

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM BOVINOS VACINADOS
COM A ANTIRRÁBICA E SUPLEMENTADOS COM PROBIÓTICO**

**ASSESSMENT OF IMMUNE RESPONSE IN CATTLE HUMORAL VACCINATED
WITH RABIES E SUPPLEMENTED WITH PROBIOTIC**

ROSA, Eneida Rodrigues

Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária da Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE

SOARES, Francielli Martines

Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária da Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE

PACHECO, Alessandro Mendes

Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça-SP FAEF/FAMED

MONTANHA, Francisco Pizzolato

Docente do Curso de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça-SP FAEF/FAMED

GALLINA, Neuza Maria Franzatti

Instituto Butantan/São Paulo

PARDO, Paulo Eduardo

Docente do Curso de Medicina Veterinária da Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE



RESUMO

Esse estudo avaliou o efeito da suplementação do probiótico adicionado à mistura mineral na resposta imune humoral em bovinos vacinados com uma única dose de vacina antirrábica. 40 bovinos machos, nelore, com idade de 12 meses foram divididos aleatoriamente em 2 grupos (20 bovinos/grupo): Grupo controle (GC) com 70 gramas de suplemento mineral/animal/dia, grupo probiótico (GP) com 70 gramas de suplemento mineral adicionado 4 gramas de probiótico/animal. Os títulos individuais de anticorpos neutralizantes foram determinados por meio da técnica de soroneutralização baseado no Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) e no Fluorescent Inhibition Microtest (FIMT). Não houve diferenças estatísticas significativas entre as médias de concentrações séricas entre os grupos, concluindo que a administração de probióticos não interfere na resposta imune humoral antirrábica.

Palavra chave: Imune Humoral, Probiótico, Bovinos

ABSTRACT

This study evaluated the effect of probiotic supplementation of mineral mixture added to the humoral immune response in cattle vaccinated with a single dose of rabies vaccine. 40 steers, Nelore, aged 12 months were randomly divided into 2 groups (20 animals / group): control group (CG) with 70 grams of mineral / animal / day, probiotic group (GP) with 70 grams of supplement mineral added 4 grams of probiotic / animal. The individual titles of neutralizing antibodies were determined by neutralization technique based on the Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) and Fluorescent Inhibition Microtest (FIMT). There was no statistically significant differences between the mean serum concentrations between groups, concluding that the administration of probiotics does not interfere with the humoral immune response rabies

Keyword: Humoral Immune, Probiotic, Cattle

INTRODUÇÃO

A raiva é uma enfermidade infecciosa viral do sistema nervoso central dos mamíferos, causada por um vírus neurotrópico, RNA, de ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae* e do gênero *Lyssavirus* (GIOMETTI et al., 2006; ACHKAR et al., 2007; CONSALES e



BOLZAN, 2007; REIS et al., 2008), onde no Brasil, o principal agente transmissor do vírus rábico é o morcego hematófago *Desmodus rotundus* (ALBAS et al, 2006; SCHEFFER et al., 2007).

A vacinação é o melhor método de controle da raiva por ser efetivo e de baixo custo (ALBAS et al., 2005 e 2006; CAZELLA et al., 2009, MARIA et al., 2009), portanto, faz-se necessária a busca por alternativas que aumentem a eficácia da vacinação contra o vírus rábico. O uso de adjuvantes tem revelado bons resultados na restauração da resposta imunitária e na potencialização de vacinas em relação a diversos agentes patógenos (RODRIGUES et al., 2000, REIS et al., 2008; CAZELLA, et al., 2009; MARIA et al., 2009)

Uma das estratégias para aumentar a resposta imunológica dos animais à imunidade induzida ou às infecções provocadas por vírus ou bactérias é o uso de probióticos (ARENAS, et al., 2009; FERREIRA et al., 2009) ao suplemento mineral utilizado.

Probióticos são suplementos alimentares que contêm microrganismos vivos, que administrado em quantidade adequada, produzem efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro (animais e seres humanos) (ALMEIDA et al., 2007; MILES, 2007; HOLANDA et al., 2008; PARDO E REIS, 2008), promovendo a saúde e não a cura de doenças (MORAES e COLLA, 2006; KARKOW et al., 2007; OMGE, 2008; FERREIRA et al., 2009). É definido também como “uma preparação ou produto contendo determinado (s) microrganismo (s) viável (eis), em quantidades suficientes, que alteram a microbiota em um determinado compartimento do hospedeiro exercendo, deste modo pelo menos um efeito benéfico”. Estes microrganismos são mundialmente utilizados como preparações farmacêuticas ou produtos fermentados. (MARTINS et al., 2005, PARDO, REIS, 2008).

A eficácia de utilização dos probióticos é estritamente dependente da quantidade e características das cepas de microrganismos utilizados na elaboração do produto a ser utilizado como aditivo alimentar. As espécies bacterianas mais comuns para o preparo deste tipo de produtos são: *Lactobacillus bulgaris*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. lactis*, *L. salivarius*, *L. plantarium*, *L. reuteri*, *L. johonsie*, *Streptococcus thermophilus*, *Enderococcus faecium*, *E. faecalis*, *Bifidobacterium ssp*, *Bacillus subtilis*, *B. toyoi*, *Aspergillus oryzae* e *Saccharomyces cerevisiae* (MATOS, 2008).

A grande vantagem da terapia com os probióticos é a ausência de efeitos secundários, como a seleção de bactérias resistentes. Os efeitos benéficos destes microrganismos são



basicamente os mesmos da microbiota normal do corpo humano. O que se faz neste caso é a utilização, em grande quantidade, daqueles que possuem eficácia comprovada, podendo ser constituintes normais da microbiota, como é o caso das bifidobactérias e dos lactobacilos, ou não, como a levedura *S. boulardii*. Além do mais, uma das principais preocupações da Organização Mundial da Saúde é a implementação de novas terapias que não atuem como uma forte pressão seletiva, propiciando a geração de patógenos cada vez mais agressivos e resistentes (MARTINS et al., 2005).

Os probióticos também atuam estimulando o sistema imunológico (SILVA et al, 2006, PARDO,REIS, 2008)). Várias pesquisas têm demonstrado que estes microorganismos estimulam a atividade fagocítica dos leucócitos (OYETAYO e OYETAYO, 2005).

Argumenta-se que a utilização de probióticos possa contribuir na promoção do crescimento animal, melhora na conversão alimentar, diminuição do estresses (PENHA et al 2011), maior absorção de nutrientes pelo controle da diferenciação e proliferação das células epiteliais, neutralização de fatores antinutricionais, melhora no metabolismo de carboidratos, cálcio e síntese de vitaminas, produção de enzimas microbianas para compensar atividades deficientes de enzimas do hospedeiro, eliminação ou controle de microorganismos patogênicos causadores de doenças subclínicas ou clínicas e estímulo da imunidade específica ou não específica no intestino, porém ainda são escassos e inconsistentes os estudos sobre a ação de microorganismos probióticos sobre os parâmetros ruminais e desempenho produtivo de ruminantes (MATOS, 2008).

OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi de avaliar o efeito da suplementação do probiótico sobre a resposta imune humoral em bovinos vacinados com uma única dose de vacina antirrábica.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido nos meses de maio e outubro de 2011 com o período experimental de 150 dias, no município de Presidente Bernardes, É um município brasileiro do estado de São Paulo. Localiza-se a uma latitude 22°00'22" sul e a uma longitude 51°33'11" oeste, estando a uma altitude de 429 metros



. Utilizaram-se 40 bovinos, machos inteiros da raça Nelore (*Bos indicus*) com idade de, aproximadamente, 15 meses, divididos aleatoriamente em 2 grupos (20 bovinos/grupo), onde o grupo controle (GC) recebeu mistura mineral sem probiótico e no grupo probiótico (GP) os animais foram suplementados com mistura mineral proteinada adicionada de probiótico Proenzime[®]. Os animais do GP consumiram 4g de probiótico/animal/dia durante o período experimental conforme Arenas et al.(2009). No dia zero do experimento, aplicou-se em todos os bovinos uma dose de 2 mL desta vacina por via subcutânea.

Os pastos utilizados por todos os grupos eram semelhantes na topografia e composição botânica, sendo formados por *Brachiaria brizantha*. O sistema de pastejo adotado foi o extensivo.

As amostras de sangue dos bovinos foram colhidas nos dias 0, 75 e 150. O sangue foi colhido por meio da punção da veia jugular em tubos à vácuo sem anticoagulante, centrifugados a 2.500 rpm por 10 minutos e as amostras de soro foram acondicionadas em tubos plásticos de 1,5 mL e armazenadas em freezer a -20 °C para posterior determinação do título de anticorpos neutralizantes anti-rábicos.

Os títulos de anticorpos neutralizantes anti-rábicos foram determinados por meio da técnica de soroneutralização em células BHK₂₁, teste esse, baseado no Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test – RFFIT e no Fluorescent Inhibition Microtest - FIMT.

Utilizou-se um probiótico comercial devidamente registrado e aprovado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), composto por: amilase, celulase, protease, lipase, pectinase, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Bifidobacterium longum* e zinco.

No dia zero os soros dos animais não apresentaram anticorpos neutralizantes para a raiva, mostrando que os bovinos não haviam tido contato com o vírus rábico selvagem ou vacinal. Assim, as variações encontradas nos títulos de anticorpos anti-rábicos nos soros dos bovinos durante o experimento foram induzidas pela vacinação anti-rábica realizada no dia zero juntamente com o efeito da suplementação com probiótico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostraram que não houve efeito da interação entre grupos e dias e nem entre os grupos tratados ou não com probiótico, grupos GP e GC respectivamente.



Assim a suplementação com probiótico não foi capaz de imunoestimular os bovinos. Esses resultados obtidos concordam o trabalho de Ferreira et al. (2009) onde avaliaram a resposta imune humoral em bovinos utilizando vacina antirrábica e suplementação com probióticos e não encontraram diferenças estatísticas significativas entre as médias de concentrações séricas entre os grupos. Entretanto diferem de ARENAS et al. (2009) que observaram aumento significativo nos títulos de anticorpos anti-rábicos nos bovinos suplementados com probiótico Proenzime[®].

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que 75 e 150 dias após a imunização anti-rábica dos bovinos, independente da suplementação ou não com o probiótico, grupos GP ou GC respectivamente, as médias dos títulos de anticorpos anti-rábicos estavam acima do considerado protetor ($\geq 0,50$ UI/mL). Desta forma, estes resultados confirmam que vacina utilizada neste experimento teve boa eficiência em soroconverter os bovinos primovacinados contra a raiva em ambos os dias de observação, fato que é desejável para o controle da raiva nos bovinos.

Na Tabela 1 nota-se que houve redução significativa nos títulos de anticorpos anti-rábicos entre os dias 75 e 150 em ambos os grupos experimentais. Provavelmente isto seja uma característica da resposta imune humoral anti-rábica em bovinos primovacinados. Este fato também foi observado por GIOMETTI et al. (2006, FERREIRA et.al .2009)). Este resultado reforça a necessidade da aplicação de uma dose de reforço da vacina anti-rábica em bovinos primovacinados para os animais obterem títulos de anticorpos anti-rábicos elevados e persistentes.

Tabela 1- Média (\pm desvio padrão) dos títulos de anticorpos anti-rábicos de bovinos Nelore primovacinados e sob suplementação alimentar de 0 (GC) e 4 (GP) g de probiótico/animal/dia.

Grupos de bovinos	Títulos de anticorpos anti-rábicos (UI/mL)	
	Dias de observação	
	75	150
GC	1,16 ^{Aa} \pm 3,64	0,74 ^{Ab} \pm 1,64
GP	2,25 ^{Aa} \pm 3,46	1,14 ^{Ab} \pm 2,38



Médias seguidas de letras maiúsculas iguais, num mesmo dia de observação, não apresentam diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos de bovinos.

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, num mesmo grupo, indicam diferença significativa ($p>0,05$) entre os dias de observação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados obtidos neste estudo, conclui-se, que a suplementação com probiótico adicionado ao sal mineral não alterou a resposta imune humoral e confirmam que para obtenção de um título de anticorpos anti-rábicos elevados e persistentes, são necessárias duas doses de vacina anti-rábica inativada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHKAR, S. M. et al. Immunopathology of rabies infection in mice selected for high or low acute inflammatory reaction. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 13, p. 39-55, 2007.

ALBAS, A. et al. Vacinação antirrábica em bovinos: Comparação de cinco esquemas vacinais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 153-159, 2005.

ALBAS, A.; FONTOLAN, O. L.; PARDO, P. E.; BREMER NETO, H.; SARTORI, A. Interval between first dose and booster affected antibody production in cattle vaccinated against rabies. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 12, n. 3, p. 476-486, 2006.

ALMEIDA, F.H.S. et. al. Probióticos e seus efeitos sob a compreensão do consumidor. **Revista Científica da FAMINAS**. Muriaé - v. 3, n. 1, sup. 1, p. 367, jan.-abr, 2007.

ARENAS, S.E., et al. Probiotic increase the antirabies humoral immune Response in bovine. **Arch. Zootec.** 58 (224): 733-736, 2009.



AYRES, M., AYRES JÚNIOR, M., AYRES, D.L., SANTOS, A.A. BIOESTAT –Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Ong Mamiraua. Belém, PA., 2007

BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006.

CONSALES, C. A.; BOLZAN, V. L. Rabies review: Immunopathology, clinical aspects and treatment. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 13, n. 1, p. 5-38, 2007.

FERREIRA, L.A. et al. Avaliação da vacinação anti-rábica e da suplementação com probiótico na resposta imune humoral em bovinos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 655-660, jul./set., 2009.

GIOMETTI, J. et al. Influência da suplementação com cromo na resposta imune humoral antirrábica em bovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 4, p. 421-427, 2006.

HOLANDA, L.B. et. al. Conhecimento sobre probióticos entre estudantes de uma instituição de ensino superior. **Revista Acadêmica Digital do Grupo POLIS Educacional**. Ano 04, nº 05. Jul.,Dez., 2008.

KARKOW, F.J.A.; FAINTUCH, J.; KARKOW, A.G.M. Probióticos: perspectivas médicas. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, 51 (1): 38-48, jan.-mar. 2007.

MARTINS, F.S. et. al. Estudo do potencial probiótico de linhagens de *saccharomyces cerevisiae* através de testes *in vitro*. **Revista de biologia e ciências da terra**. Volume 5- Número 2, 2º Semestre 2005.

MATOS, B.C. Uso de aditivos na pecuária leiteira: revisão. **PUBVET**, V.2, N.9, Mar1, 2008.



MILES, L. Are probiotics beneficial for health? **Journal compilation**, British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin, 32, 2-5, 2007.

MORAES F.P.; COLLA L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**. Vol 3 (2), 99-112, 2006.

OMGE, Organização Mundial de Gastroenterologia. **Guias práticas: Probióticos e Prebióticos**, maio de 2008.

OYETAYO, V. O.; OYETAYO, F. L. Potencial of probiotics as biotherapeutic agents targenting the innate system. **African Journal of biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 123-127, 2005.

PAGANO, M., GAUVREAU, K. **Princípios de bioestatística**. 2 ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learneing, 2004.

REIS, L. S. L. S. et al. Efficiency of Matricaria chamomilla CH12 and Lumber of doses of rabies vaccine on the humoral immune response in cattle. **Journal of Veterinary Science**, v. 9, n. 4, p. 433-435, 2008.

SHEFFER, K. C. et al. Vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n.3, p. 389-395, 2007.

SILVA, C. A. et al. Avaliação de probióticos (*Pedicoccus acidilactici* e *Bacillus subtilis*) após o desmame e efeitos no desempenho dos leitões. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 1, p. 133-140, 2006.

