, n. 1, p. 89-100, 2001;

- Nielsen, K. Diagnosis of brucellosis by serology. **Veterinary Microbiology**, 90:447-459, 2002;
- Neta, A. V. C; Mol, J. P. S; Xavier, M. N; Paixão, T. A; Lage, A. P; Santos, R. L. Pathogenesis of bovine brucellosis. **The Veterinary Journal**, 184:146-155, 2010;
- Nicoletti P. Prevalence and persistence of *Brucella abortus* strain 19 infections and prevalence of other biotypes in vaccinated adult dairy cattle. **J Am Vet Med Assoc.**, 178:143–145, 1981;
- Nicoletti P. A short history of brucellosis. **Vet. Microbiol.**, v.90, p.5-9, 2002;
- Olsen, S.C; Bricker, B; Palmer, M.V; Jensen, A.E; Cheville, N.F. Responses of cattle to two dosages of *Brucella abortus* strain RB51: serology, clearance and efficacy. **Res Vet Sci.**, 66:101–105, 1999;
- O'Toole, P.W.; Marchesi, J.R.; Hill, C. Next-generation probiotics: The spectrum from probiotics to live biotherapeutics. **Nat. Microbiol**, 2, 17057, 2017;
- Paixão, T.A; Roux, C.M; Den Hartigh, A.B; Walters, S.S; Dandekar, S; Santos, R.I; Tsolis, R.M. Establishment of systemic *Brucella melitensis* infection through the digestive tract requires urease, the type IV secretion system, and lipopolysaccharide O-antigen. **Infect Immun.**, 77: 4197- 4208, 2009;
- Pendela, S.V. et al. An Uncommon presentation of *Brucella* endocarditis masquerading as neurobrucellosis. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 11, n. 2, p. OD10, 2017;
- Perkins, S. D.; Smither, S.J.; Atkins, H.S. Towards a *Brucella* vaccine for humans. **FEMS microbiology reviews**, v. 34, n. 3, p. 379-394, 2010;
- Pacheco, W. A; Genovez, M; E; Pozzi, C. R; Silva, L. M. P; Azevedo, S. S; Did, C. C; Piatti, R. M; Pinheiro, E. S; Castro, V; Miyashiro, S; Gambarini, M. L. Excretion of *Brucella abortus* vaccine B19 strains during a reproductive cycle in dairy cows. **Brazilian Journal of Microbiology**, 594-601. 2012;
- Pandey, A; Cabello, A; Akoolo, L; Rice-Ficht, A; Arenas-Gamboa, A; McMurray, D; Ficht, Ta; De Figueiredo, P. The case for live attenuated vaccines against the neglected zoonotic diseases brucellosis and bovine tuberculosis. **PLoS Negl Trop Dis**, 10:e0004572., 2016;
- Pascual, D. W.; Yang, X.; Wang, H.; Goodwin, Z.; Hoffman, C.; Clapp, B. Alternative strategies for vaccination to brucellosis. **Microbes and infection**, 20(9-10), 599-605., 2018;

Pappas, G.. The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats. **International journal of antimicrobial agents**, 36: S8-S11., 2010;

Poester, F.P; Goncalves, V.S; Paixao, T.A; Santos, R.L; Olsen, S.C; Schurig,G.G; Lage, A.P. Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. **Vaccine**, 24:5327–5334, 2006;

Poester, F. P; Figueiredo, V. C. F; Lôbo, J. R; Golçalves, V. S. P; Lage, A. P; Roxo, E; Mota, P. M. P. C; Müller, E. E; Ferreira-Neto, J. S. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 61(1):1-5, 2009;

Santillana, M.B. Posbióticos, un concepto innovador en nutrición animal. **Albéitar: publicación veterinaria independiente**, n. 236, p. 16-18, 2020;

Sangari, L. E; García-Lobo, J. M; Agüero, J. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. **FEMS Microbiology Letter**, 121:337-342, 1994;

Santos, R. L.; Martins, T. M.; Borges, A. M.; Paixão, T. A. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33(6):759-764, 2013;

Scholz, H.C. et al. *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2090-2098, 2016;

Schurig, G.; Boyle, S.; Sriranganathan, N. *Brucella abortus* vaccine strain RB51: a brief review. **Arch Med Vet.**, 27:19–22, 1995;

Silva Júnior, F. F. et al. Avaliação do teste do anel em leite na vigilância epidemiológica da brucelose bovina em rebanhos e em laticínios. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 2, p. 295-300, 2007;

Sutherland, S.S. Immunology of bovine brucellosis. **Veterinary Bulletin**, v.50, n.5, p.359-68, 1980;

Tomar, S. K.; Anand, S.; Sharma, P.; Sangwan, V.; Mandal, S. Role of probiotic, prebiotics, synbiotics and postbiotics in inhibition of pathogens. In A. Méndez-Vilas (Ed.). *The battle against microbial Pathogens: Basic science, technological advances and educational programs* (pp. 717–732), 2015;

Whatmore, A. M. et al. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. Pt 12, p. 4120, 2014;

Wegh, C.A.; Geerlings, S.Y.; Knol, J.; Roeselers, G.; Belzer, C. Postbiotics and Their Potential Applications in Early Life Nutrition and Beyond. **International journal of molecular sciences**, 20(19):4673. 3, 2019;

Xavier, M. N. et al. The genus *Brucella* and clinical manifestations of brucellosis. **Ciência Rural**, v. 39, n. 7, p. 2252-2260, 2009;

Xavier, M. et al. Pathogenesis of *Brucella* spp. **The open veterinary science journal**, v. 4, n. 1, 2010;

Yousefi-Nooraie, R.; Mortaz-Hejri, S.; Mehrani, M.; Sadeghipour, P. Antibiotics for treating human brucellosis. **Cochrane Database Syst Rev.**, v.10, p. CD007179, 2012;

Yu, D.H.; Hu, X.D.; Cai, H. A combined DNA vaccine encoding BCSP31, SOD, and L7/L12 confers high protection against *Brucella abortus* 2308 by inducing specific CTL responses. **DNA Cell Biol.**, 26:435–443, 2007;

Zamanian, M.; Tabar, G. R. H.; Rad, M.; Haghparast, A. Evaluation of Different Primers for Detection of *Brucella* in Human and Animal Serum Samples by Using PCR Method. **Archives of Iranian Medicine**, 18(1):44-50, 2015;

Zhang, N.; Huang, D.; Wu, W.; Liu, J.; Liang, F.; Zhou, B.; Guan, P. Animal brucellosis control or eradication programs worldwide: A systematic review of experiences and lessons learned. **Preventive veterinary medicine.**, 2018;

Żółkiewicz, J. et al. Postbiotics—A Step Beyond Pre-and Probiotics. **Nutrients**, v. 12, n. 8, p. 2189, 2020.

OBJETIVOS

1.1. Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de posbióticos em modular a resposta da vacina B19 contra *Brucella* spp. em bovinos da raça Nelore.

1.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver um teste I-ELISA para avaliar os níveis de IgG anti-*Brucella abortus* em amostras de soros bovino;
- Determinar o efeito da suplementação posbióticos na resposta imune celular através da contagem de células brancas, neutrófilos, monócitos e linfócitos;
- Determinar o efeito da suplementação com posbióticos na resposta imune humoral contra *Brucella* spp. em bovinos através dos níveis de IgG total.

Capítulo 1 - Desenvolvimento de I-ELISA baseado no antígeno solúvel de *Brucella abortus* S2308 para detecção de IgG anti-*Brucella* bovino

Caroline Paes dos Santos¹, Heitor Miraglia Herrera¹, Talia Fernandes Silva¹, Emily Rebeca Antunes Gonçalves¹, Filipe Martins Santos¹, Carlos Alberto do Nascimento Ramos² and Carina Elisei de Oliveira^{1*}

¹Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 79117-900, Brazil.

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 79070-900, Brazil.

RESUMO

Introdução: Os ensaios sorológicos são os testes preconizados pelos programas de controle de brucelose devido à sua sensibilidade diagnóstica, disponibilidade e vantagem econômica.

Objetivos: Nesse estudo, avaliamos o antígeno solúvel de *B. abortus* S2308 para desenvolvimento de um teste diagnóstico de brucelose bovina.

Metodologia: O antígeno foi obtido através da técnica de lise por choque térmico. A eficácia do antígeno para diagnóstico de brucelose bovina foi determinada através do teste de western blot e pelo ensaio de imunoabsorção enzimática indireta (I-ELISA).

Resultados: O extrato obteve rendimento de 3,2mg/mL e o perfil proteico apresentou bandas de aproximadamente 35, 45, 50, 55, 75 e 80 kDa, sendo as bandas de 50 e 55 kDa reagentes no western blot. Foram avaliadas 134 amostras de soros de bovinos através do I-ELISA e os resultados foram comparados com os obtidos pelo teste AAT. O teste de I-ELISA com

antígeno solúvel de S2308 foi realizado com as diluições de antígeno e soro de 1:400 e 1:200, respectivamente. O valor de *cut-off* foi de 0,666, a sensibilidade de 97,1%, especificidade de 98,4%, e precisão de 97,8%.

Conclusão: Antígenos baseados em célula total apresentam potencial para ser utilizado como antígeno em diagnóstico de brucelose bovina.

Palavras-chave: antígeno, brucelose, choque térmico, diagnóstico.

1. INTRODUÇÃO

A brucelose é uma doença infecciosa capaz de infectar animais domésticos e selvagens, assim como humanos [01]. Causada por bactérias intracelulares facultativas do gênero *Brucella* spp., sendo as infecções por *B. abortus*, *B. melitensis* ou *B. suis* as mais frequentemente relatadas, está amplamente distribuída em países em desenvolvimento, incluindo a região do Mediterrâneo, Oeste da Ásia, África e América Latina [02]. Embora a vacinação seja a principal medida de controle, a administração isolada da vacina atualmente disponível não é suficiente para o controle e erradicação da brucelose [03].

A brucelose bovina afeta o sistema reprodutivo do animal, levando ao aborto no terceiro trimestre de gestação [02]. É uma doença de difícil controle, devido ao manejo extensivo dos animais e acaba gerando importantes perdas econômicas, pela redução na produção e através das restrições no comércio internacional de produtos animais [04]. A transmissão no campo é perpetuada através do contato direto entre os animais domesticados e silvestres as secreções eliminadas por estes animais infectados [05]. A identificação rápida e precisa da infecção no gado é crucial para controlar a doença entre humanos e animais. Especialmente em uma área endêmica,

encontrar um método diagnóstico confiável para a brucelose ainda é um importante desafio [06].

O padrão ouro de diagnóstico da brucelose é o isolamento bacteriano a partir de amostras clínicas, no entanto, requer medidas de restritas de biossegurança, tais como instalações de nível de biossegurança 3 (NB3) e equipe técnica treinada. Sendo assim, métodos alternativos, como testes sorológicos e moleculares, devem ser desenvolvidos para o diagnóstico clínico de rotina e programas de vigilância [07]. Dentre essas abordagens, os ensaios sorológicos são os testes preconizados pelos programas de controle de brucelose devido à sua sensibilidade diagnóstica, disponibilidade e vantagem econômica [08].

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose - PNCEBT, deflagrado em 2001, preconiza que o sorodiagnóstico da brucelose em fêmeas bubalinas seja realizado a partir dos 24 meses de idade, nas bezerras vacinadas com a amostra B19 entre 3 a 8 meses de idade, utilizando as provas do antígeno acidificado tamponado (AAT), 2-mercaptoetanol (2-ME) e/ou fixação de complemento (FC) [09]. Embora sejam testes sensíveis, apresentam elevadas taxas de resultados falsos positivos, principalmente ao se tratar de casos crônicos [09]. Ensaios de ELISA apresentam maior sensibilidade e superioridade em comparação com as técnicas baseadas em aglutinação, por se tratar de ensaios baseados em ligação primária [04].

O desenvolvimento de testes ELISA que utilizam antígenos baseados em célula total de *B. abortus* obtidos através de choque térmico é de fácil preparo, baixo custo, não necessita de equipamentos caros e apresentam boa sensibilidade e especificidade [11]. No presente estudo, foi avaliado o potencial de diagnóstico de brucelose bovina através do teste ELISA indireto

empregando como antígeno a fração solúvel de células de *B. abortus* S2308.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Cepas Bacterianas

Para realizar esse estudo, uma cepa de *Brucella abortus* S2308 foi gentilmente doada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Gado de Corte (EMBRAPA).

2.2 Amostras De Soro

Foram utilizadas amostras de soro de animais reagentes ao teste de antígeno acidificado tamponado (AAT) (n=71), assim como de vacas soronegativas ao teste (n=63). As amostras foram gentilmente fornecidas pelo Laboratório de Biologia Molecular – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UFMS.

2.3 Teste Antígeno Acidificado Tamponado (AAT)

O antígeno utilizado foi produzido no Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). A linhagem utilizada foi a *Brucella abortus* 1119-3, diluída 8,0% em solução tampão pH $3,65 \pm 0,05$. O protocolo foi realizado conforme recomendação do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose bovina (PNCEBT) organizado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os soros assim como o antígeno, foram colocados à temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos. Em seguida, as amostras de soro foram homogeneizadas e, com uma micropipeta, 30 μ l foram aplicados em placa de vidro. O antígeno foi colocado ao lado na mesma quantidade, sem que tivesse contato com o soro. Após homogeneização, foram realizadas, com a ajuda de um bastão,

movimentos circulares 30 vezes/minuto aproximadamente, durante 3 minutos. A identificação da reação foi observada pela presença ou não de grumos.

2.4 Preparo Do Antígeno Solúvel De *Brucella abortus* S2308

Para o preparo do antígeno foi utilizado a cepa de *Brucella abortus* S2308. Para o isolamento bacteriano, 10 uL do estoque foram plaqueados em ágar TSA e mantidos 37°C por 72 horas. As colônias isoladas foram recuperadas e crescidas em 10mL de caldo TSB, mantidas em *shaker* a 37°C por 72 horas. A cultura foi sedimentada por centrifugação 14.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet obtido foi lavado três vezes com PBS 1x (tampão fosfato salino, pH 7,2). Após descartar o último sobrenadante, o pellet foi ressuscitado em 1mL de PBS 1x e posteriormente fervidos em banho seco a 95°C por 5 minutos para inativação das células. Em seguida foi realizado o processo de lise por choque térmico, onde a amostra passou por cinco ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e posteriormente fervida a 95°C. Ao esfriar, foi adicionado o inibidor de protease Sigma® (1:100), para evitar a degradação das proteínas. A fim de separar as frações solúveis e insolúveis, a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante contendo a fração solúvel foi transferido para um novo eppendorf, enquanto o pellet foi ressuscitado com SDS e estocado a -20°C até o preparo da placa. A quantificação de proteínas foi realizada pela reação de Bradford.

2.5 SDS-PAGE E Western Blot

A análise do perfil proteico solúvel da cepa de *Brucella abortus* S2308 foi realizada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE no sistema Mini Protean Tetra Cell, da BioRad®. Inicialmente a amostra foi misturada ao tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M, SDS 10%, glicerina 20%, azul de bromofenol 0,01%) e posteriormente, aplicada no gel de

dodecilsulfoato de sódio contendo 12% de acrilamida no gel de separação e 5% no gel de empilhamento. A corrida foi realizada a 85 V, por aproximadamente 2 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado por nitrato de prata.

A fim de avaliar o reconhecimento do antígeno total por anticorpos de animais infectados com *Brucella* spp., uma solução do antígeno foi submetida a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE) e, em seguida, transferida para membranas de nitrocelulose. Após a etapa de bloqueio com 5% de leite em pó desnatado em PBS pH 7,4, *overnight*, a 4°C, as membranas foram lavadas três vezes com PBST por 5 minutos e posteriormente incubadas com pool de soros de controle positivos e negativos (diluído 1: 2.000 em PBST) por 1 hora, em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes por cinco minutos com PBST e então incubadas com conjugado anti-IgG bovino marcado com peroxidase (Sigma-Aldrich), na diluição 1:3.000, por 1 hora em temperatura ambiente. Para revelar a reação, a membrana foi incubada com substrato enzimático e solução de cromogênio, diaminobenzidina (Sigma-Aldrich) e peróxido de hidrogênio, respectivamente, por dez minutos, e a reação foi interrompida com água ultrapura.

2.6 Ensaio Indireto De Imunoadsorção Enzimática Indireto: I-ELISA

Para a padronização do ELISA com antígeno solúvel de *Brucella abortus* S2308, diluições ótimas do antígeno (1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600), soros (1/100, 1/200, 1/400, 1/800), conjugado (1:10.000) e tampões utilizados no ensaio, assim como o tempo de parada da reação enzimática, foram avaliados com quatro amostras de soros de bovinos negativos e quatro positivos para *Brucella* spp. pelo teste sorológico de AAT, que posteriormente foram empregados como controles positivo e negativo. O ensaio foi realizado em microplacas de fundo chato estéril com 96 poços (Cralplast®), com orifícios adsorvidos com o antígeno total de *Brucella*

abortus. A combinação com melhor desempenho foi do antígeno 1:400 e soro 1:200. Para ambos, a diluição do conjugado utilizada foi de 1:10.000. Para preparar a placa, adicionou-se 100µL (32ng) do antígeno diluído em PBS 1x em todos os poços, e a placa foi incubada overnight a 4°C. O bloqueio foi realizado com soro fetal bovino 2% (Cultilab) e incubado a 37°C por uma hora. Após a lavagem da placa, 100µL dos soros testes foram aplicados em duplicata, assim como o controle positivo e negativo. O branco do ensaio foi feito com a adição de 100µL de PBS 1x, ao invés do soro a ser testado. A detecção dos anticorpos foi realizada com a adição de 100µL do conjugado anti-IgG bovino marcado com peroxidase (Sigma-Aldrich), na diluição 1:10.000. A reação foi revelada com 50µL Sigma Fast® OPD (o-dicloridrato de fenilenodiamina) e interrompida com 50µL de HCl 1M. O resultado foi determinado pela absorbância a 490nm usando Multiskan™ GO UV/Vis espectrofotômetro de microplacas.

2.7 Análises Matemáticas E Estatísticas

O valor de *cut-off* foi determinado como descrito por Frey et al. 1998, utilizando a média de DO de 21 amostras negativas mais três vezes o desvio padrão dessas amostras, com intervalo de confiança de 99,8% [12].

A sensibilidade (S), especificidade (E) e precisão (A) do teste foram calculados da seguinte forma:

$$S = [TP/(TP + FP)] \times 100;$$

$$E = [TN/(TN + FN)] \times 100;$$

$$A = [(FN + FP)/(TP+TN)] \times 100,$$

Onde TP= verdadeiro positivo, TN= verdadeiro negativo, FP= falso positivo, e FN= falso negativo.

Os resultados obtidos pelo ELISA indireto foram comparados com os resultados obtidos pelo teste de AAT.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Perfil imunorreativo

Pelo método de lise por choque térmico, foi possível obter o rendimento de 32 ug/mL de proteínas solúveis, quantificados pela técnica de Bradford. Através da eletroforese SDS-PAGE foi possível determinar o perfil eletroforético, com seis bandas bem definidas, representando o padrão do antígeno solúvel. O perfil proteico apresentou proteínas de diversos pesos moleculares, sendo de aproximadamente 80, 75, 55, 50, 45 e 35 kDa. Através da avaliação por western blot, para definir quais as principais proteínas antigênicas, foi possível observar reatividade nas proteínas de 55 e 50 kDa (Figura 1).

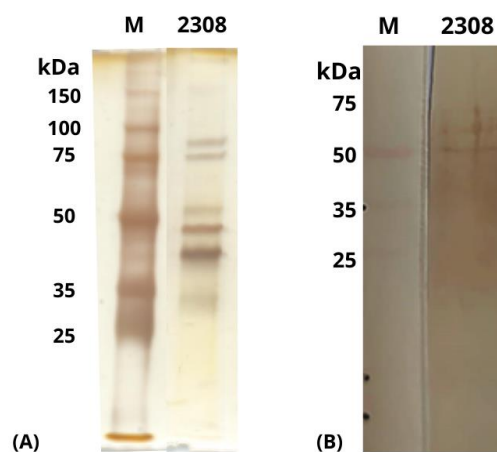


FIGURA 1 – (A) ANÁLISE DA FRAÇÃO SOLÚVEL DE *BRUCELLA ABORTUS* S2308 ATRAVÉS DE SDS-PAGE 12% CORADO COM NITRATO DE PRATA. M: MARCADOR DE MASSA MOLECULAR (kDa), 2308: ANTÍGENO SOLÚVEL DE *B. ABORTUS* S2308. (B) WESTERN BLOT REPRESENTANDO AS PROTEÍNAS ANTIGÊNICAS DO ANTÍGENO DE *B. ABORTUS* 2308

3.2 Validação do teste

A combinação com melhor desempenho foi do antígeno 1:400 e soro 1:200. O valor de *cut-off* determinado através de 21 amostras de soro negativas foi de 0,666 e a média de OD das amostras positivas foi de 0,8843 e das amostras negativas foi de 0,3485 (Figura 2).

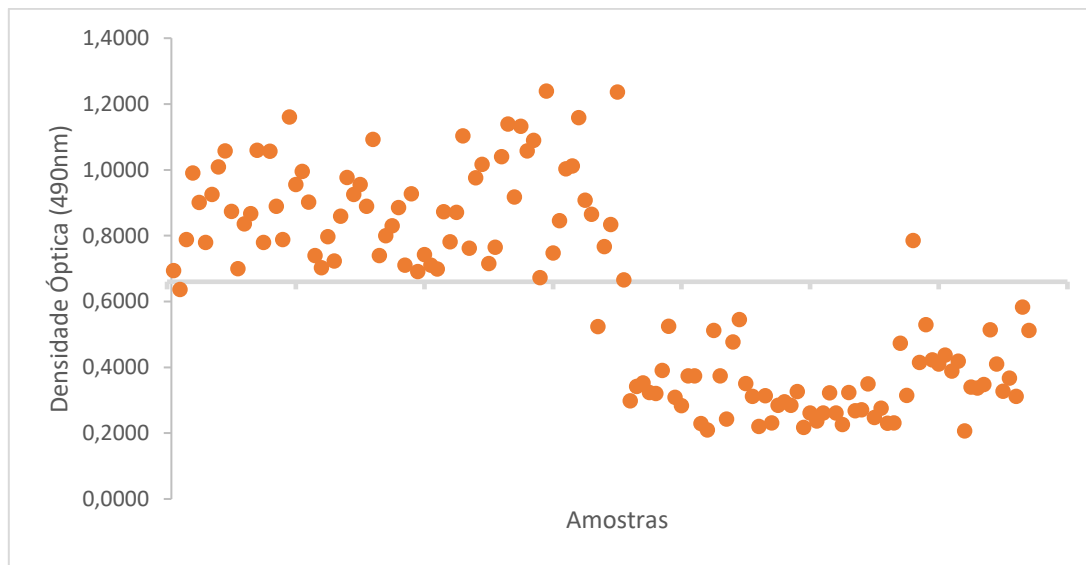


FIGURA 2 – AMOSTRAS DE SORO BOVINO SUBMETIDAS AO TESTE I-ELISA INDIRETO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA A BRUCELOSE BOVINA (N = 137). O EIXO HORIZONTAL REPRESENTA O VALOR DE *CUT-OFF* DE 0,666.

Foram avaliadas 134 amostras de soros de bovinos. Através do teste de AAT, 71 amostras foram positivas e 63 foram negativas. As amostras de soro foram submetidas ao teste de I-ELISA, sendo 70 amostras positivas e 64 negativas. Ao comparar esses resultados, foi possível observar 69 resultados verdadeiramente positivos, 2 falsos positivos, 62 verdadeiramente negativos e 1 falso negativo, indicando concordância de 97,8% entre I-ELISA e AAT. Com base nesses valores, o I-ELISA baseado no antígeno

solúvel de *B. abortus* S2308 apresentou 97,1% de sensibilidade e 98,4% de especificidade (Tabela 1).

TABELA 1 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS PELO ANTÍGENO ACIDIFICADO TAMPONADO (AAT) E DO I-ELISA BASEADO NO ANTÍGENO SOLÚVEL DE *B. ABORTUS* S2308

		AAT	
		POSITIVO (n= 71)	AAT NEGATIVO (n= 63)
ELISA	POSITIVO	69	1
	NEGATIVO	2	62

Sensibilidade = $69/71 \times 100 = 97,1\%$; Especificidade = $62/63 \times 100 = 98,4\%$;
Concordância = $131/134 \times 100 = 97,8\%$.

A brucelose é uma zoonose endêmica e generalizada que causa grande impacto econômico nas regiões em que está presente. Além de ser altamente contagiosa, até o momento não existem métodos de prevenção da brucelose, sendo assim, todos os esforços são voltados para o controle e erradicação da doença nos rebanhos [13]. A detecção de anticorpos por testes sorológicos é de grande importância no manejo e controle da brucelose bovina, sendo assim, testes com maior sensibilidade e especificidade são necessários, para tornar a vigilância epidemiológica mais eficaz no manejo desta doença. Objetivou-se com a execução deste estudo padronizar um ensaio de imunoabsorção enzimática indireto (I-ELISA) utilizando antígeno solúvel de *B. abortus* S2308 como ferramenta para o diagnóstico de brucelose bovina.

Os ensaios imunoenzimáticos têm sido empregados na detecção de anticorpos séricos para *B. abortus*, com as vantagens de que o soro a ser utilizado não precisa ser inativado como para o teste de fixação do complemento ou tratado com 2-mercaptoetanol, podendo ser utilizado soro hemolisado, e os resultados são expressos de forma quantitativa, importante

para determinar o perfil da infecção por *Brucella* [14,15]. Os antígenos de *Brucella* purificados têm a vantagem de serem mais específicos, enquanto os ensaios baseados em antígenos de lisados de células inteiras fornecem uma avaliação mais abrangente, sendo a escolha mais promissora em países com recursos limitados e altas cargas, pois aumenta a probabilidade de detecção de *Brucella* spp. [16].

O uso de extratos brutos de proteínas induz a maior sensibilidade quando comparado com testes de ELISA baseados em uma única proteína. Alguns estudos demonstram a sensibilidade de testes de I-ELISA empregando antígenos baseados em proteínas recombinantes, tais como: *Brucella abortus* bacterioferritina (rBfr) [08], proteína de membrana externa 2b (rOmp2b) [17], proteína de membrana externa de 28 kDa (OMP28) [18] com sensibilidade de 85,33%; 88,5% e 88,7%, respectivamente. Os estudos que envolvem o desenvolvimento de testes baseados em antígenos de lisados de células de *B. abortus* B19 para detecção de IgM humana, atingiram a sensibilidade de 95,7% [16]. O desenvolvimento de ensaios com proteínas recombinantes multiepítotos, como demonstrado por YIN et al (2020), baseada nas proteínas OMP31, BP26, OMP2b e OMP16, atingiu 96,77% de sensibilidade [19].

O lipopolissacarídeo (LPS) é o principal componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas, sendo um antígeno importante em *Brucella* spp., constituído pelo Antígeno-O e Lipídeo A. O LPS é responsável pela indução de células B e conseqüentemente, pela produção de anticorpos, sendo um importante marcador sorológico no diagnóstico de animais infectados por *Brucella* [20]. Apesar da alta sensibilidade de testes baseados com LPS, a busca por antígenos livres de LPS é uma estratégia para minimizar a reação cruzada com outras bactérias Gram-negativas e para permitir a diferenciação entre anticorpos resultantes da vacinação dos

resultantes de infecções na brucelose bovina, além de permitir a avaliação da cobertura vacinal [21].

Em regiões endêmicas, assim como o Brasil, a diversidade de espécies de *Brucella* circulantes entre seres humanos e animais é maior, sendo assim, testes que utilizam antígenos desenvolvidos para detectar uma faixa estreita de *Brucella* spp. podem apresentar sua capacidade diagnóstica prejudicada. Isso implica que ensaios com uma faixa antigênica ampla, como ensaios baseados em antígenos de lisados de células inteiras, podem ser melhores ferramentas de diagnóstico para áreas onde diferentes cepas de *Brucella* spp. estão circulando nas populações humanas e animais [16].

O processo de obtenção do antígeno solúvel utilizado neste experimento e por outros autores [22-24] libera, além dos constituintes da membrana externa, diversos outros antígenos bacterianos que podem ser indutores de produção de anticorpos adquirindo uma maior sensibilidade na detecção de anticorpos anti-*Brucella*. Nosso teste se mostrou capaz de diferenciar animais soropositivos e soronegativos com precisão. Os estudos realizados por Bao et al., (2017) [25] corroboram a ao nosso estudo, a caracterização realizada por *western blot* do lisado solúvel da cepa S2308 de *B. abortus* utilizada neste estudo foi possível observar a reatividade de bandas de aproximadamente 50 e 55kDa, de acordo com o esperado ao Antígeno-O do LPS.

Berman et al. (1980) [22] relatam a falta de concordância entre testes com antígenos de *Brucella* spp. íntegras (AAT), onde predomina como antígeno os lipopolissacarídeos de forma lisa da camada externa (S-LPS) e animais imunizados com antígenos solúveis diversos de *Brucella* spp. resultantes da lise bacteriana, no entanto, nossos resultados demonstram concordância de 97,8% entre o AAT e I-ELISA.

Além das vantagens já apresentadas, antígenos baseados em células inteiras apresentam baixo custo de produção, não necessitam de equipamentos sofisticados ou técnicas complexas, tais como clonagem e expressão de proteínas [26]. O AAT pode ser combinado com o I-ELISA como um teste de confirmação, simples e fácil de usar. Em laboratórios onde a técnica ELISA já é utilizada para o diagnóstico de outras doenças, o I-ELISA pode ser utilizado como teste diagnóstico único [04]. As vantagens do ELISA em relação a outros testes sorológicos empregados no diagnóstico da brucelose bovina como fornecer resultados mensuráveis, ser de fácil execução e padronização e passíveis de automatização [26]. Além disso, novos testes podem ser feitos avaliando amostras de soro de outros animais, como ovelhas, cabras e cães, assim como seu possível potencial para diagnóstico sorológico de brucelose humana.

4. CONCLUSÃO

Podemos concluir que antígenos baseados na fração solúvel de *Brucella abortus* S2308 obtidos através de choque térmico são adequados para aplicação no diagnóstico da brucelose bovina através de ELISA. Os resultados apresentados nesse estudo indicam que o teste foi capaz de diferenciar o soro de animais positivos e negativos, com boa sensibilidade e especificidade, assim como em alta concordância com o teste AAT.

REFERÊNCIAS

01. WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. WHO recommended surveillance standards. World Health Organization, 2008;
02. FRANC, K. A. et al. Brucellosis remains a neglected disease in the developing world: a call for interdisciplinary action. BMC public health, v. 18, n. 1, p. 1-9, 2018;
03. YANG, Xinghong et al. Progress in *Brucella* vaccine development. Frontiers in biology, v. 8, n. 1, p. 60-77, 2013;
04. JACQUES, I.; OLIVIER-BERNARDIN, V.; DUBRAY, G. Efficacy of ELISA compared to conventional tests (RBPT and CFT) for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. Veterinary Microbiology, v. 64, n. 1, p. 61-73, 1998;
05. MIRKALANTARI, Shiva et al. Molecular cloning of virB12 gene of *Brucella melitensis* 16M strain in pET28a vector. Asian pacific journal of tropical medicine, v. 5, n. 7, p. 511-513, 2012;
06. ADONE, R.; PASQUALI, P. Epidemiosurveillance of brucellosis. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics), v. 32, n. 1, p. 199-205, 2013;
07. CHRISTOPHER, Supriya; UMAPATHY, B. L.; RAVIKUMAR, K. L. Brucellosis: review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis. Journal of laboratory physicians, v. 2, n. 2, p. 55, 2010;
08. HOP, Huynh Tan et al. An evaluation of ELISA using recombinant *Brucella abortus* bacterioferritin (Bfr) for bovine brucellosis. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, v. 45, p. 16-19, 2016;
09. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Defesa Animal. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose, 2006;
10. GUPTE, Satish; KAUR, Tanveer. Diagnosis of human brucellosis. Journal of Tropical Diseases & Public Health, 2015;

11. BARROUIN-MELO, Stella Maria et al. Diagnosis of canine brucellosis by ELISA using an antigen obtained from wild *Brucella canis*. Research in veterinary science, v. 83, n. 3, p. 340-346, 2007;
12. FREY, Andreas; DI CANZIO, James; ZURAKOWSKI, David. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. Journal of immunological methods, v. 221, n. 1-2, p. 35-41, 1998;
13. NEUBAUER, H. Brucellosis: new demands in a changing world. Prilozi, v. 31, n. 1, p. 209-217, 2010;
14. UZAL, Francisco A. et al. An indirect ELISA using a monoclonal anti IgG1 enzyme conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. Veterinary microbiology, v. 52, n. 1-2, p. 175-180, 1996;
15. LAWMAN, Michael JP et al. Production of *Brucella abortus*-specific protein A-reactive antibodies (IgG2) in infected and vaccinated cattle. Veterinary microbiology, v. 12, n. 1, p. 43-53, 1986;
16. TABASI, Mohsen; EYBPOOSH, Sana; BOUZARI, Saeid. Development of an indirect ELISA based on whole cell *Brucella abortus* S99 lysates for detection of IgM anti-*Brucella* antibodies in human serum. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, v. 63, p. 87-93, 2019;
17. VATANKHAH, Melody et al. Recombinant Omp2b antigen-based ELISA is an efficient tool for specific serodiagnosis of animal brucellosis. Brazilian Journal of Microbiology, v. 50, n. 4, p. 979-984, 2019;
18. CHAUDHURI, Pallab et al. Recombinant OMP28 antigen-based indirect ELISA for serodiagnosis of bovine brucellosis. Molecular and cellular probes, v. 24, n. 3, p. 142-145, 2010;
19. YIN, Dehui et al. A novel recombinant multiepitope protein candidate for the diagnosis of brucellosis: A pilot study. Journal of Microbiological Methods, v. 174, p. 105964, 2020;

20. LAPAQUE, Nicolas et al. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. Current opinion in microbiology, v. 8, n. 1, p. 60-66, 2005;
21. FARIA, Angélica Rosa et al. Immunoproteomics of *Brucella abortus* reveals potential of recombinant antigens for discriminating vaccinated from naturally infected cattle. Microbial Pathogenesis, v. 147, p. 104345, 2020;
22. BERMAN, David T. et al. Characterization of *Brucella abortus* soluble antigen employed in immunoassay. Journal of Clinical Microbiology, v. 11, n. 4, p. 355-362, 1980;
23. CHAND, P. et al. Comparison of a dot-ELISA and a plate-ELISA for bovine brucellosis diagnosis. Veterinary Record, v. 127, n. 7, p. 169-170, 1990;
24. ROCHA, Keila Patrícia Cardoso et al. Utilização de um teste ELISA indireto para o diagnóstico da brucelose em amostras de soro de búfalas. Revista Científica de Medicina Veterinária, v. 10, n. 30, p. 1679-7353, 2018;
25. BAO, Yanqing et al. Characterization of *Brucella abortus* mutant strain $\Delta 22915$, a potential vaccine candidate. Veterinary research, v. 48, n. 1, p. 1-13, 2017;
26. DE OLIVEIRA, Maria Zoraida Daltro et al. Validation of an ELISA method for the serological diagnosis of canine brucellosis due to *Brucella canis*. Research in Veterinary Science, v. 90, n. 3, p. 425-431, 2011.

Capítulo 2 - Use of postbiotics as an immunomodulatory of the immune response against brucellosis in Nelore calves immunized with S 19 vaccine

Caroline Paes dos Santos¹, Heitor Miraglia Herrera¹, João Bosco Vilela Campos¹, Carolina Santos Pereira Cardoso Trindade¹, Talia Fernandes Silva¹, Emily Rebeca Antunes Gonçalves¹, Filipe Martins Santos¹, Carlos Alberto do Nascimento Ramos², Pedro Fernández Llario³, Amanda Alves Rosa Taveira¹ and Carina Elisei de Oliveira^{1*}

¹Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 79117-900, Brazil.

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 79070-900, Brazil.

³Ingulados S/A – Universidade de Extremadura, Extremadura, Spain.

ABSTRACT

Background: Brucellosis is an important public health disease and a great problem in the cattle production.

Objectives: The aim of this study was to evaluate the immunomodulatory efficiency of a commercial postbiotic in Nelore calves immunized with the *Brucella abortus* S19 vaccine.

Methods: We used 40 calves negative for *Brucella* spp. organized into four treatments during 15 days: InRum (*Ingulbal Ruminant*®); InPro (*Ingulbal Protein*®); RumPro (*Ingulbal Ruminant*® and *Ingulbal Protein*®); and Cont: control. Collections of whole blood and serum samples were performed at the beginning of the administration of postbiotic and at 15, 45, 75 and 105 days after start the experiment. At 15 days, all animals received the

mandatory vaccine S19. In order to assess immunological parameters, the means of total white cells counts, total lymphocytes, monocytes and neutrophils, and total IgG antibodies were determined.

Results: It found a significant increase ($P<0.05$) of white cells counts and serum IgG levels in the three treatment groups throughout the experiment. Additionally, we observe a tendency not significant in a greater number of lymphocytes, monocytes and neutrophils counts in the treat calves.

Conclusion: Our results suggest that the supplementation with postbiotic is a promising alternative to modulate both the cellular and humoral immune response of S19 vaccine against bovine brucellosis

Keywords: brucellosis, cellular immunity, I-ELISA, humoral immunity, S19 vaccine, postbiotics, calves.

1. INTRODUCTION

Brucellosis is a zoonosis caused by Gram-negative bacteria belonging to the genus *Brucella*, that infects humans and a huge variety of domestic and wildlife mammals species [01]. This disease is responsible for large economic losses in livestock production due to abortion and, in spite of it is controlled in some countries, it is enzootic in Mediterranean Europe, Northern and Eastern Africa, Central Asia and Central and South America, ranking 3rd among the most neglected zoonotic diseases [02].

Vaccination is largely used to control and prevent bovine brucellosis, as well as avoid risks of *Brucella* spp. transmission to humans through contamination of dairy products. The vaccines recommended by the International Organization for Animal Health are S19, used in calves and

RB51 in cows [03,04]. In Brazil, the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, created in 2001 the National Program for the Control and Eradication of Brucellosis and Tuberculosis with the main objective of reducing the incidence and prevalence of animal and human brucellosis. Among its goals, it established the massive vaccination of buffaloes and calves between 03 and 08 months of age with the attenuated vaccine *B. abortus* S19 [05].

Since no developed vaccine has achieved a better efficacy than S19, even though it has about 70% efficacy, probably attributable to the lack of adequate adjuvants to produce the desired protective immune response, S19 vaccine is still widely used [06,07]. A potential approach to improve vaccine effectiveness involves modulating the immune system through the use of postbiotics. Postbiotics have mechanisms that bring benefits, such as modification of the gut microbiota, competitive adherence to mucosa and epithelium, improvement of epithelial lining barrier function and modulation of the immune system [08,09].

Postbiotics imply that bacterial viability is not an essential requirement, it refers to inactivated (non-viable) microbial cells, soluble factors (products or metabolic byproducts) secreted by live bacteria or released after bacterial lysis, such as enzymes, peptides, teichoic acids, peptidoglycan-derived muropeptides, polysaccharides, cell surface proteins, and organic acids [10-12]. They are usually derived from bacteria of the genus *Lactobacillus* or *Bifidobacterium* [13]. Postbiotics present safety advantages over probiotics by reducing the risk of microbial translocation, infection or enhanced inflammatory responses and several attractive properties such as clear chemical structures, safety dose parameters, and longer shelf life [14,15].

Due to the need to adopt alternative strategies that increase immune response effectiveness of S19 vaccine, the aim of this work was to evaluate the immunomodulatory effect of supplementation with commercial postbiotics *Ingulbal Ruminant*® and *Ingulbal Protein*®, as well as the association of

these compounds [16]. For this, calves of the Nelore breed had supplemented with postbiotics and subsequent immunization with the S19 vaccine.

2. MATERIAL AND METHODS / EXPERIMENTAL

2.1 Experimental Design

The experiment was approved by Committee on Ethics in the Use of Animals CEUA/UCDB 022/2018. It was carried out on a Private Farm, located in the central region of the Brazilian Pantanal. A total of 40 Nelore calves with 6 months old and average body weight of 150kg were used in the experiment. The animals were adapted to management for two weeks prior to the beginning of the experiment under pasture conditions with supplementary feed of 500 grams per animal/day and water *ad libidum*. The feed consisted of soybean meal and milled whole corn with conventional probiotics and microelements (calcium, sulfur, phosphorus, potassium, magnesium, zinc, selenium, cobalt, copper and manganese). The postbiotic *Ingulbal Ruminant*® and *Ingulbal Protein*® used for the treatments were provided by the company Innovación en Gestión y Conservación de Ungulados S.L. (Ingulados)/Spain; University of Extremadura/Spain (<https://ingulados.com>).

Two weeks prior to the beginning of the experiment all calves were tested negative for brucellosis based on serological (acidified buffered antigen – AAT) and molecular tests (PCR), [17]. The screening test (ATT) was performed over an interval of 15 days so that the seronegativity of the calves could be certified, according to the Ministry of Agriculture. After verifying the negativity for *Brucella* spp., the animals were allocated into four groups with

ten calves per group: InRum (*Ingulbal Ruminant*®); InPro (*Ingulbal Protein*®); RumPro (*Ingulbal Ruminant*® and *Ingulbal Protein*®) and Cont (control).

2.2 Sampling

The sample collections were carried out at the beginning of treatment (T0) and at 15 (T1), 45 (T2), 75 (T3) and 105 (T4) days after T0. The animals belonging to InRum, InPro and RumPro received the defined postbiotics for 15 days (T0 to T1). In T1, all animals were vaccinated with the mandatory vaccine S19. For blood collection, the animals were immobilized individually on beretes. Prior to blood collection, asepsis was performed with the aid of sterile gauze, degerming, iodized alcohol and 70% alcohol. The blood collection for obtaining the serum occurred in a tube without anticoagulant by means of a jugular vein venipuncture with a vacuum needle 38 mm long and 0.9 mm in diameter.

2.3 Evaluation of cellular immune response

The hematological parameters were measured up to eight hours after blood collection in the Neubauer chambers, as described by Voigt (2000) [18]. Lymphocytes, monocytes and neutrophils were performed using blood smears fixed with methanol and stained with Giemsa.

2.4 Evaluation of humoral immune response

The antigen was prepared with *Brucella abortus* strain S2308. The sample was plated on trypticase soy agar (TSA) agar, being incubated at 37°C for 72 hours. The isolated colonies were recovered and grown in 10mL of Trypticase soy broth (TSB), kept in a shaker at 37 ° C for 72 hours. The culture was pelleted by centrifuging 14,000 rpm for 15 minutes, the supernatant was discarded and the pellet obtained was washed three times

with 1x PBS . After discarding the last supernatant, the pellet was resuspended in 1mL of 1x PBS and then boiled in a dry bath at 95°C for 5 minutes, and then subjected to an ice bath for thermal shock. When cooling, the protease inhibitor was added to prevent protein degradation. The samples were sonicated for 3 pulses of 20 seconds (Branson Sonifier 250) and centrifuged at 14,000 rpm for 15 minutes, in order to separate the soluble and insoluble fractions. The supernatant containing the soluble fraction was transferred to a new eppendorf and stored at -20°C until the plate was prepared. Protein quantification was performed using NanoDrop® 2000. For standardization of the ELISA with total antigen stain 2308, optimal dilutions of the antigen, sera, conjugate and buffers were evaluated with four samples of negative and four samples of positive for *Brucella* spp. by the AAT, which were later used as positive and negative controls. After setting the test dilution parameters, the cut-off values were determined using 12 negative sera, establishing the 99% confidence limit according to Frey et al. (1998) [19]. The assay was performed in sterile 96-well flat-bottomed microplates (Cralplast®), with holes adsorbed with the total antigen. The combination with the best performance was 1: 400 antigen and 1: 200 serum. To prepare the plate, 100µL of the antigen diluted in carbonate buffer (pH 9.6) was added to all wells, and the plate was incubated overnight at 4°C. The blockade was performed with 2% fetal bovine serum (Cultilab®) and incubated at 37°C for one hour. After washing the plate, 100 µL of the test sera were applied in duplicate, as well as the positive and negative controls. The assay blank was made with the addition of 100µL of PBST pH 7.2, instead of the serum to be tested. The detection of antibodies was performed with the addition of 100µL of the peroxidase-labeled anti-bovine IgG conjugate (Sigma-Aldrich), in the 1:10,000 dilution. The reaction was developed with 50µL Sigma Fast® OPD (phenylenediamine o-dihydrochloride) and stopped with 50µL of 1M HCl. The result was

determined by absorbance at 490nm using Multiskan™ GO UV/Vis microplate spectrophotometer.

2.5 Statistical Analysis

Descriptive statistics (mean \pm standard deviation) was applied to obtain the average of health parameters. The Shapiro-Wilk test was used to establish the normality of the parameters. Subsequently, Analysis of Variance (ANOVA) was applied to determine the differences between treatments and periods according to normality. The Tukey test was used to evaluate the results in pairs of the ANOVA test.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Cellular Immune Response

The hematological parameters showed that the postbiotic were able to induce significant increase in WBC, in all three treatments comparing to control group, throughout the experiment (Table 1). This marked leukocytosis was accompanied by a tendency in increased mean values of monocytes and lymphocytes in InRum, InPro and RumPro during all the experiment, although significant differences have been found only for lymphocytes in InRum at T2, T3 and T4 while in InPro at T2 and T3 (Table 1). We also detected a slight increase for neutrophil averages in the three treatments comparing to control group in T1, T2 and T4, with a significant increase registered in RumPro and InPro at the T1 and T4 respectively (Table 1).

TABLE 1- WHITE BLOOD CELL COUNTING NELLORE CALVES TREATED WITH POSTBIOTICS

	Groups	White Blood Cell	Lymphocyte	Monocyte	Neutrophil	IgG anti- <i>Brucella</i>
T0 – 0 days Start of treatment	InRum	15,045 ± 2685	11,184 ± 2,333	460 ± 358	2,874 ± 526	0,2673 ± 0,039623 ^a
	InPro	13,975 ± 3094	9,927 ± 2,360	481 ± 315	3,188 ± 963	0,36146 ± 0,144873 ^b
	RumPro	16,025 ± 1739	11,178 ± 2,204	1,011 ± 758 ^b	3,559 ± 1,840	0,369045 ± 0,117313 ^{bc}
	Cont	14,600 ± 2864	10,377 ± 2,516	319 ± 361 ^a	3,675 ± 893	0,281095 ± 0,041693 ^{ad}
T1 – 15 days Vaccination	InRum	14,960 ± 3929 ^b	10,999 ± 3,028	329 ± 195	2,951 ± 1314	0,60205 ± 0,099143 ^b
	InPro	15,500 ± 2715 ^b	10,858 ± 3,099	539 ± 325	3,575 ± 1,577	0,57591 ± 0,081023
	RumPro	15,095 ± 2434 ^b	9,568 ± 3,056	505 ± 189	4,464 ± 2,136 ^b	0,602415 ± 0,097993 ^b
	Cont	12,195 ± 2253 ^a	9,238 ± 1,768	302 ± 248	2,221 ± 917 ^a	0,512625 ± 0,069983 ^a
T2 - 45 days	InRum	16,845 ± 2063 ^b	11,273 ± 2,388 ^b	1,237 ± 513	3,358 ± 1,619	0,866515 ± 0,127913
	InPro	16,510 ± 2341 ^b	11,482 ± 3,012 ^b	817 ± 359	3,658 ± 1,169	0,94554 ± 0,156333 ^b
	RumPro	16,040 ± 1922 ^b	10,768 ± 2,927	940 ± 916	3,809 ± 1,408	0,88586 ± 0,113983
	Cont	12,170 ± 1328 ^a	8,181 ± 1,169 ^a	711 ± 431	2,581 ± 629	0,78443 ± 0,091913 ^a
T3 - 75 days	InRum	16,345 ± 1570 ^b	10,597 ± 872 ^b	684 ± 587	4,161 ± 1,438	0,68576 ± 0,135503
	InPro	17,500 ± 2412 ^{b,c}	10,953 ± 2,007 ^b	719 ± 725	4,827 ± 1,344	0,76467 ± 0,170743 ^b
	RumPro	15,435 ± 2560 ^{...d}	9,559 ± 1,467	832 ± 720	4,212 ± 1,442	0,76353 ± 0,163073 ^b
	Cont	13,820 ± 1010 ^a	8,655 ± 1,181 ^a	276 ± 331	4,310 ± 903	0,6466 ± 0,088263 ^a
T4 - 105 days	InRum	16,975 ± 2804 ^b	11,353 ± 2,088 ^b	123 ± 186	4,728 ± 1,536	0,59727 ± 0,084833 ^a
	InPro	17,830 ± 3287 ^{b,c}	9,493 ± 2,512	204 ± 182	7,081 ± 3,235 ^b	0,71265 ± 0,154383 ^b
	RumPro	15,195 ± 1927 ^{...d}	9,214 ± 2,027	223 ± 188	5,287 ± 1,756	0,75672 ± 0,132343 ^{bc}
	Cont	13,555 ± 1225 ^a	8,379 ± 1,648 ^a	126 ± 229	4,509 ± 1,393 ^a	0,642345 ± 0,086923 ^{-d}

T0 - start of treatment with postbiotics, T1 - end of the administration of postbiotics and immunization with vaccine S19. Hematological data are expressed by mean values ± standard deviations in mm³. Different letters indicate significant difference to $p \leq 0.05$. InRum- Ingulbal Ruminant[®]; InPro - Ingulbal Protein[®]; RumPro - Ruminant[®] + Protein[®] and Cont – control.

3.2. Humoral Immune Response

Regarding levels of anti-*Brucella* antibodies, we observed an overall increase in IgG concentrations after administration of postbiotics in the three treated groups after the start (T0) until to the end of the experiment (T4) (Figure 1). The significant increase of IgG serum levels was detected in InRum in T1; in InPro in T2 until to the end of experiment; and in RumPro during T1, T3 and T4 (Table 1).

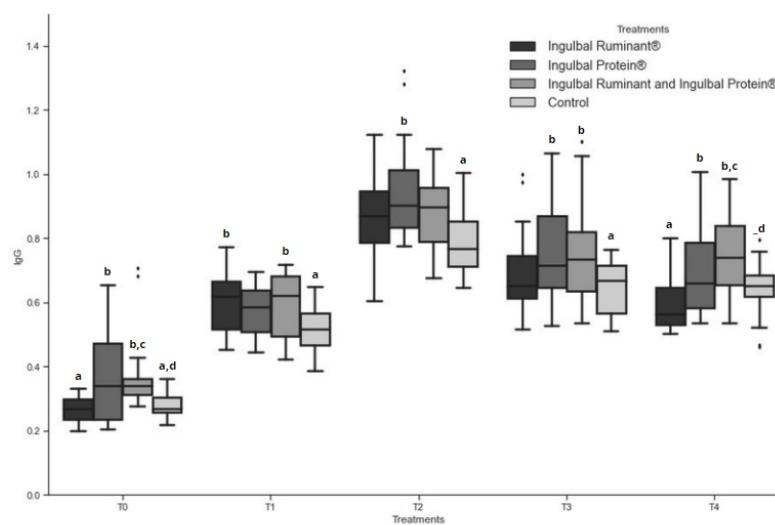


FIGURE 1 - VALUES OF THE OPTICAL DENSITY OF IGG ANTI-*BRUCELLA* ANTIBODIES BY THE INDIRECT ELISA METHOD AT 490NM USING MULTISKAN™ GO UV/VIS MICROPLATE SPECTROPHOTOMETER

When comparing the periods, it is possible to observe a typical IgG behavior after immunization with the S19 strain, with a peak in 30 days after vaccination (T2), returning to initial levels after 60 days (T4). Additionally, we observed significant variations for serum IgG values of all three treated groups: increase between T0 to T1, and T1 to T2 ($P < 0.05$); decrease between T2 and T3 ($P < 0.05$), remaining the same until the end of experiment (T4) ($P > 0.05$).

In general, our results showed that the use of the *Ingulbal Ruminant*® and *Ingulbal Protein*® postbiotics were able to modulate the immune system of calves, before and after vaccination against brucellosis, since the treatment groups have a tendency to increase the numbers lymphocytes and monocytes. In addition, an increase in the

levels of immunoglobulin antibodies (total IgG) presented by the treated groups, in relation to the control reinforce the activation of the immune system.

The immunomodulatory effect of postbiotics is related to their ability to induce or suppress the immune system by regulating the production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. Also, postbiotics favor immunity of the intestinal mucosa [20]. The modulation of the immune system can generate an effective adaptive immune response mediated by cells, ideal way to mitigate intracellular infectious agents, such as *Brucella* spp. [21].

In our study, we observed a leukocytosis in the treated groups throughout the experiment due to the activation of the lymphoreticular system for production and transportation of the antibodies in trial to fight the infection. Also the leukocytosis might be due to stimulation of cell mediated immunity [22,23] It is noteworthy that the observed tendency in increase lymphocytes count in the treated calves indicates an adaptive immune response. Indeed, helper T (Th) cells secrete cytokines that assist B cells to build an effective antibody response [24].

Postbiotics are inactivated microbial cells acting as co-stimulate of the induction of the immune response, playing an important role in homeostatic mechanisms due to the presence of peptidoglycans and lipopolysaccharides [13]. These fragments are released in small amounts in the intestines and are fundamental in the activation of macrophages and neutrophils and, consequently, stimulating the production of cytokines, such as IL-1, IL-6, IL-8 and IL-12, in addition to TNF - α . [25]. In addition, there is the hypothesis that the postbiotic can exert immunomodulation activity by increasing the levels of Th1-associated cytokines and reducing the Th2-associated cytokines [26].

The process of opsonization and phagocytosis of *Brucella* spp. is mediated by Th1 response, that include the production of IFN- γ by CD4⁺ cells, cytotoxic T lymphocytes (CD8⁺ cells), activation of macrophages and production of IgG2a [27]. Although, Th2 response is not effective to intracellular infectious agents, which is associated with the production of IgG1, an intricate interaction between the host and the pathogen requires a balance between the Th1 and Th2 responses. Actually, the dominant IgG2a responses in the early stages of disease can provide protection against brucellosis [28].

Furthermore the occurrence of subacute ruminal acidosis (SARA) in cattle fed a diet rich in grains causes greater acidity, resulting in higher lipopolysaccharide (LPS) activity in the rumen [29]. The increase in ruminal LPS translocates to the bloodstream and can elicit inflammatory and acute-phase protein (APP) responses in cattle and overload liver cells [29-31]. The metabolic consequences of uncontrolled inflammation induced by LPS challenge can be harmful, especially in the early stages of lactation and when there is a marked degree of mobilization of body fat [30,31]. However, studies that administer anti-LPS have observed a decrease in immune-mediated colitis and intestinal inflammation in murine models [32] in addition to mitigating ruminal LPS release and pH depression without following responses in acute phase inflammation or hepatic transcriptomic expression in cattle [31]. Thus, we can suggest that modulate intestinal microbiome can increasingly serve as a target for regulatory T cell-based immunotherapy [31-33].

The method of evaluating the effectiveness of the vaccine is by measuring levels of antibodies in the serum after vaccination, since they directly correlate with protection and, therefore, these methods can be used as a reference to determine the regulation of probiotics or post-biotics in the immune response system [34]. Regarding the humoral immune response, in our experiment it was possible to observe a typical behavior of total IgG after immunization with the S19 strain, with a peak in 30 days after vaccination and returning to lower levels after this period [35,36].

We observe that the groups fed with postbiotics had a significant increase in the production of IgG in different periods, although it was not possible to distinguish the best treatment with different types of postbiotics. In fact, in the group treated with *Ingulbal Protein*®, IgG levels increased in all periods after suspension of supplementation with postbiotic and immunization, while the group treated with *Ingulbal Ruminant*®, the stimulus in the production of IgG was significant, only during supplementation (T1). For the group treated with *Ingulbal Protein*® and *Ingulbal Ruminant*®, the production stimulus was late, and occurred after 75 days of the treatment, remained until the end of the experiment. In addition, although the increase of total IgG levels after S19 vaccination was expected [34], the observed levels of optical density (O.D.) are low, probably due to the I-ELISA test assessing the

levels of total IgG while IgG1 and IgG2a antibodies are the ones that confer a protective immune response against *Brucella* spp. [37].

The treatment of cattle with functional components has been studied in the interaction with other infectious agents shown effectiveness in potentiating the immune response in immunized animals [38]. Pérez et al., 2019, evaluated the performance of supplementation with *Ingulbal Ruminant*® and *Ingulbal Protein*® in cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis and detected a significant improvement in the health of animals due to increase in red blood cells, and normalization in the levels of total proteins, globulins, creatine and aspartate aminotransferase [16]. In addition, a study conducted by Shenderov (2013) revealed that postbiotics have a good capacity for absorption, metabolism, distribution and excretion, indicating satisfactory physiological responses of different organs and tissues of the host [39]. Furthermore, it has been shown that postbiotics can mimic the health effects of probiotics, avoiding the administration of live microorganisms which are not always harmless in addition to having several attractive properties, such as clear chemical structures, safety dose parameters and longer useful life long [13,15].

It is considered that postbiotics should be administered continuously to exert their effects, however, even with the interruption of the postbiotic supply at 15 days, our results show that the modulation of the immune system continued, even 105 days after the start of treatment. This fact may indicate that the immunomodulatory effect is perpetuated by stimulating the population of memory cells, which will respond actively in cases of future contacts with the antigen [40].

4. CONCLUSION

Use of postbiotics *Ingulbal Protein*® and *Ingulbal Ruminant*® may contribute to the improvement the host immune system by stimulating the production of lymphocytes and neutrophils and increase specific IgG antibodies anti-*Brucella abortus* after immunization with compulsory vaccine S19. Supplementation with postbiotics is an accessible, safe, healthy and profitable strategy for optimizing animal production. Additionally, by enhancing the immune system, cattle can cope with different

infectious agents more effectively, including *Brucella* spp. This alternative could become an important tool resulting in a favorable cost-benefit ratio, since reduction in the prevalence of brucellosis have positive socioeconomic impacts.

DISCLAIMER

The products used for this research are commonly and predominantly use products in our area of research and country. There is absolutely no conflict of interest between the authors and producers of the products because we do not intend to use these products as an avenue for any litigation but for the advancement of knowledge. Also, the research was not funded by the producing company rather it was funded by personal efforts of the authors.

CONSENT

It is not applicable.

ETHICAL APPROVAL

This study was approved by committee on Ethics in the Use of Animals (CEUA/UCDB) 022/2018.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Dr. Carlos Aberto Ramos Nascimento, for the technical support and donation of materials for I-ELISA and to the Research Group InsanaHuna (Campo Grande-MS, Brazil) for assistance in the field work support. This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) by Productivity Grant granted to the Herrera MH (CNPq Process No. 308768/2017-5); Ingulados-Research; Coordination for the Improvement of Higher Education (CAPES) by a scholarship to Santos CP.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

01. Pappas, G. The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats. International journal of antimicrobial agents. 2010, 36, S8-S11; DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2010.06.013
02. Hashem, M. A. et al. Hematological, Biochemical and Immunological Studies on Brucellosis in Cows and Ewes in Dakahlia and Damietta Governorates, Egypt. **Zagazig Veterinary Journal**, 2020., v. 48, n. 1, p. 23-35
03. Poester, F.P.; Gonçalves, V.S.; Lage, A.P. Brucellosis in Brazil. Veterinary Microbiology. 2002, 90, 55-62; DOI: 10.1016/s0378-1135(02)00245-6
04. BRASIL. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília. 2006.192p;
05. BRASIL. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília. 2017.192p;
06. Lubroth J., Rweyemamu M.M., Viljoen G., Diallo A., Dungu B., Amanfu W. Veterinary vaccines and their use in developing countries. Rev Sci Tech. 2007, 26, 179-201;
07. Yang, X., Skyberg, J. A., Cao, L., Clapp, B., Thornburg, T., & Pascual, D. W. Progress in *Brucella* vaccine development. Frontiers in biology. 2013, 8, 60-77; doi: 10.1007/s11515-012-1196-0
08. Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., & Gil, A. Probiotic mechanisms of action. Annals of Nutrition and Metabolism. 2012, 61(2), 160-174; <https://doi.org/10.1159/000342079>
09. Vyas, U.; Ranganathan, N. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: gut and beyond. Gastroenterology research and practice. 2020, 2012; DOI: 10.1155/2012/872716
10. Cicenia, A., Santangelo, F., Gambardella, L., Pallotta, L., Iebba, V., Scirocco, A., ... & Severi, C. Protective role of postbiotic mediators secreted by *Lactobacillus rhamnosus* GG versus lipopolysaccharide-induced damage in human colonic smooth muscle cells. Journal of clinical gastroenterology. 2016, 50, S140-S144; DOI: 10.1097/MCG.0000000000000681
11. Konstantinov, S.R.; Kuipers, E. J.; Peppelenbosch, M. P. Functional genomic analyses of the gut microbiota for CRC screening. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. 2013, 10, 741-745; DOI: 10.1038/nrgastro.2013.178
12. Tsilingiri, K.; Rescigno, M. Postbiotics: what else?. Beneficial microbes 2013, 4, 101-107; DOI: 10.3920/BM2012.0046

13. Aguilar-Toalá, J. E., Garcia-Varela, R., Garcia, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., & Hernández-Mendoza, A. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology* 2018, 75, 105-114; <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.009>
14. Taverniti, V.; Guglielmetti, S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes & nutrition* 2011, 6, 261-274; doi: 10.1007/s12263-011-0218-x
15. Tomar, S. K., Anand, S., Sharma, P., Sangwan, V., & Mandal, S. Role of probiotics, prebiotics, synbiotics and postbiotics in inhibition of pathogens. *The Battle against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*, Méndez-Vilas, A., Ed, 2015; Volume, pp. 717-732;
16. Pérez, D. R., Fernández, J., Jiménez, W. L. G., Bravo, M., Blanco, M. D. P. G., Arenas, V., ... & Llario, P. F. Mejora de signos clínicos de paratuberculosis en bovino mediante la aplicación de suplementos alimenticios. *Ganadería* 2019, 120, 40-44;
17. de Oliveira, A. L. B., de Macedo, G. C., Rosinha, G. M. S., Melgarejo, J. L., Alves, A. G. L., Barreto, W. T. G., ... & de Oliveira, C. E. Detection of *Brucella* spp. in dogs at Pantanal wetlands. *Brazilian Journal of Microbiology* 2019, 50(1), 307-312. DOI: 10.1007/s42770-018-0006-5
18. Voigt, G. L., Swist, S. L. *Hematology techniques and concepts for veterinary technicians*. John Wiley & Sons, 2011;
19. Frey, A.; Di Canzio, J.; Zurakowski, D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *Journal of immunological methods* 1998, 221, 35-41; DOI: 10.1016/s0022-1759(98)00170-7
20. Wegh, C. A., Geerlings, S. Y., Knol, J., Roeselers, G., & Belzer, C. Postbiotics and their potential applications in early life nutrition and beyond. *International journal of molecular sciences* 2019, 20(19), 4673; DOI: 10.3390/ijms20194673
21. Diacovich L., Gorvel J.P. Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. *Nat Rev Microbiol* 2010; DOI: 10.1038/nrmicro2295
22. Ghazi, Y. A.; El-Deeb, E. D.; Abou-Ziena, H. A. Some metabolic profile of *brucella*-infected buffaloes with special emphasis to endometritis. *J Egy Vet Med Ass*, 2001, v. 61, n. 1, p. 157-171;
23. Ahmed, T. M. et al. Camel brucellosis, serological, hematological and biochemical profile. *J. Egypt Vet. Med. Ass*, 2004, v. 64, p. 195-206;
24. Izuddin, W. I., Loh, T. C., Foo, H. L., Samsudin, A. A., & Humam, A. M. Postbiotic *L. plantarum* RG14 improves ruminal epithelium growth, immune status and upregulates the intestinal barrier function in post-weaning lambs. *Scientific reports* 2019, 9(1), 1-10; DOI: 10.1038/s41598-019-46076-0

25. Erickson K.L., Hubbard N.E. Probiotic immunomodulation in health and disease. *J Nutr* 2000 ;130(2S Suppl):403S-409S. doi: 10.1093/jn/130.2.403S. PMID: 10721915.
26. Menard, S., Laharie, D., Asensio, C., Vidal-Martinez, T., Candalh, C., Rullier, A., ... & Heyman, M. *Bifidobacterium breve* and *Streptococcus thermophilus* secretion products enhance T helper 1 immune response and intestinal barrier in mice. *Experimental Biology and Medicine* 2005, 230(10), 749-756; DOI: 10.1177/153537020523001008
27. Golding, B., Scott, D. E., Scharf, O., Huang, L. Y., Zaitseva, M., Lapham, C., ... & Golding, H. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes and infection* 2001, 3(1), 43-48.; DOI: 10.1016/s1286-4579(00)01350-2
28. Khatun M.M., Islam M.A., Baek B.K. The Profile of Immunoglobulin A and Immunoglobulin G Subclasses in Sprague Dawley Rats Experimentally Infected with *Brucella abortus* Biotype 1. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2020, 20(5), 358-364. doi: 10.1089/vbz.2019.2516; DOI: 10.1089/vbz.2019.2516
29. Watanabe Y, Kim YH, Kushibiki S, Ikuta K, Ichijo T, Sato S. Effects of active dried *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal fermentation and bacterial community during the short-term ruminal acidosis challenge model in Holstein calves. *J Dairy Sci* 2019, 102(7):6518-6531
30. Suzuki MM, Matsumoto M, Omi H, Kobayashi T, Nakamura A, Kishi H, et al. Interaction of peptidebound beads with lipopolysaccharide and lipoproteins. *J Microbiol Method* 2014 ;100:137-141
31. Mizuguchi H, Kizaki K, Kimura A, Kushibiki S, Ikuta K, Kim YH, Sato S. Anti-lipopolysaccharide antibody mitigates ruminal lipopolysaccharide release without acute-phase inflammation or liver transcriptomic responses in Holstein bulls. *J Vet Sci* 2021, 22(3):e34 <https://doi.org/10.4142/jvs.2021.22.e34>
32. Ben Ya'acov A, Lichtenstein Y, Zolotarov L, Ilan Y. The gut microbiome as a target for regulatory T cell based immunotherapy: induction of regulatory lymphocytes by oral administration of anti-LPS enriched colostrum alleviates immune mediated colitis. *BMC Gastroenterol* 2015, 15(1):154.
33. Minuti A, Zhou Z, Graugnard DE, Rodriguez-Zas SL, Palladino AR, Cardoso FC, et al. Acute mammary and liver transcriptome responses after an intramammary *Escherichia coli* lipopolysaccharide challenge in postpartal dairy cows. *Physiol Rep* 2015, 3(4):e12388.
34. Macdonald, T.T., Bell, I. Probiotics and the immune response to vaccines. *Proc.Nutr. Soc* 2010, 69, 442–446; DOI: 10.1017/S0029665110001758
35. Hall S.M, Confer A.W., Patterson JM. *Brucella abortus*-specific immunoglobulin in isotypes in serum and vaginal mucus from cattle vaccinated with strain 19 and challenge exposed with virulent strain 2308. *American Journal of Veterinary Research* 1988, 49, 840-6;

36. Nielsen, K., Gall, D., Jolley, M., Leishman, G., Balsevicius, S., Smith, P., ... & Thomas, F. A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *Journal of immunological methods* 1996, 195(1-2), 161-168; DOI: 10.1016/0022-1759(96)00116-0
37. Oliveira S. C., Splitter G. A. CD8+ type 1 CD44hi CD45 RBlo T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice. *Eur J Immuno* 1995, 25, 2551–7; DOI: 10.1002/eji.1830250922
38. Santillana, M. B. Posbióticos, un concepto innovador en nutrición animal. *Albóitar: publicación veterinaria independiente* 2020, 236, 16-18;
39. Shenderov, B. A. Metabiotics: novel idea or natural development of probiotic conception. *Microbial ecology in Health and Disease* 2013, 24, 20399; DOI: 10.3402/mehd.v24i0.20399
40. Roos, T. B., Dummer, L. A., Fischer, G., & Leite, F. P. L. The immune modulation of *Bacillus cereus* var. *Toyo* in mice immunized with experimental inactivated Bovine Herpesvirus Type 5 vaccine. *Vaccine* 2012, 30(12), 2173-2177 DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.01.007



Microbiology Research Journal International

31(4): 52-61, 2021; Article no.MRJI.70182

ISSN: 2456-7043

(Fast name: British J Microbiology Research Journal, Fast ISSN: 2231-0556, NLM ID: 101605140)

Use of Postbiotics as an Immunomodulatory of the Immune Response against Brucellosis in Nellore Calves Immunized with S 19 Vaccine

Caroline Paes dos Santos¹, Heitor Miraglia Herrera¹,
 João Bosco Vilela Campos¹, Carolina Santos Pereira Cardoso Trindade¹,
 Talia Fernandes Silva¹, Emily Rebeca Antunes Gonçalves¹,
 Filipe Martins Santos¹, Carlos Alberto do Nascimento Ramos²,
 Pedro Fernández Llario³, Amanda Alves Rosa Taveira¹
 and Carina Elisei de Oliveira^{1*}

¹Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 79117-900, Brazil.

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 79070-900, Brazil.

³Ingulados S/A – Universidade de Extremadura, Extremadura, Spain.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration among all authors. Authors PFL, HMM and CEO conceptualized the writing. Data collection and analysis were performed by authors HMM, AART, FMS, JBVC, CPS, TFS, ERAG, CSPCT and CEO. Data validation by authors FMS, CANR and CEO; Formal analysis by author FMS; Investigation performed by authors PFL, HMM, and CEO; Resources, by authors CEO and HMM; and data curation performed by authors CANR, FMS and CEO. Original draft preparation writing by author CPS; review, editing and visualization by authors CEO and HMM. Supervision and funding acquisition by authors CEO and HMM; project administration by authors PFL, FMS and HMM. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/MRJI/2021/311430312

Editor(s):

(1) Dr. Ana Cláudia Coelho, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Portugal.

Reviewer(s):

(1) Mohamed Abd El-Azlem Hashem, Zagazig University, Egypt.

(2) Sherin S. Abdelgayed, Cairo University, Egypt.

Complete Peer review History: <http://www.sdarticle4.com/review-history/70182>

Original Research Article

Received 20 April 2021

Accepted 25 June 2021

Published 30 June 2021

ABSTRACT

Background: Brucellosis is an important public health disease and a great problem in the cattle production.

Objectives: The aim of this study was to evaluate the immunomodulatory efficiency of a commercial

*Corresponding author. E-mail: carinaelisei@ucdb.br, carinaelisei@yahoo.com.br, r4303@ucdb.br