

**DETERMINAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL APÓS  
SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICO EM BOVINOS NELORE**

**SANDRO EDUARDO ARENAS**

**DETERMINAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL APÓS  
SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICO EM BOVINOS NELORE**

**SANDRO EDUARDO ARENAS**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal - Área de Concentração: Fisiopatologia animal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Pardo

616.208 51    Arenas, Sandro Eduardo.  
A681e            Probiótico aumenta a resposta imune humoral  
em bovinos / Sandro Eduardo Arenas. –  
Presidente Prudente: [s.n.], 2008.  
37 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –  
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE:  
Presidente Prudente – SP, 2008.  
Bibliografia

1. Bovinos. 2. Probioticos. 3. Vacinas Anti-  
Rábicas . 4. Sistema imune. 5. Raiva. I. Título.

**SANDRO EDUARDO ARENAS**

**DETERMINAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL APÓS  
SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICO EM BOVINOS NELORE**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Presidente Prudente, 27 de Agosto 2008.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Paulo Eduardo Pardo  
Universidade do Oeste Paulista - Unoeste  
Presidente Prudente - SP

---

Prof. Dra. Renata Navarro Cassu  
Universidade do Oeste Paulista - Unoeste.  
Presidente Prudente - SP

---

Prof. Dr. Luiz Fernando Coelho da Cunha Filho  
Universidade Norte do Paraná – UNOPAR  
Londrina - PR

## DEDICATÓRIA

A Deus, por ter me dado forças nas horas em que precisei, e ter me feito lembrar de que nada na vida é alguma coisa sem sua presença.

A minha esposa Lucinéia por nunca ter me deixado desanimar diante das tormentas.

A meu filho Bernardo, que é minha esperança, meu amor, meu tudo.

A minha filha Maria Carolina que chegou pondo em minha vida, mais amor, esperança e mais tudo.

A meus pais, que pelo constante incentivo de nunca me deixar desanimar.

As minhas irmãs Eliane, Lilian e Karina, a meus cunhados Leandro e Marcelo e aos meus sobrinhos Beatriz, Leandro, Yuri e Gabriel por fazerem parte da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Prof. Dr. Paulo Eduardo Pardo

Pelo desafio que foi conduzir orientação em uma área que até o início deste projeto, era pouco conhecida por ele.

E me sinto honrado, que hoje os probióticos são parte de sua linha de pesquisa.

Pela seriedade pela qual sua conduta realizou orientações e aconselhamentos.

Aos que na época do experimento eram acadêmicos da UNOESTE e colaboraram de maneira direta com a pesquisa.

A Dra. Neuza Frazatti Galina e toda equipe do setor de raiva do BUTANTA, por terem acreditado em nosso projeto.

A Luiz Souza Lima de Souza Reis, por ter feito todo possível para que este trabalho fosse reconhecido.

## RESUMO

### **Determinação da resposta imune humoral após suplementação com Probiótico em bovinos nelore**

Foi avaliado o efeito do probiótico sobre a resposta imune de bovinos imunizados com uma dose de vacina anti-rábica. Utilizaram-se bovinos Nelore (N=75) divididos randomicamente em 5 grupos: quatro grupos foram suplementados com 2, 3, 4 e 8 g probiótico (Proenzime<sup>®</sup>)/bovino/dia, grupos G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub> e G<sub>8</sub>, respectivamente, por 60 dias. O 5º grupo foi controle. Todos os animais foram imunizados com uma dose de vacina anti-rábica no dia zero do experimento. Os títulos de anticorpos anti-rábicos foram mensurados nos dias 0, 30, 60 por meio do teste de RFFIT. Os resultados mostraram interação significativa entre concentração de probiótico e tempo de vacinação. Também teve aumento significativo nos títulos de anticorpos anti-rábicos nos grupos G<sub>c</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub> e G<sub>8</sub> nos dias 30 e 60. No grupo G<sub>4</sub> os títulos de anticorpos anti-rábicos reduziram significativamente no dia 60. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a frequência de animais imunizados entre os grupos controle e tratados nos dias 30 e 60. No dia 60, o grupo controle não diferiu do G<sub>2</sub>. Além disso, não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na frequência de animais nos dias 30 e 60, no grupo controle ou nos grupos tratados (G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub> e G<sub>8</sub>). Conclui-se que o probiótico (Proenzime<sup>®</sup>) aumentou a resposta imune humoral em bovinos imunizados com vacina anti-rábica.

Palavras-Chave: Bovino, Probiótico, Vacina anti-rábica, Resposta humoral

## ABSTRACT

### **Determination to the humoral immune response after supplementation with Probiotic in nelore bovine**

The effect of a probiotic on the immune response of cattle immunized with one dose of rabies vaccine was evaluated in this study. The Nelore bovines (N=75) were divided randomly into 5 groups: four groups fed with a diet supplemented with the 2, 3, 4 and 8 g the probiotic (Proenzime<sup>®</sup>)/bovine/day, groups G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub> and G<sub>8</sub>, respectively, for 60 days. The 5th group was used as control. All the animals were immunized with a single dose of rabies vaccine on the first day of the experiment (day 0). The antibody titers were measured on days 0, 30 and 60 by RFFIT test. The results show the significant interaction was found between the probiotic level and vaccination time. There was also a significant difference among rabies titers in groups G<sub>c</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub> and G<sub>8</sub> on both days 30 and 60. In group G<sub>4</sub>, titers of rabies antibody in cattle decreased significantly on day 60. A significant difference ( $p < 0.05$ ) between the frequency of immunized animals in the control group and the other treatments was found on both days 30 and 60. On day 60, the control group did not differ from G<sub>2</sub>. However, no significant difference ( $p < 0.05$ ) was found among the treatments which were supplemented with probiotic. In addition, no significant difference ( $p < 0.05$ ) between the frequency of immunized animals on days 30 and 60 was found in control (G<sub>c</sub>) or any other treatment (G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub> or G<sub>8</sub>). In conclusion, the probiotic (Proenzime<sup>®</sup>) increase the humoral immune response of bovine immunized with rabies vaccine.

Key-Words: Cattle, Probiotic, Rabies vaccine, Humoral response



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	09
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Raiva.....	11
2.2 Probiótico.....	13
2.2.1 Benefícios dos Probióticos na produção de animais.....	14
2.2.2 Cuidados na administração de Probióticos aos animais.....	15
2.2.3 Características dos microorganismos Probióticos.....	15
2.2.4 Fatores que afetam negativamente os resultados na utilização dos Probióticos.....	16
2.2.5 Efeitos dos Probióticos.....	16
2.2.5.1 Efeitos dos Probióticos no sistema imunológico.....	17
2.2.5.2 Efeitos dos Probióticos no sistema digestório.....	18
2.2.5.3 Controle da acidose ruminal.....	19
2.2.5.4 Conversão alimentar.....	20
2.2.5.5 Efeitos dos Probióticos no controle da diarreia.....	20
2.2.5.6 Efeitos dos Probióticos no sistema reprodutor.....	20
3 OBJETIVO.....	22
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
5 ARTIGO CIENTÍFICO.....	30

## 1 INTRODUÇÃO

O termo probiótico deriva do grego e significa “pró-vida”, sendo o antônimo de antibiótico, que significa “contra a vida”. Ao longo do tempo, esta denominação teve diferentes acepções. Lilly e Stillwel (1965) a usaram para denominar substâncias secretadas por um protozoário que estimularam o crescimento de outros, e Parker (1974), para denominar suplementos alimentares destinados a animais, incluindo microrganismos e substâncias que afetam o equilíbrio da microbiota intestinal.

Fuller (1989) considerou que os probióticos são suplementos alimentares que contêm bactérias vivas que produzem efeitos benéficos no hospedeiro, favorecendo o equilíbrio de sua microbiota intestinal, entanto Havenaar e Huis In't Veld (1992) consideraram que são culturas únicas ou mistas de microrganismos que, administrados a animais ou humanos, produzem efeitos benéficos no hospedeiro por incremento das propriedades da microbiota nativa. Esses autores restringiram o uso desse termo a produtos que contenham microrganismos viáveis que promovem a saúde de humanos ou animais, e que exercem seus efeitos no aparelho digestivo, no trato respiratório superior ou no trato urogenital (HAVENAAR et al., 1992).

Schrezenmeir e De Vrese (2001) propuseram que o termo probiótico deveria ser usado para designar preparações ou produtos que contêm microrganismos viáveis definidos e em quantidade adequada, que alteram a microbiota própria das mucosas por implantação ou colonização de um sistema do hospedeiro, e que produzem efeitos benéficos em sua saúde.

O termo prebiótico é utilizado, a diferença de probiótico, para designar ingredientes alimentares não digeríveis que beneficiam o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade de uma ou um número limitado de espécies bacterianas no cólon (GIBSON; ROBERFROID, 1995), e o termo simbiótico para designar produtos que contêm probióticos e prebióticos associados. Como a palavra sugere sinergismo, ela deveria ser restringida a produtos em que o componente prebiótico favoreça seletivamente o probiótico (SCHREZENMEIR; DE VRESE, 2001).

Vários microrganismos são usados como probióticos, entre eles bactérias ácido- lácticas, bactérias não ácido lácticas e leveduras. Além das propriedades mencionadas, os probióticos devem ser inócuos, manter-se viáveis por longo tempo durante a estocagem e transporte, tolerar o baixo pH do suco gástrico e resistir à ação da bile e das secreções pancreática e intestinal, não transportar genes transmissores de resistência a antibióticos e possuir propriedades anti-mutagênicas e anticarcinogênicas, assim como resistir a fagos e ao oxigênio Holzapfel e Schillinger, (2002).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Raiva

A raiva é uma enfermidade infecciosa viral do sistema nervoso central dos mamíferos causada por vírus neurotrópico, que possui RNA da família Rhabdoviridae, gênero Lyssavirus (HANKINS et al., 2004). Esse vírus provoca grave encefalite viral nos animais e no homem, não havendo tratamento (FAVI et al., 2004). É considerada uma das mais importantes zoonoses mundial por ser encefalite fatal, acomete todos os mamíferos e apresenta ampla distribuição geográfica (CARAMORI JUNIOR et al., 2003).

A raiva dos herbívoros causa prejuízos econômicos consideráveis em animais destinados à produção de leite, de carne e a reprodução.

Os países mais afetados são: África do Sul, Namíbia, Botswana, Zimbábue, México, Venezuela e Brasil (ASPDEN, 2001). No Brasil o número de casos de raiva animal permanece alto (ALMEIDA et al., 1997), os bovinos e os eqüinos são severamente afetados por essa doença (OLIVEIRA et al., 2000). Sendo que em bovinos, nos países Latino Americano tem sido maior a preocupação. Atualmente, ocupa a segunda posição em número de casos, sendo superada apenas pela raiva canina, especialmente nas regiões onde os morcegos hematófagos estão envolvidos como na Costa do Pacífico no Chile, Costa Atlântica no Uruguai e no Sudeste do Brasil (BRASS, 1994). Estima-se que na América Latina as perdas sejam da ordem de 30 milhões de dólares por ano, provocando a morte de 100 mil cabeças. No Brasil, estima-se que entre 30.000 a 40.000 bovinos sejam perdidos anualmente acometidos com raiva. Os prejuízos econômicos diretos são estimados em 15 milhões de dólares e os indiretos em 22,5 milhões de dólares (PIZA et al., 2002). As perdas reais dos animais mortos pela enfermidade são difíceis de quantificar, devido à baixa proporção de casos suspeitos levados ao diagnóstico laboratorial de cada surto.

As análises do vírus da raiva, isolados de animais e humanos, mostraram que há numerosas variantes genéticas associadas com diferentes reservatórios de animais nas diferentes regiões geográficas, (SERRA-COBO et al.,

2002) com 7 sorotipos, o Rabies vírus, Lagos bat virus, Mokola vírus, Duvenhage vírus, Australian bat vírus (ABL) e dois genotipo European bat vírus (EBL) tipo 1 (EBL1) e tipo 2 (EBL2) Hankins e Rosekrans (2004). Esses vírus são termolábeis e suscetíveis a degradação pela radiação ultravioleta, detergentes, enzimas proteolíticas, raios-X, ácidos fortes, álcalis desinfetantes, solventes lipídicos e aniônicos. São sensíveis aos ácidos com  $\text{pH} < 4$  e as bases com  $\text{pH} > 10$ . São inativados pelo calor, sobrevivem 35 segundos a  $60^{\circ}\text{C}$ , 4 horas a  $40^{\circ}\text{C}$  e vários dias a  $4^{\circ}\text{C}$  (INSTITUTO PASTEUR, 2002). Os mamíferos e os morcegos da América são infectados por um vírus rábico clássico (RABV) ou sorotipo 1 (ECHEVARRIA et al., 2001).

No Brasil os morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) participam da cadeia epidemiológica, transmitindo essa enfermidade aos herbívoros domésticos, sendo a principal fonte de infecção (PIZA et al., 2002) e o principal transmissor da raiva na América Latina (SATO et al., 2004). Ao se alimentarem de sangue, infectam os animais (WRIGHT et al., 2002).

Há cerca de 140 espécies de morcegos no Brasil, sendo que em 31 dessas espécies já foi isolado o vírus da raiva, incluindo morcegos hematófagos, insetívoros, frugívoros e onívoros. Todas as espécies de morcego podem transmitir a raiva, independente de seu hábito alimentar (FOOKS et al., 2003).

O método seletivo indireto controla a população de morcegos hematófagos sem agredir outras espécies, passa-se a pasta vampiricida ao redor da mordida, atingindo apenas os indivíduos indesejáveis a fim de provocar depleção dos fatores coagulantes do animal agressor (NOGUEIRA, 2003). As transmissões por aerossóis em cavernas habitadas por morcegos são possíveis fontes de infecção para outros mamíferos. Por essa razão, até o momento, a melhor proteção à população de bovinos exposta ao risco de contato com o vírus rábico é a vacinação (PIZA et al., 2002). Aguilar-Setién et al. (2002) relatam que a raiva silvestre é controlada por meio de vacina anti-rábica oral.

O objetivo da vacina é reduzir as perdas econômicas provocadas por enfermidades infecciosas e manutenção da integridade das funções do organismo indispensáveis a uma ótima produção de leite de carnes. A vacina continua a ser o método de controle mais efetivo, importante e de menor custo para reduzir as perdas econômicas causadas por doenças infecciosas (HANKINS; ROSEKRANS, 2004). Nos últimos anos, grande parte das investigações sobre o controle da raiva silvestre

tem sido concentrado no desenvolvimento de métodos para a vacinação oral dos vetores selvagens desta enfermidade (BROCHIER et al., 1996). Nos EUA os custos estimados com a detecção, prevenção e controle da raiva excedem 300 milhões de dólares por ano (CDC, 2000).

Os inúmeros tipos de vacinas disponíveis no mercado dificultam determinar um procedimento adequado para uma efetiva imunização dos animais (OLIVEIRA et al., 2000).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a avaliação da imunidade anti-rábica da titulação desses anticorpos e considera um título igual ou maior 0,5 UI/ml como reflexo de um estado imunitário suficiente para proteger indivíduos expostos ao risco da contaminação (ALMEIDA et al., 1997).

## **2.2 Probiótico**

O termo probiótico é de origem grega e significa “pró-vida” (COPPOLA; TURNES, 2004), também é conhecido como "Direct-Fed Microbial" (DFM). Estes compostos são preparações de cultura de microorganismos, extratos e enzimas. São classificados como substância livre de perigos (GRAS - Generally Regarding As Safe), segundo o Food Drugs Administration (FDA) of United States, não sendo tóxicos para os animais e nem deixam resíduos tóxicos na carcaça dos animais destinados ao consumo dos seres humanos (OYETAYO; OYETAYO, 2005).

Assim, os probióticos vêm substituindo outros promotores de crescimento, entre eles os antibióticos, cujo uso na produção animal é indesejável e sua utilização indiscriminada tem levado ao aparecimento de populações de bactérias resistentes aos antibióticos.

Os probióticos são suplementos alimentares que contém microorganismos vivos, cuja administração em quantidade adequada produz efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro (SILVA et al., 2006), que restringem-se à promoção da saúde e não a cura de doenças (SAAD, 2006).

## 2.2.1 Benefícios dos Probióticos na produção animal

- **Bovinos**

- Atuam como imunoestimulante, aumentando a resistência dos bovinos às doenças infecciosas (SAAD, 2006). Arenas et al. (2005) observaram aumento significativo nos títulos de anticorpos anti-rábico em bovinos primo vacinados contra a raiva, além disso, elevou para 100% a frequência de animais que apresentaram títulos de anti-corpos protetores contra o vírus rábico.
- Promotor de crescimento e ganho de peso. Alves et al. (2003) e Jorge et al. (2006) relatam que obtiveram aumento significativo de 22,0% e 25,6% respectivamente, no ganho de peso em bovinos confinados. Rasteiro et al. (2006) observaram aumento de 19,4% no ganho de peso dos bovinos em sistema de pastejo extensivo no período de seca, enquanto que Arenas et al. (2007) observaram elevação de 33,3% no ganho de peso dos bovinos.
- Eleva a produção de leite (OEZTUERK et al., 2005) e porcentagem de proteína (NOCEK et al., 2003).
- Melhora a conversão e a eficiência alimentar (NICODEMO, 2001). Aumenta a ingestão de matéria seca no início e durante a lactação, (NOCEK et al., 2003) nos períodos pré e pós-parto dos bovinos.
- Previne a acidose ruminal (OWENS *et al.*, 1998).
- Aumenta e mantém o equilíbrio da microbiota ruminal e intestinal benéfica ao organismo (LEEDLE, 2000).
- Como redutor do pH intraluminal do trato digestório (AGOSTONI *et al.*, 2004).
- Controla a incidência (TIMMERMAN *et al.*, 2005) e reduz a duração de diarreias.
- Minimiza o estresse (KABIR *et al.*, 2004).
- Recompõe e estabiliza a flora intestinal após a antibioticoterapia (SAAD, 2006).

- Prevenção de infecções do trato reprodutivo de bovinos (OTERO et al., 2006).
- Pode ser utilizado como substituto dos ionóforos e antibióticos (COPPOLA e TURNES, 2004).

### **2.2.2 Cuidados na administração dos Probióticos aos animais**

Garantir a ingestão diária e contínua do probiótico pelos animais (SAAD, 2006).

Nos bovinos corrigir a exigência de proteína degradável no rúmen (PDR) e o balanço protéico-energético (JORGE et al., 2006).

### **2.2.3 Características dos microorganismos Probióticos**

Os microorganismos probióticos devem ser capazes de compensar ou reforçar a atividade da microbiota intestinal para exercer efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (BARBOSA et al., 2006). Assim, estes microorganismos devem possuir algumas propriedades, entre elas: ser inócuos, resistir à ação da bile, do suco gastrointestinal, sobreviver ao pH ácido, ter a capacidade de aderir à mucosa intestinal, colonizar o trato gastrointestinal, produzir compostos anti-microbianos, ter capacidade antagonista aos patógenos entéricos, possuir propriedades imunoestimulante modulam a atividade metabólica, inativar substâncias pró-carcinogênicas, além de não transmitir fatores de resistência à antibióticos para as bactérias patogênicas, manterem-se viáveis, estáveis durante a estocagem e transporte (SAAD, 2006).



#### **2.2.4 Fatores que afetam negativamente os resultados da utilização dos Probióticos**

Os fatores que podem influenciar negativamente no resultado da utilização do probiótico são: utilização de microrganismos que não atendem aos requisitos para atuar como probiótico (TOURNUT, 1998), idade, raça do animal, tipo de exploração, sistema de manejo adotado, alimentação fornecida aos animais (SAAD, 2006), métodos de produção, administração e viabilidade do produto (probiótico), condição do hospedeiro, condição da microbiota intestinal (BARBOSA et al., 2006) e dose utilizada (o número dos microrganismos para formação de uma colônia e o estabelecimento de uma relação simbiótica com o animal hospedeiro). Além disso, uma determinada cepa de microrganismo probiótico não será eficiente para todas as espécies de animais ou para um mesmo animal nas diferentes fases da vida ou de uma doença (SAAD, 2006).

Muitos produtos são atualmente comercializados no mercado sem que tenham sido provadas as características do microrganismo de colonizar o trato intestinal, fixar-se, reproduzir-se e eliminar bactérias maléficas, conforme o preconizado pelos fabricantes (PEDROSO, 2003).

#### **2.2.5 Efeito dos Probióticos**

Os probióticos modulam várias funções fisiológicas no organismo dos animais, no entanto, ainda não estão totalmente esclarecidas (COPPOLA; TURNÊS, 2004) e para o entendimento do efeito do probiótico é necessário o conhecimento específico de cada microrganismo utilizado na composição do produto (LEEDLE, 2000). No entanto, sabe-se que estes atuam no sistema imunológico, digestório e urinário.

### 2.2.5.1 Efeitos dos Probióticos no sistema imunológico

Os probióticos atuam estimulando o sistema imunológico, ou seja, são imunostimulantes. No entanto, esta ação imunostimulante promovida pelos probióticos ainda não está totalmente elucidada (SILVA et al., 2006).

A ação imunostimulante dos probióticos é atribuída às bactérias ácido-lácticas (CROSS, 2002), entre elas: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium longum* (KOENEN et al., 2004).

Várias pesquisas têm demonstrado que estes microrganismos estimulam a atividade fagocítica dos leucócitos (OYETAYO; OYETAYO, 2005), aumentam a proliferação de linfócitos T, a atividade dos macrófagos e elevam a atividade das células Natural Killer (NK). Ativam as células T Helper CD4+ subpopulação Th1 (OUWEHAND et al., 1999), aumentam a produção de anticorpos e a secreção de mediadores químicos que estimulam o sistema imune (CROSS, 2002). Entre elas estão a produção de citocinas (AMORES et al., 2004), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), TNF, interleucina (IL) 1, IL-2 (OUWEHAND et al., 1999), IL-10 e a IL-12.

A IL-12 ativa as células Th1, induzindo a secreção de IL-2 e IFN- $\gamma$ . Aumenta a proliferação de células T natural killer (NK) e a citotoxicidade. Ainda potencializa a secreção de imunoglobulinas pelas células B. O IFN- $\gamma$  atua nas células B, células T e NK como também nos macrófagos. Este também estimula a produção de IgG2a pelas células B, eleva a expressão de moléculas de MHC da classe I de células T e potencializa as atividades das células NK. Nos macrófagos o IFN- $\gamma$  aumenta a capacidade de destruir os microrganismos ingeridos e nas células infectadas com vírus aumenta a expressão das moléculas da MHC classe I e II, eleva a produção de IL-2. Esta interleucina ativa as células B, T auxiliares, citotóxicas e as células NK (TIZARD, 2002).

Madara (1997) relata que os probióticos também ativam as células linfóides do sistema imunológico do tecido intestinal, ativam também Placas de Peyer's que estão distribuídas ao longo das células epiteliais, lâmina própria e submucosa.

Os microrganismos probióticos ativam as células linfóides do sistema imunológico do tecido intestinal por meio da interação entre o tecido linfóide e os produtos metabólicos ou fragmentos de peptídeoglicano dos microrganismos

probióticos. Produzidos “in situ” que estimulam e modulam a resposta imune na superfície da mucosa intestinal contra os antígenos dos microorganismos patogênicos. Além disso, os probióticos modulam a microflora e a permeabilidade do epitélio intestinal para os antígenos bacterianos (os peptídeos) (OUWEHAND et al., 1999).

### 2.2.5.2 Efeitos dos Probióticos no sistema digestório

No sistema digestivo os probióticos participam ou facilitam a função fisiológica do trato digestivo, especificamente, no fluxo de substrato ou no produto final do trato gastrointestinal (LEEDLE, 2000). Assim eles aumentam a digestibilidade da fibra dos alimentos (NEWBOLD et al., 1996), o consumo de matéria seca (NICODEMO, 2001), a eficiência alimentar (OEZTUERK et al., 2005), a conversão alimentar nos bovinos (MEYER *et al.*, 2001) e nos suínos (SILVA et al., 2006).

A *Saccharomyces cerevisiae* associado à *Enterococcus faecium* reduziu a mobilização de ácidos graxos, por oxidação e aumentou a energia proveniente dos carboidratos alimentares, devido ao aumento na ingestão de matéria seca pelos bovinos. Este aumento de ingestão de matéria seca pelos bovinos ocorreu devido à elevação da digestibilidade da fibra das forragens (NOCEK et al., 2003).

O *Aspergillus orizae* fornece enzimas (polissacaridases endógenas) que atuam no rúmen, facilitando a aderência de bactérias celulíticas à fibra, além das vitaminas (biotina, ácido pantatênico, hidrocloreto de piridoxina e vitamina B<sub>12</sub>), aminoácidos e ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada. O acréscimo destes nutrientes, estimula o crescimento de microorganismos, entre eles, o *Ruminococcus albus* e *Fibrobacter succinogenes* que são bactérias da flora ruminal que digerem a fibra dos alimentos. Além disso, produzem mais enzimas, expandindo o contato dos fungos ruminais com as plantas ingeridas pelos animais, resultando em maior infiltração de rizóides dos fungos, possibilitando a invasão das bactérias ruminais nas camadas das fibras mais internas dos alimentos. Conseqüentemente, eleva a taxa de degradação da fibra dos alimentos (NICODEMO, 2001). A suplementação

com *Aspergillus orizae* promoveu o crescimento do fungo *Neocallimastix frontalis* EB188 presente na flora ruminal, favorecendo a secreção de celulase em 41% e a de protease em 38% (CHANG et al., 1999).

Os *Lactobacillus* produzem amilase (NICODEMO, 2001), protease e lipase que favorecem a digestão de amido, de proteínas e de lipídeos dos alimentos, respectivamente os ácidos produzidos por este microrganismo, reduzem o pH intestinal proporcionando maior absorção de ácidos graxos de cadeia curta (MENTEN, 2001).

### **2.2.5.3 Controle da acidose ruminal**

A ingestão de dietas ricas em grãos pelos bovinos, resulta na acidificação no rúmen provocada pela excessiva produção de ácido láctico. Este aumento na concentração de ácido láctico diminui o pH, resultando em acidose ruminal que altera o metabolismo (MIRANDA-NETO et al., 2005) causando redução na ingestão de alimento, laminite (LEEDLE, 2000), ruminite, abscessos hepáticos e grandes perdas econômicas na exploração pecuária de corte e leite.

A adição de probiótico na ração concentrada dos bovinos, contendo *Aspergillus orizae*, *Saccharomyces cerevisiae* (HIGGINBOTHAM et al., 1994), *Lactobacillus*, *Enterococcus faecium* (NOCEK et al., 2003) controlam o pH ruminal, reduzem a produção e aumentam o consumo de ácido láctico pelos microorganismos presentes no rúmen (LYNCH; MARTIN, 2002).

Estes microorganismos probióticos fornecem fatores de crescimento para os microrganismos ruminais, entre eles o malato, que favorece a taxa de crescimento das bactérias que utilizam lactato (KUNG et al., 1997), entre elas, as *Selenomonas lactilytica*, *Selenomonas ruminatium* (SULLIVAN; MARTIN, 1999) e *Megasphaera elsdenii* (NOCEK et al., 2003). Estas bactérias do rúmen são capazes de consumir o ácido láctico ou seja, elimina o lactato presente no rumem, transformando em acetato e propionato. Assim os probióticos controlam a acidose ruminal nos bovinos, favorecendo o restabelecimento e as funções fisiológicas da microbiota normal do rúmen .

#### **2.2.5.4 Conversão alimentar**

O incremento na conversão alimentar promovido pelos probióticos pode ser explicado devido ao aumento na digestibilidade dos alimentos pelo estabelecimento da competição entre os microrganismos indesejáveis e os que são benéficos para o organismo do animal (SILVA et al., 2006).

#### **2.2.5.5 Efeitos dos Probióticos no controle da diarreia**

As bactérias produtoras de ácido láctico reduzem a incidência de diarreia, competem pelos nutrientes e o local de adesão no epitélio intestinal dos hospedeiros (AGOSTONI et al., 2004), evitando assim, a colonização da mucosa intestinal por microrganismos patogênicos.

Os probióticos inibem o crescimento dos microrganismos patogênicos, por meio da síntese de bacteriocinas (COPPOLA; TURNES, 2004), produção de ácido láctico, acético (KELLEHER et al., 2002) e peróxidos de hidrogênio (LOZADA, 2001), também atuando no metabolismo celular diminuindo a concentração de amônia no organismo (CROSS, 2002) e inibindo as ações das enterotoxinas. Assim produzem um ambiente desfavorável ao *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp* e *Escherichia coli* enteropatogênica.

#### **2.2.5.6 Efeitos dos Probióticos no sistema reprodutor**

As patologias uterinas que ocorrem durante o período puerperal, reduzem a eficiência reprodutiva das vacas, elevam o custo de produção, reduzem o consumo de alimentos, reduzem a produção de leite e de carne. No entanto, os microrganismos probióticos, entre eles, o *Lactobacillus*, podem prevenir a metrite em vacas no pós-parto (OTERO et al., 2006), vaginites causadas por bactéria e leveduras (ZÁRATE; NADER-MACIAS, 2006).

A colonização por *Lactobacillus* é considerado a primeira barreira microbiológica da infecção por patógeno do trato genital (OCAÑA et al., 1999b). O ponto chave para os microorganismos probióticos inibirem o crescimento de vários patógenos causadores de infecção dos órgãos do aparelho genital são: competição pelos receptores de adesão nas células do epitélio vaginal (OSSET et al., 2001), aderência à superfície do epitélio vaginal, que é essencial para a (ZÁRATE; NADER-MACIAS, 2006) colonização dos tecidos dos órgãos do trato genital (OTERO et al., 2006).

Ainda, competem pelos nutrientes (OSSET et al., 2001), produzem peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (LEPARGNEUR e ROUSSEAU, 2002) e substância antimicrobiana: ácido láctico (JUÁREZ-TOMÁS et al., 2006),  $H_2O_2$  (OCAÑA et al., 1999a) e bacteriocina (OSSET et al., 2001).

O ácido láctico produzido pelos *Lactobacillus* a partir dos carboidratos mantém o pH vaginal ácido (JUÁREZ-TOMÁS et al., 2006) e a bacteriocina atua de forma indesejável no crescimento das colônias dos microorganismos patogênicos (LEPARGNEUR; ROUSSEAU, 2002). Além disso, os *Lactobacillus* aumentam a influência dos hormônios, em especial dos estrógenos.

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) representa um mecanismo de defesa antimicrobiano não específico que favorece os constituintes da flora vaginal normal (LEPARGNEUR; ROUSSEAU, 2002), por dois mecanismos distintos: um bacteriostático e o outro bactericida (OCAÑA et al., 1999) quando a concentração de  $H_2O_2$  atinge 0,6 e 1,0 mmol L<sup>-1</sup>, respectivamente (HAINES; HAMON, 1973). A  $H_2O_2$  é convertida em composto citotóxico e peroxidase no fluido vaginal (LARSEN, 1993). Estes compostos provocam a morte celular ao atuarem sobre o ácido nucléico, proteínas e outras biomoléculas dos microorganismos patogênicos.

Quando os *Lactobacillus acidophilus* colonizam o trato genital, inibem o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* (OCAÑA et al., 1999b) e *Cândida albicans* (BORIS et al., 1998) (OSSET et al., 2001) relatam que o *Lactobacillus crispatus* e *Lactobacillus jensenii* inibiram a aderência da *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* no trato genital de vacas.

*Lactobacillus acidophilus* CRL 1259 e *Lactobacillus paracasei* CRL 1289 inibiram a aderência de *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus*, enquanto que o *Lactobacillus salvaricus* CRL 1328 inibiu a adesão somente do *Staphylococcus aureus* (ZÁRATE; NADER-MACIAS, 2006).

### **3 OBJETIVO**

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influencia desta formulação probiótica sobre a resposta imune humoral em bovinos primo-vacinados contra Raiva, devido a dificuldade de manejo e alta casuistica desta enfermidade em bovinos.

O manejo correto de vacinação Anti-Rábica para animais primo-vacinados inclui um reforço vacinal após trinta (30) dias da primeira dose.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTONI, C. et al. Probiotic bacteria in dietetic products for infants: a commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 38, p. 365-374, 2004.

AGUILAR-SETIÉN, A. et al. Vaccination of vampire bats using recombinant vaccinia-rabies vírus. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 38, n. 3, p. 539-544, 2002.

ALMEIDA, M. F., et al. Resposta imune humoral de cães à vacina inativada de cérebro de camundongos lactentes utilizada nas campanhas anti-rábicas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 5, out.1997.

AMORES, R. et al. Prebióticos. **Rev. Esp. Quimioterap.**, v. 17, n. 2, p. 131-139, 2004.

ARENAS, S. E.; REIS, L. S. L. S.; FAZATTI-GALLINA, N. M. et al. Probiotic increases the humoral immune response in bovines immunized with the rabies vaccine. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON RABIES IN THE AMERICAS, 16., 2005. Ottawa,. **Anais...** 2005, p. 99.

\_\_\_\_\_. efeito do probiotico proenzime<sup>®</sup> no ganho de peso em bovinos. **Arch Zootec.**, v. 56, n. , p. , 2007.

ASPDEN, K. Caprirab: a novel dual vaccine developed for use against rabies na lumpy skin disease in the developing world. **Africa's First On-Line Science Magazine**, Janice Linsron, nov. 2001. Disponível em: <<http://www.sciencein africa.co.za/2001/nov.caprirab.htm>>. Acesso em: 10 maio 2003.

BARBOSA, F. H. F. et al. Efeito antagonista de um *Peptostreptococcus* sp. da microbiota fecal humana frente a *Clostridium difficile* – a avaliação “in vitro”, “ex-vivo” e “in vivo” em camundongos gnotoxênicos. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2006.

BORIS, S. et al. Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with pathogens. **Infect. Immun.**, v. 6, p. 1985-1989, 1998.



BRASS, D. A. **Rabies in bats: natural history and public health implications.** Ridgefield - Connecticut: C.T. Livia Press, 1994. 335 p.

BROCHIER, B., et al. Utilización sobre el terreno de una vacuna con virus recombinante de la vaccinia para el control de la rabia silvestre en Europa y America del Norte. **Revue Scientifique et Technique / Office International des Épizooties**, v. 15, n. 3, p. 947-970, abr. 1996.

CARAMORI JUNIOR, J. G. et al. Inquérito epidemiológico sobre características da população canina e felina de um bairro próximo à zona rural em Cuiabá-MT, visando o controle da raiva animal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, 2003.

CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC) 2000. Rabies preventions Unite States, sep. 2000. Disponível em: <<http://www.Avma.org/Pubchlh/rabprev.asp>>. Acesso em 11 mar. 2003.

CHANG, J. S.; HARPER, E. M.; CALZAR, R. E. Fermentation extract effects on the morphology and metabolism of the rumen fungus *Neocallimastix frontalis* EB 188. **J Appl Microbiol.**, v. 86, n. 3, p. 389-98, 1999.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 20007-303, 2004.

CROSS, M. L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 34, n. 4, p. 245-253, 2002.

ECHEVARRIA, J. E., et al. Screening of active lyssavirus infection in wild bat populations by viral RNA detection on oropharyngeal swabs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3678-3683, oct. 2001.

FAVI, C. M. et al. Evaluación de la capacidad inmunogénica de la vacuna antirrábica tipo Fuenzilada-Palacios (CRL) y de la vacuna antirrábica de cultivo celular (Verorab®) en personas con tratamiento preexposición. **Revista Médica de Chile**, v. 132, p. 41-46, 2004.

FOOKS, A. R., et al. Review article - European bat lyssaviruses: an emerging zoonosis. **Epidemiology and Infection**, v. 131, p. 1029-1039, 2003.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition, Bethesda**, v. 125, n. 6, p. 1401–1412, 1995.

HAINES, W. C.; HAMON, G. L. Effect of selected lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin. **Appl. Microbiol.**, v. 25, p. 36-441, 1973.

HANKINS, D. G.; ROSEKRANS, J. A. Overview, prevention and treatment of rabies. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 79, n. 5, p. 671-676, 2004.

HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, M. J. H. **Probiotics**: a general view. In: WOOD, B.J.B. Lactic acid bacteria in health and disease 1. Amsterdam: Elsevier Applied Science, 1992. p. 151-170.

HIGGINBOTHAM, G. E. et al. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* extract on milk yield in a commercial dairy herd. **J. Dairy Sci.**, v. 77, p. 343-348, 1994.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. **Food Research International**, Amsterdam, v. 35, n. 2-3, p. 109-116, 2002.

INSTITUTO PASTEUR DE SÃO PAULO. A raiva, 2002. Disponível em: <[http://www.pastuer.saude.sp.gov.br/informações\\_05.htm](http://www.pastuer.saude.sp.gov.br/informações_05.htm)>. Acesso em 01 jul. 2003.

\_\_\_\_\_. Controle da raiva dos herbívoros. Desenvolvido pelo Instituto Pasteur de São Paulo, 2000. Disponível em: <[http://www.pasteur.saúde.sp.gov.br/informações/manuais/manual\\_1/manual\\_01.htm](http://www.pasteur.saúde.sp.gov.br/informações/manuais/manual_1/manual_01.htm)>. Acesso em: 17 jan. 2003.

JORGE, C. F. J. F. et al. Efeito de um aditivo alimentar contendo probiótico e enzimas digestivas no ganho de peso de bovinos nelore em regime de pasto. In: ENCONTRO DE PESQUISA E INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO ESTADO E DA REGIÃO DO PANTANAL, 4., 2006. **Anais...** Porto Mortinho – MS: UNIDERP, 2006, p. 69-79.

JUÁREZ-TOMÁS, M. C. et al. Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. **J. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 1117-1124, 2006.

KABIR, S. M. L. et al. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. **Int. J. Poultry Sci.**, v. 3, n. 5, p. 361-364, 2004.

KELLEHER, L. S. et al. Supplementation of infant formula with the probiotic *Lactobacillus reuteri* and zinc: impact on enteric infection and nutrition in infant rhesus monkeys. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 35, p. 162-68, 2002.

KOENEN, M. E. et al. Immunomodulation by probiotic lactobacilli in layer- and meat-type chickens. **Br. Poult. Sci.**, v. 45, p. 355-366, 2004.

KUNG Jr, L. et al. Effects of a live yeast culture and enzymes on in vitro ruminal fermentation and milk production of dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 80, p. 2045-2051, 1997.

LARSEN, B. Vaginal flora in health and disease. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 36, p. 107-121, 1993.

LEEDLE, J. Probiotics and DFMs – Mode of action in the gastrointestinal tract. In: SÍMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL, 2000. **Anais...** Campinas: CLANA, 2000, p. 24-37.

LEPARGNEUR, J.; ROUSSEAU. Role protector de la flore de Doderlein. **J. Ginecol. Obstet. Reprod.**, v. 31, p. 485-494, 2002.

LILLY, D. M.; STILLWEL, R. H. Probiotics. Growth promoting factors produced by micro-organisms. **Science**, Washington, v. 147, n. 3659, p. 747-748, 1965.

LOZADA, A. E. El potencial de la manipulación de la flora intestinal por medios dietéticos sobre la salud humana. **Enferm. Infec. Microbiol.**, v. 21, n. 3, p. 106-114, 2001.

LYNCH, H. A.; MARTIN, S. A. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. **J. Dairy Sci.**, v. 85, p. 2603-2608, 2002.

MADARA, J. L. The chamelecon within: improving antigen delivery. **Science.**, v. 277, p. 910-911, 1997.

MENTEM, J. F. M. Aditivos alternativos na nutrição de aves: probióticos e prebióticos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001. Piracicaba -SP. **Anais ...**, Piracicaba - SP: SBZ, 2001, p.141-157.

MEYER, P. M. et al. Adição de probiótico ao leite integral ou sucedâneo e desempenho de bezerros da raça holandesa. **Sci. Agric.**, v. 58, n. 2, p. 215-221, 2001.

MIRANDA-NETO, E. G. et al. Estudo clínico e características do suco ruminal de caprinos com acidose láctica induzida experimentalmente. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 25, n. 2, p. 73-78, 2005.

NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; McINTOSH, F. M. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. **Br. J. Nutr.**, v. 76, p. 249-261, 1996.

NICODEMO, M. L. F. **Uso de aditivos na dieta de bovinos de corte**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 54 p. (Documentos, 106).

NOCEK, J. E. et al. Ruminal supplementation of direct-fed microbiols on diurnal pH variation and in situ digestion in dairy cattle. **J. Dairy Sci.**, v. 85, p. 2000-433, 2002.

\_\_\_\_\_. Direct-fed microbial supplementation on the performance of dairy cattle during the transition period. **J. Dairy Sci.**, v. 86, p. 331-335, 2003.

NOGUEIRA, V. **Programa Estadual de controle da raiva dos herbívoros**. São Paulo: Instituto Pasteur, 2003. (Manual)

OCAÑA, V. S.; PESCE de RUIZ HOLGADO, A. A.; NADER-MACIAS, M. E. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by a vaginal *Lactobacillus salvaricus* strain. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, n. 12, p. 5631-5635, 1999.

\_\_\_\_\_. Selection of Vaginal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generation *Lactobacillus* species for probiotic use. **Curr. Microbiol.**, v.38, p.279-284, 1999.

OEZTUERK, H.. et al. Influence of living and autoclaved yeast of *Saccharomyces boulardii* on in vitro ruminal microbial metabolism. **J. Dairy Sci.**, v. 88, p. 2894-2600, 2005.

OLIVEIRA, A. N. et al. Immune response in cattle vaccinated against rabies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 1, p. 83-88, jan/feb. 2000.

OSSET, J. et al. Assesment of the capacity of *Lactobacillus* to inibit the growth of uropathogens and block their adhsion to vaginal epithelial cells. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 485-491, 2001.

OTERO, M. C.; NADER-MACÍAS, M. E. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 96, p. 35-46, 2006.

OTERO, M. C.; MORELLI, L.; NADER-MACIAS, M. E. Probiotic propeties of vaginal lactic acid bacteria to prevent metritis in cattle. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 43, p. 91-97, 2006.

OYETAYO, V. O.; OYETAYO, F. L. Potencial of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 4, n. 2, p. 123-127, 2005.

OWENS, F. N. et al. Acidosis in cattle a review. **J. Anim. Sci.**, v. 76, p. 275-286, 1998.

OUWEHAND, A. C. et al. Probiotics: mechanisms and established effects. **Int. Dairy J.**, v. 9, p. 43-52, 1999.

PARKER, R. B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Animal Nutrition Health**, n. 29, p. 4-8, 1974.

PEDROSO, A. A. **Estrutura da comunidade de Bactéria do trato intestinal de frangos suplementados com promotores de crescimento**. Piracicaba, 2003, 103 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

PIZA, A. T. et al. Effect of the contents and form of rabies glycoprotein of hte potency of rabies vaccination in cattle. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 2, p. 265-268, mar. 2002.

RASTEIRO, V. S. et al. Adição de probiótico na mistura mineral eleva o ganho de peso de bovinos no período da seca. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. 43., 2006. **Anais...** João Pessoa, 2006, p. 1-3.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SATO et al. Genetic and phylogenetic analysis of glycoprotein of rabies virus isolated from several species in Brazil. **The Journal of Veterinary Medical Science**. V. 66, n. 7, p. 747-753, 2004.

SERRA-COBO, J., et al. European bat Lyssavirus infection in Spanish bat populations. **Emerging Infections Diseases**, v. 8, n. 4, april. 2002.

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.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, n. 2, p. 361S-364S, 2001.

SULLIVAN, H. M.; MARTIN, S. A. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. **J. Dairy Sci.**, v. 82, p. 2011-2016, 1999.

TIMMERMAN, H. M. et al. Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. **J. Dairy Sci.**, v. 88, p. 2154-2165, 2005.

TORNUT, J. R. Probiotics. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2006. Botucatu. **Anais...** Botucatu: ASBZ, 1998. p. 179-199.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**. 6.ed. São Paulo: Roca, 2002. Cap. 4: Imunidade inata: macrófagos, p. 33-38

WRIGHT, A., et al. Molecular characterization of rabies virus isolates from Trinidad. **Veterinary Microbiology**, v. 87, p. 95-102, 2002.

ZÁRATE, G.; NADER-MACIAS, M. E. Influence of probiotic vaginal lactobacilli on *in vitro* adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. **Appl. Bicrobiol.**, v. 43, p.174-180, 2006.

### 3 ARTIGO CIENTÍFICO

## PROBIOTIC INCREASE THE ANTIRABIES HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN BOVINE

### PROBIÓTICO AUMENTA A RESPOSTA IMMUNE HUMORAL ANTI-RÁBICA EM BOVINOS

S.E. Arenas<sup>1</sup>, L.S.L.S. Reis<sup>1\*</sup>, N.M. Frazatti-Gallina<sup>2</sup>, S.H. Fujimura<sup>2</sup>, H. Bremer-Neto<sup>3</sup>, P.E. Pardo<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MSc. Student in Animal Sciences, Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Laboratory of Rabies, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>3</sup> Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brazil.

\*Author for correspondence: Rodovia Raposo Tavares, Km 572, Bairro Limoeiro, CEP 19067-175, Presidente Prudente, SP, Brazil. E-mail: centraldepesquisaepublicacoes@yahoo.com.br

#### ADDITIONAL KEY WORDS

cattle, probiotic, rabies vaccine, humoral response

#### SUMMARY

The effect of a probiotic on the immune response of cattle immunized with one dose of rabies vaccine was evaluated in this study. The Nelore bovines (N=75) were divided randomly into 5 groups: supplemented with the 0, 2, 3, 4 and 8 g the probiotic (Proenzime<sup>®</sup>)/bovine/day, groups G<sub>0</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub> and G<sub>8</sub>, respectively, for 60 days. All the animals were immunized with a single dose of rabies vaccine on the first day of the experiment (day 0). The obtained results showed that there was significant increase (p<0.05) in the titers of antirabies antibodies and frequency of animals immunized in the groups G<sub>4</sub> and G<sub>8</sub> on 30 and 60. In conclusion, the probiotic (Proenzime<sup>®</sup>) increase the humoral immune response of bovine immunized with rabies vaccine.

#### PALAVRAS CHAVE ADICIONAL

bovino, probiótico, vacina anti-rábica, resposta humoral

## RESUMO

Foi avaliado o efeito do probiótico sobre a resposta imune de bovinos imunizados com uma dose de vacina anti-rábica. Utilizou-se bovinos Nelore (N=75) divididos randomicamente em 5 grupos: suplementados com 0, 2, 3, 4 e 8 g probiótico (Proenzime<sup>®</sup>)/bovino/dia, grupos G<sub>c</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub> e G<sub>8</sub>, respectivamente, por 60 dias. Todos os animais foram imunizados com uma dose de vacina anti-rábica no dia zero do experimento. Os resultados obtidos mostraram que houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos títulos de anticorpos anti-rábicos e na frequência de animais imunizados nos grupos G<sub>4</sub> e G<sub>8</sub> no dia 30 e 60. Conclui-se que o probiótico (Proenzime<sup>®</sup>) aumentou a resposta imune humoral em bovinos imunizados com vacina anti-rábica.

## INTRODUCTION

Rabies is an infection caused by a virus of the genus *Lyssavirus*, order Rhabdoviridae. It's a major animal disease in the world because causes fatal encephalitis in mammals, including humans, has wide geographical distribution and constitutes a serious health problem (Consales *et al.*, 2006). The vaccination is the half most effective and economical of the disease (Oliveira *et al.*, 2000).

The use of probiotics is a strategy to increase the immunological response of animals vaccinated or infected by virus or bacteria (Hamilton-Miller, 2004). Havernar and Huis In't Veld defined probiotics in 1992 by as viable microorganisms, including lactic bacteria and yeast, as lyophilized cells or fermented products that have beneficial effects on host health after being ingested. These substances are used as growth promoters (Arenas *et al.*, 2007).

In this present study was evaluated the effect of different concentrations of probiotic added to the mineral diet, in the immunological response of bovine immunized with rabies vaccine.

## MATERIALS AND METHODS

Nelore cattle (*Bos taurus indicus*) with 18 months old, from a farm in Presidente Bernardes, SP, Brazil were utilized in this study. These animals were divided randomly into 5 groups (N=15), animals from the control group (G<sub>c</sub>) fed pasture and received mineral salt (Premix R<sup>®</sup>) *ad libitum* and the other groups were fed in a similar system, but each one received 2, 3, 4 or 8 g probiotic (Proenzime<sup>®</sup>) added to each 70g of mineral salt, groups G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub> and G<sub>8</sub>, respectively. This probiotic/salt ratio was chosen because in observations taken for 20 days before the experiments the daily average salt intake was estimated at 70g per bovine. All the animals were immunized with 1 dose of rabies vaccine on the first day of the experiment (day 0).

The probiotic (Proenzime<sup>®</sup>) is produced by EMBRAUPEC, Paranavaí, PR, Brazil. It is composed of amylase, cellulase, protease, lipase, pectinase, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Bifidobacterium longum* and zinc.

A commercial rabies vaccine with antigenic values satisfactory contains a suspension of fixed rabies PV (Pasteur Virus) obtained in BHK-21 cells, inactivated by beta-propiolactone, adsorbed in aluminum hydroxide and preserved with thimerosal at 1:10,000.

For blood sampling on days 0, 30 and 60. Blood (10 mL) was collected from the jugular vein in vacuum tubes with no anticoagulant. After the blood samples were clotted and centrifuged 2500 rpm, 10 min, serum samples were stored at -20 °C for further determination of rabies-neutralizing antibodies in BHK-21 cells.



The neutralizing antibodies were determined by serum neutralization in BHK-21 clone 13 cells. This test is based on the Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) (Smith *et al.*, 1996) and the Fluorescent Inhibition Microtest (FIMT RFFIT) (Zanlan *et al.*, 1979).

Data were compared by Repeated Measures Analysis of Variance; further multiple comparisons were carried out by LSD test. In all the analyses, outliers were excluded. To compare the frequency of animals immunized against rabies among the experimental groups as a function of observation day, the Goodman test was used. In all the analyses, probability of error was set at 5% (Zar, 1999).

## RESULTS AND DISCUSSION

The World Health Organization (WHO) recommends rabies-neutralizing antibody titers of at least 0.50 UI/mL for effective prevention in humans against rabies virus contamination. Some studies argue that this neutralizing antibody titer is the minimal level required to protect cattle (Albas *et al.*, 2005).

On day 0, the results from titration of rabies neutralizing antibodies sampled from the serum of cattle under the different experimental treatments were not reactive, indicating that none of the animals had either prior contact with the rabies virus or vaccination against rabies. Thus, the variations found among rabies antibody titers were induced by rabies vaccination as well as by the probiotic treatment.

Significant interaction was found between the probiotic level and vaccination time ( $F_{(4,63)} = 2.58$ ;  $p = 0.046$ ). After rabies vaccination, all the cattle had rabies-antibody titers, irrespective of whether or not they had received probiotic added to the mineral mixture. However, animals from groups G<sub>4</sub> and G<sub>8</sub> had a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the production of rabies antibodies 30 and 60 days after vaccination (**Figure 1**) and as did the frequency of immunized animals (antibody titers  $\geq 0.50$  UI/mL) (**Figure 2**) on both observation days. In this way, these supplementations caused a persistent immunostimulant effect. But their action mechanism is not completely known (Silva *et al.*, 2006). These results agree with previous studies in swine (Ávila *et al.*, 1998) and poultry (Kabir *et al.*, 2004) which indicate that the immune response is improved when probiotic administration is associated with vaccination.

In group G<sub>3</sub>, there was a significant increase ( $p < 0.05$ ) in rabies antibody titers on day 30, but on day 60 the titers decreased significantly (**Figure 1**). Thus, the immunostimulant action caused was not persistent.

In group G<sub>2</sub>, there was not a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the titers of rabies antibodies (**Figure 1**). Moreover, in this group, the frequency of immunized animals decreased significantly ( $p < 0.05$ ) 60 days after vaccination, similarly to group G<sub>c</sub> (**Figure 2**). The supplementation was not an immunostimulant.

In group control cattle had the protective rabies antibody titers in any of the two observation days, i.e., all the animals were exposed to the risk of rabies contamination after 30 and 60 days of vaccination (**Figure 2**). In fact, Albas *et al.* (2005) report that cattle which are first-vaccinated against rabies require a booster vaccination to achieve protective titers of rabies anti-bodies.

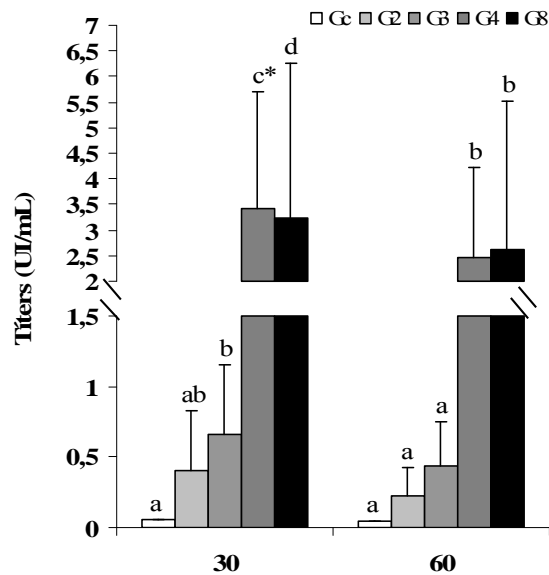
The results found in the present study lead to the conclusion that the probiotic (Proenzime<sup>®</sup>) increases both the humoral immune response and the frequency of cattle immunized by rabies vaccine.

## ACKNOWLEDGMENTS

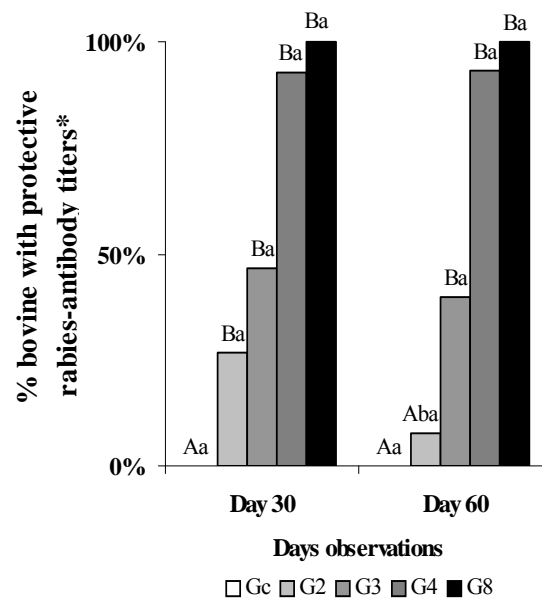
This research supported by the EMBRAUPEC - Empresa Brasileira de Aumento de Produtividade Pecuária, Paranavaí, PR, Brazil.

## REFERENCES

- Albas, A., P.E. Pardo, H. Bremer-Neto, N.M.F. Gallina, R.M. Mourão-Fuches and A. Sartori. 2005. Vacinação anti-rábica em bovinos: comparação de cinco esquemas vacinais. *Arq. Inst. Biol.*, 72: 153-159.
- Arenas, S.E., L.S.L.S. Reis, N.M. Frazatti-Gallina, R. Giuffrida and P.E. Pardo. 2007. Efeito do probiótico Proenzime<sup>®</sup> no ganho de peso em bovinos. *Arch. Zootec.*, 56: 75-78.
- Ávila, F.A., A.C. Paulillo, R.P. Schocken-Iturrino, F.A. Lucas, A. Orgaz and J.L. Quintana. 1998. Use of vaccine and probiotic in the control of swine diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 50: 505-511.
- Consales, C.A., C.A. Pereira, E.C. Passos, M.L. Carreiri, N.M.F. Galina and A.O. Sant'Anna. 2006. Lack of correlation between rabies vírus replication in the brain and antibody isotype profile in genetically modified mice. *J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.*, 12: 423-434.
- Hamilton-Miller, J.M.T. 2004. Probiotics and prebiotics in the elderly. *Postgrad. Med. J.*, 80: 447-451.
- Havenaar, R., and J.H.J Huis In't Veld. Probiotics a general review. 1992. In: Wood B. (ed.). *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*, pp.151-170, Barking Elsevier.
- Kabir, S.M.L., M.M. Rahman, M.B. Rahman, M.M. Rahman and S.U. Ahmed. 2004. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. *Poult. Sci.*, 33: 61-364.
- Koenen, M.E., J. Kramer, R. Van Der Hulst, L. Heres, S.H. Jeurissen and W.J. Boersma. 2004. Immunomodulation by probiotic lactobacilli in layer- and meat-type chickens. *Br. Poult. Sci.*, 45: 355-366.
- Oliveira, N.A., M.C.R. Andrade, M.V. Silva, W.C. Moura and E.C. Contreras. 2000. Immune response in cattle vaccinated against rabies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95: 83-88.
- Silva, C.A., E.H. Hoshi, G.D Pacheco and M.V. Briganó. 2006. Avaliação de probióticos (*Pedococcus acidilactici* e *Bacillus subtilis*) após o desmame e efeitos no desempenho dos leitões. *Semina: Ciências Agrárias*, 27: 133-140.
- Smith JS, Yager PA and Baer GM. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. 1996. In: Mestin FX, Kaplan MM, Koprowski H (eds). *Laboratory Techniques in Rabies*. pp. 181-192, World Health Organization, Geneva.
- Zalan, E., C. Wilson and D.A. Pukitis. 1979. Microtest for the quantitation of rabies virus neutralizing antibodies. *J. Biol. Stand.*, 7: 213-220.
- Zar JH. *Biostatistical Analysis*. 4th ed. 663p + 123 ap, New Jersey, Prentice Hall, 1999.



**Figure 1-** Mean titers (+ standard deviation) of anti-rabies antibodies in first-time-vaccinated cattle receiving feed supplementation with 0 (G<sub>0</sub>), 2 (G<sub>2</sub>), 3 (G<sub>3</sub>), 4 (G<sub>4</sub>) or 8 (G<sub>8</sub>) g of probiotic (Proenzime®)/animal/day. Means followed by a similar letter indicate that, within a same day, no significant difference was found among the groups ( $p < 0.05$ ). \* indicates significant difference between days 30 and 60 within a same group ( $p < 0.05$ ). (Títulos médios (+ desvio padrão) de anticorpos anti-rábicos de bovinos primo-vacinados com suplementação alimentar de 0 (G<sub>0</sub>), 2 (G<sub>2</sub>), 3 (G<sub>3</sub>), 4 (G<sub>4</sub>) ou 8 (G<sub>8</sub>) g de probiótico (Proenzime®)/animal/dia. Médias seguidas por uma letra semelhante indicam que, dentro de um mesmo dia, diferença não significava entre os grupos ( $p < 0.05$ ). \* indica diferença significativa entre dias 30 e 60 dentro de um mesmo grupo ( $p < 0.05$ )).



**Figure 2-** Frequency of rabies-immunized cattle. The cattle received daily feed supplementation with 0 (Gc), 2 (G<sub>2</sub>), 3 (G<sub>3</sub>), 4 (G<sub>4</sub>) or 8 (G<sub>8</sub>) g probiotic (Proenzime<sup>®</sup>)/animal/day. Means followed by a same upper-case letter indicate that, within a same day, no significant difference was found between the groups ( $p < 0.05$ ). Means followed by a same lower-case letter indicate that, within a same group, no significant difference was found between the days ( $p < 0.05$ ). (Frequência de bovinos imunizados contra a raiva. Os bovinos receberam suplementação alimentar diária com 0 (Gc), 2 (G<sub>2</sub>), 3 (G<sub>3</sub>), 4 (G<sub>4</sub>) ou 8 (G<sub>8</sub>) g de probiótico (Proenzime<sup>®</sup>)/animal/dia. Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula indicam que, dentro de um mesmo dia, diferença não significativa entre os grupos ( $p < 0.05$ ). Médias seguidas por uma mesma letra minúscula indicam que, dentro de um mesmo grupo, diferença não significativa entre os dias ( $p < 0.05$ ).