

**AVALIAÇÃO DA VACINAÇÃO ANTIRRÁBICA E DA
SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICO NA RESPOSTA IMUNE
HUMORAL EM BOVINOS**

LUCIENE APARECIDA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA VACINAÇÃO ANTIRRÁBICA E DA
SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICO NA RESPOSTA
IMUNE HUMORAL EM BOVINOS**

LUCIENE APARECIDA FERREIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós –
Graduação em Ciência Animal, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal

Área de Concentração: Fisiopatologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Pardo

636.089 601 F383a	Ferreira, Luciene Aparecida Avaliação da vacinação antirrábica e da suplementação com probiótico na resposta imune humoral em bovinos – Presidente Prudente, 2009. 38 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE: Presidente Prudente – SP, 2009. Bibliografia 1. Probiótico. 2. Raiva -- Vacinação. I. Título
----------------------	--

LUCIENE APARECIDA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA VACINAÇÃO ANTIRRÁBICA E DA
SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICOS NA RESPOSTA
IMUNE HUMORAL EM BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós – Graduação em Ciência Animal,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Ciência Animal.

Presidente Prudente, 10 de março de 2010.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Luís Carlos Vianna
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente - SP

Dr. Vander Bruno dos Santos
Agência Paulista de Tecnologia dos
Agronegócios – APTA
Presidente Prudente - SP

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho em memória do meu pai,
Alcides Ferreira Filho, e para minha mãe,
Aparecida Ferreira, que nunca mediram
esforços para me verem felizes e estiveram
sempre presentes em todos os momentos da
minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Á Deus, ao qual agradeço pelo vida e por todas as bênçãos.

Á minhas irmãs Lucimara Cristiane Ferreira e Lucineide de Fátima Ferreira, pelo carinho e confiança, e aos meus sobrinhos Lucas Willian Ferreira Jangerme, Julia Maria Jangerme e Bruno Rafael Ferreira do Nascimento que são o meu estímulo a alegria.

Á minha família que, em todos os momentos de realização deste trabalho, estiveram presentes me ajudando e animando.

Á amiga Rosemeire dos Santos Souza, pelo companheirismo, verdadeira amizade e os muitos momentos de alegria compartilhados.

Ao professor orientador, Dr. Paulo Eduardo Pardo que com seus ensinamentos, amizade e dedicação me fez aprimorar meus conhecimentos, me acolheu e orientou com carinho.

Aos professores que fizeram parte desta conquista acadêmica pela amizade e carisma.

Ao Edson Neres da Rocha do Departamento de Audiovisual da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE pela montagem do datashow para as apresentações dos meus seminários e qualificação deste trabalho.

“ Ó Deus, vós sois meu Deus, desde a aurora vos procuro.
De vós tem sede minha alma, anela por vós minha carne, como terra deserta, seca,
sem água.

Assim no santuário vos contemplei, para ver vosso poder e vossa glória.
Pois vossa bondade vale mais que a vida, meus lábios proclamam vosso louvor.
Assim vos bendirei enquanto eu viver, em vosso nome erguerei minhas mãos.
Eu me saciarei como num farto banquete, e com vozes de alegria vos louvará minha
boca.

Quando de vós me lembro em meu leito e penso em vós nas vigílias noturnas, porque
fostes meu auxílio, exulto de alegria à sombra de vossas asas.
A vós minha alma está unida, vossa mão direita em sustenta”.

Salmo 63

“A paciência é a melhor maneira de vencer”
“O que o Senhor faz em nós com a nossa cooperação é maior do que tudo o que Ele
faz sem nós”.

Santo Antônio.

RESUMO

Avaliação da vacinação antirrábica e da suplementação com probiótico na resposta imune humoral em bovinos

Objetivou-se avaliar a resposta imune humoral a uma nova vacina antirrábica, desenvolvida no Instituto Butantan em bovinos primovacinados e o efeito do probiótico nesta resposta. Trinta e quatro bovinos da raça Nelore com idade de 15 meses foram divididos aleatoriamente em 2 grupos (17 bovinos/grupo): os animais foram vacinados no dia zero e um dos grupos recebeu uma mistura mineral com probiótico (GP), enquanto o outro apenas a mistura (GC). Colheu-se sangue dos animais nos dias 0, 75 e 150 após a vacinação para determinação dos títulos de anticorpos anti-rábicos neutralizantes pela técnica de soroneutralização em células BHK₂₁ (RFFIT). Foram encontrados títulos de anticorpos protetores ($\geq 0,5$ UI/mL) em 82,4% dos animais do grupo GP e 76,5% do grupo GC. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos títulos de anticorpos entre os soros coletados dos dois grupos de animais nos dias 75 e 150. Verificou-se também que para ambos os grupos no dia 150 houve uma redução significativa ($p < 0,01$) nos títulos de anticorpos. Conclui-se que a vacina antirrábica é eficiente em produzir soroconversão e em manter os títulos de anticorpos em bovinos primovacinados. A ingestão do probiótico não interferiu na resposta imune humoral antirrábica.

Palavras-chave: Raiva, Nelore, Título de anticorpos, RFFIT

ABSTRACT

Evaluation of rabies vaccination and probiotic supplementation on the humoral response in cattle

This study evaluated the humoral immune response of a new rabies vaccine developed by the Instituto Butantan (potency of 3.27 UI/ml) in primovaccinated cattle and the effect of probiotic on this response. Thirty-four 15-month old Nelore cattle were randomly divided into 2 groups (17 animals/group). All the animals were vaccinated on day 0 (zero) and then animals in one group received probiotic added to a mineral mixture (GP) while the others were given only the mineral mixture (GC). Blood samples were collected on days 0, 75 and 150 for rabies neutralizing antibodies titers by seroneutralization assay on BHK₂₁ cells (RFFIT). Protective antibody titers (≥ 0.5 UI/mL) were found in 82.4% of the animals from GP and in 76.5% of the animals from GC and no statistical difference ($p > 0.05$) between antibody titers in GP and GC was detected on days 75 and 150. It was also observed that in both groups antibody titers was decreased on day 150 ($p < 0.01$). In conclusion, the tested rabies vaccine promotes efficient soroconversion and keeps antibody levels in primovaccinated cattle, but probiotic does not affect the humoral anti-rabies immune response.

Key-words: Rabies, Nelore, Titles of antibodies, RFFIT.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	10
1.1 Raiva.....	11
1.2 Probiótico.....	12
2 OBJETIVO.....	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
3 ARTIGO CIENTÍFICO.....	23

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A raiva é uma enfermidade infecciosa viral do sistema nervoso central dos mamíferos, causada por um vírus neurotrópico, RNA, ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae* e do gênero *Lyssavirus* (RADOSTITS et al., 2002; SOARES et al., 2002; UMEHARA et al., 2002; McGETTIGAN et al., 2003; NEL, 2003; PÁEZ et al., 2003, GIOMETTI et al., 2006; ACHKAR et al., 2007; CONSALES; BOLZAN, 2007; REIS et al. 2008).

No Brasil o principal agente transmissor do vírus rábico para os bovinos é o morcego hematófago *Desmodus rotundus*, mas os morcegos hematófagos *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngii* também podem transmiti-la (ALBAS et al., 2006; SCHEFFER et al., 2007). Estes morcegos quando contaminados transmitem o vírus rábico pela saliva aos animais ao se alimentarem de seu sangue (WRIGHT et al., 2002; RIBAS et al., 2003; HANKINS; ROSEKRANS, 2004).

A vacinação é o melhor método de controle da raiva nos bovinos por ser efetivo e de baixo custo (AGUILAR-SETIÉN et al., 2002; FRANKA et al., 2004; HANKINS; ROSEKRANS, 2004; ALBAS et al., 2005 e 2006).

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).

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 (VRESE et al., 2004).

1.1 Raiva

A raiva é considerada uma das mais importantes zoonoses mundial por ser uma encefalite fatal, acometer todos os mamíferos, apresentar distribuição mundial e não ter tratamento (HANKINS; ROSEKRANS, 2004; ALBAS et al., 2006; GIOMETTI et al., 2006; ACHKAR et al., 2007).

Os vírus transmissores da raiva são vírus grandes (180 nm de comprimento e 75 nm de largura) e cilíndricos, com formato de bala de revólver (WU et al., 2002). As lesões causadas por estes vírus limitam-se, geralmente, ao sistema nervoso central, caracterizadas por acúmulos perivasculares com infiltrado celular, principalmente de linfócitos, e em menor grau, macrófagos e plasmócitos, degeneração neuronal, ganglioneurite e necrose neuronal (CONSALES; BOLZAN, 2007; ACHKAR et al., 2007; LIMA et al., 2005).

Estima-se que na América Latina 70 milhões de bovinos estão expostos aos riscos da infecção com vírus rábico causando a mortalidade de 100 a 500 mil bovinos/ano acarretando prejuízo econômico de 50 milhões de dólares (LIMA et al., 2005) e somente no Brasil morre de 30 a 40 mil bovinos/ ano segundo o Ministério da Agricultura (HEINEMANN et al., 2002; ALBAS et al., 2006). Isso representa prejuízos diretos de 15 milhões de dólares e indiretos de 22,5 milhões de dólares (INSTITUTO PASTEUR, 1998; OLIVEIRA et al., 2000; HEINEMANN et al., 2002; WRIGHT et al., 2002; PIZA et al., 2002; LIMA et al., 2005; ALBAS et al., 2005; GIOMETTI et al., 2006).

Essas mortes são resultantes da falha da vacinação antirrábica nesses animais (OLIVEIRA et al., 2000). Os estudos mostram que são necessários a aplicação de duas doses de vacina para os animais atingirem títulos protetores de anticorpos conforme requerido pela Organização Mundial de Saúde (ALBAS et al., 2006; REIS et al. 2008).

1.2 Probiótico

Lilly e Stillwel (1965) usaram o termo probiótico 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. Entretanto, Havenaar e Huis In't Veld (1992) consideraram que probióticos 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 probiótico é de origem grega e significa “pró-vida” (COPPOLA; TURNES, 2004), também é conhecido como “Direct-Fed Microbial” (DFM) (ALVES et al., 2000). Estes compostos são preparações de cultura de microrganismos, extratos e enzimas e são classificados como substância livre de perigos (GRAS – Generally Regarding As Safe) segundo o Food Drugs Administration (FDA) of United States, pois não são tóxicos para os animais e nem deixam resíduos tóxicos na carcaça dos animais que são destinadas para o consumo dos seres humanos (OYETAYO; OYETAYO, 2005).

Os probióticos são suplementos alimentares que contêm microrganismos vivos, que administrado em quantidade adequada, produzem efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; SILVA et al., 2006). Estes efeitos benéficos restringem-se à promoção da saúde e não à cura de doenças (SAAD, 2006).

Os probióticos são benéficos para a saúde dos animais e seres humanos (COPPOLA; TURNES, 2004; MOTA et al., 2006). Dentre os efeitos benéficos dos probióticos, estão sua utilização como promotores de crescimento aumentando o ganho de peso (KABIR et al., 2004; ARENAS et al., 2005), minimizam o estresse (KABIR et al., 2004), impedem a colonização da mucosa intestinal por bactérias patogênicas (ÁVILA et al., 2000; LOZADA, 2001) e aumentam a resposta imune humoral (ARENAS et al., 2005).

Na produção de bovinos, os probióticos atuam como imunoestimulante, assim, aumentam a resistência dos bovinos as doenças infecciosas (LEEDLE, 2000; CHUKEATIROTE, 2003; COPPOLA; TURNES, 2004; HONG et al., 2005; SAAD, 2006). Arenas et al. (2005) observaram aumento significativo nos títulos de anticorpos anti-rábico em bovinos primovacinação contra a raiva, além disso, também elevou para 100% a frequência de animais que apresentaram títulos de anticorpos protetores contra o vírus rábico.

O modo de ação dos probióticos não foi ainda completamente esclarecido, embora tenham sido sugeridos vários processos que podem atuar independentemente ou associados. Um deles é a exclusão competitiva, em que o probiótico competiria com os patógenos por sítios de fixação e nutrientes, impedindo sua ação transitoriamente (HAVENAAR et al., 1992; OUWEHAND et al., 1999; CROSS, 2002). A exclusão competitiva explicaria a necessidade da administração continuada e a elevadas doses dos probióticos, para manifestar seus efeitos.

Os probióticos podem também afetar patógenos através da síntese de bacteriocinas (VILLANI et al., 1995; RODRIGUEZ, 1996; NAIDU et al., 1999), de ácidos orgânicos voláteis (AUDISIO et al., 2000; JIN et al., 2000; OGAWA et al., 2001) e de

peróxido de hidrogênio (HAVENAAR et al., 1992; NAIDU et al., 1999), ou atuar sobre o metabolismo celular, reduzindo a concentração de amônia no organismo (KOZASA, 1986), e liberando enzimas como a lactase (VRESE et al., 2001).

Assim, esses produtos vem substituindo outros promotores de crescimento, dentre os quais os antibióticos, cujo uso na produção animal é indesejável porque sua utilização indiscriminada favorece o aparecimento de bactérias resistentes aos antibióticos (FRANCO et al., 2008).

2 OBJETIVO

Objetivou-se avaliar a resposta imune humoral de bovinos primovacinados a uma nova vacina antirrábica de uso veterinário e o efeito da suplementação com probiótico nessa resposta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKAR, 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:

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

ALBAS, A. et al. Vacinação antirrábica em bovinos: comparação de cinco esquemas vacinais. **Arq. Inst. Biol.**, v. 72, n. 2, p. 153-159, 2005.

ALBAS, A. et al. Interval between first dose and booster affected antibody production in cattle vaccinated against rabies. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 12, n. 3, p. 476-486, 2006.

ALVES, P. A. P. M. et al. Uso de probiótico composto por *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium* e *Saccharomyces cerevisiae* na dieta de vitelos bovinos: efeitos sobre o desempenho e a qualidade da carne. **Bras. J. Res. Anim. Sci.** v. 37, n. 5, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-9596200000500013&lng=pt&nrm=isso>. Acesso em: 20 out. 2006.

ARENAS, S. E. et al. Proenzime[®] probiotic increases the humoral immune response in bovines immunized with the rabies vaccine In: XVI International Conference Rabies on Rabies in the Americas, 2005, Ottawa. **Anais...** Ottawa: Canadian Food Inspection Agency, 2005, p.99-99.

ARENAS, S. E. et al. Efeito do probiótico proenzime[®] no ganho de peso em bovinos. **Arch. Zootec.**, v. 56, n. 213, p. 75-78, 2007.

AUDISIO, M. C.; OLIVER, G.; APELLA, M. C. Protective effect of *Enterococcus faecium* J96, a potential probiotic strain, on chicks infected with *Salmonella pullorum*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 10, p. 1333- 1337, 2000.

ÁVILA, F. A. et al. Avaliação da eficiência de um probiótico no controle de diarreia e no ganho de peso de bezerros. **Arq. Bras. de Med. Vet. E Zootec.**, v. 52, n. 1, p. 41-46, 2000.

CHUKEATIROTE, E. Potencial Use of probiotics. Songklanakarin. **J. Sci. Technol.**, v. 25, n. 2, p. 275-282, 2003.

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.

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.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1297-1303, 2004.

FRANKA, R. et al. 2004. Quantification of the effectiveness of laboratory diagnostics of rabies using classical and molecular-genetic methods. **Veterinária Medicina**, v. 49, n. 7, p. 259-267.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutrition properties of probiotics in food including powder milk live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. 34 p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_em.pdf>. Acesso em: 20 set. 2006.

FRANCO, S. A. **Manual de Terapêutica**. In: PARDO, P. E.; REIS, L. S. L. S. **Nutrientes e Nutracêuticos em grandes animais**. 3.ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 809-810.

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

GOMES, M. N.; UIEDA, W.; LATORRE, M. R. D. O. Influência do sexo de indivíduos da mesma colônia no controle químico das populações do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (*Phyllostomidae*) no estado de São Paulo. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 26, n. 1, p. 38-43, 2006.

GOMES, M. N. et al. Áreas propícias para o ataque de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* em bovinos na região de São João da Boa Vista, Estado de São Paulo. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 27, n. 7, p. 307-313, 2007.

HANKINS, D. G.; ROSEKRANS, J. A. Overview, prevention and treatment of rabies. **Mayo Clin. Proc.**, v. 79, 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.

HEINEMANN, M. B. et al. Genealogical analysis of rabies vírus from Brazil based on N gene alleles. **Epidemiol. Infect.**, v. 128, n. 3, 503-511, 2002.

HONG, A. H.; DUC, H. L.; CUTTING, M. S. The use of spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 813-835, 2005.

INSTITUTO PASTEUR. São Paulo. **Controle da raiva dos herbívoros**. São Paulo: Instituto Pasteur, 1998. (Manual, 1).

JIN, L. Z.; MARQUARDT, R. R.; BAIDOO, S. K. Inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, K99 and 987P by the *Lactobacillus* isolates from porcine intestine. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Sussex, v. 80, n. 5, p. 619-624, 2000.

KABIR, S. M. L. et al. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. **Poult. Sci.**, v. 33, p. 61-364, 2004.

KOZASA, M. Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding. **Microbiology Aliments Nutrition**, n. 4, p. 121-135, 1986.

LEEDLE, J. Probiotics and DFMs – Mode of action in the gastrointestinal tract. In: Simpósio sobre aditivos alternativo na nutrição animal. 2000. Campinas. **Anais...** Campinas, 2000, p. 24-37.

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

LIMA, E. F. et al. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região nordeste do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 25, n. 4, p. 250-254, 2005.

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.

MCGETTIGAN, J. P. et al. Second-generation rabies virus-based vaccine vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 gag have greatly reduced pathogenicity but are highly immunogenic. **Journal of Virology**, v. 77, n. 1, p. 237-244, 2003.

MOTA, R, M. et al. Genetic transformation of novel isolates of chicken lactobacillus bearing probiotic features for expression of heterologous proteins; a tool to develop live oral vaccines. **Biotechnology**, v. 6, n. 2, p.1-11, 2006.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 38, n. 1, p. 13-126, 1999.

NEL, L. H. Lyssavirus genotypes that occurred in Africa. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE RAIVA, 2003, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 2003. p. 12-14.

OGAWA, M. et al. Inhibition of in vitro growth of Shiga toxinproducing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 68, n. 1-2, p. 135-140, 2001.

OLIVEIRA, N. A. et al. Immune response in cattle vaccinated against rabies. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 83-88, 2000.

OUWEHAND, A. C. et al. Probiotics: mechanisms and established effects. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 9, n. 1, p. 43- 52, 1999.

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

PÁEZ, A. et al. Molecular epidemiology of rabies epizootics in Colombia: evidence for human and dog rabies associated with bats. **Journal of General Virology**, v. 84, p. 795-802, 2003.

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

PIZA A.T. et al. Effect of the contents and form of rabies glycoprotein of hte potency of rabies vaccination in cattle. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 265-268, 2002.

RADOSTITS, O. M. et al. **Clínica Veterinária**. São Paulo: Guanabara Koogan. 9.ed. 2002. p. 1364-1380.

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

RIBAS, M. A. et al. Detección de anticuerpos antirrábicos en personal de riesgo con el empleo de la técnica de neutralización por reducción del número de placas. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 55, n. 2, p. 91-95, 2003.

RODRIGUES DA SILVA, A. C. et al. Antibody response in cattle after vaccination with inactivated and attenuated rabies vaccines. **Rev. Inst. Med. Trop.**, S. Paulo, v. 42, n. 2, p. 95-98, 2000.

RODRIGUEZ, J. M. Antimicrobial spectrum, structure, properties and mode of action of nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. **Food Science and Technology International**, New York, v. 2, n. 2, p. 61-68, 1996.

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

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

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.

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

SOARES, R. M. et al. A heminested polymerase chain reaction for the detection of Brazilian rabies isolates from vampire bats and herbivores. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 109-111, 2002.

UMEHARA, O., et al. Rabies vírus neutralizing antibody profile in cattle vaccinated with inactivated vaccine adjuvanted with either aluminum hydroxide alone or combined with avridine. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 1, p. 23-28, 2002.

VILLANI, F. et al. Antilisterial activity of thermophilin 347, a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 25, n. 2, p. 179-190, 1995.

VRESE, M. et al. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, n. 2, p. 421S-429S, 2001.

VRESE, M. P. et al. Probiotic bacteria stimulate virus-specific neutralizing antibodies following a booster polio vaccination. **Eur. J. Nutr.**, v. 44, n. 7, p. 406-413, 2004.

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

WU, X. et al. Both viral transcription and replication are reduced when the rabies virus nucleoprotein is not phosphorylated. **Journal of Virology**, v. 76, n. 9, p. 4153-4161, 2002.

ZALAN, E.; WILSON, C.; PUKITIS, D. A. microtest for the quantitation of rabies virus neutralizing antibodies. **J. Biol. Stand.**, v. 7, p. 213-220, 1979.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Avaliação da vacinação antirrábica e da suplementação com probiótico na resposta imune humoral em bovinos

Evaluation of anti-rabies vaccination and supplementation with probiotic in the humoral immune response in cattle

Artigo enviado para publicação na revista:

Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 30, n. 3, p. 655-660, jul./set. 2009

Recebido para publicação 18/01/08. Aprovado em 10/02/09

Avaliação da vacinação antirrábica e da suplementação com probiótico na resposta imune humoral em bovinos

Evaluation of anti-rabies vaccination and supplementation with probiotic in the humoral immune response in cattle

Luciene Aparecida Ferreira¹; Paulo Eduardo Pardo²; Neuza Maria Frazatti-Gallina³; Regina Maria Mourão-Fuches³; Daniella Cristina Ventini³; Sérgio do Nascimento Kronka²; Sandro Eduardo Arenas²; Luis Souza Lima de Souza Reis^{4*}

Resumo

Objetivou-se avaliar a resposta imune humoral a uma nova vacina antirrábica, desenvolvida no Instituto Butantan em bovinos primovacinados e o efeito do probiótico nesta resposta. Trinta e quatro bovinos da raça Nelore com idade de 15 meses foram divididos aleatoriamente em 2 grupos (17 bovinos/grupo): os animais foram vacinados no dia zero e um dos grupos recebeu uma mistura mineral com probiótico (GP), enquanto o outro apenas a mistura (GC). Colheu-se sangue dos animais nos dias 0, 75 e 150 após a vacinação para determinação dos títulos de anticorpos anti-rábicos neutralizantes pela técnica de soroneutralização em células BHK₂₁ (RFFIT). Foram encontrados títulos de anticorpos protetores ($\geq 0,5$ UI/mL) em 82,4% dos animais do grupo GP e 76,5% do grupo GC. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos títulos de anticorpos entre os soros coletados dos dois grupos de animais nos dias 75 e 150. Verificou-se também que para ambos os grupos no dia 150 houve uma redução significativa ($p < 0,01$) nos títulos de anticorpos. Conclui-se que a vacina antirrábica é eficiente em produzir soroconversão e em manter os títulos de anticorpos em bovinos primovacinados. A ingestão do probiótico não interferiu na resposta imune humoral antirrábica.

Palavras-chave: Raiva, Nelore, Títulos de anticorpos, RFFIT

Abstract

This study evaluated the humoral immune response of a new rabies vaccine developed by the Instituto Butantan (potency of 3.27 UI/ml) in primovaccinated cattle and the effect of probiotic on this response. Thirty-four 15-month old Nelore cattle were randomly divided into 2 groups (17 animals/group). All the animals were vaccinated on day 0 (zero) and then animals in one group received probiotic added to a mineral mixture (GP) while the others were given only the mineral mixture (GC). Blood samples were collected on days 0, 75 and 150 for rabies neutralizing antibodies titers by seroneutralization assay on BHK₂₁ cells (RFFIT). Protective antibody titers (≥ 0.5 UI/mL) were found in 82.4% of the animals from GP and in 76.5% of the animals from GC and no statistical difference ($p > 0.05$) between antibody titers in GP and GC was detected on days 75 and 150. It was also observed that in both groups antibody titers was decreased on day 150 ($p < 0.01$). In conclusion, the tested rabies vaccine promotes efficient seroconversion and keeps antibody levels in primovaccinated cattle, but probiotic does not affect the humoral anti-rabies immune response.

Key words: Rabies, Nelore, Titles of antibodies, RFFIT.

¹ Mestranda em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP.

² Docente do Departamento de Clínica Médica – Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP.

³ Laboratório de Raiva, Instituto Butantan, São Paulo, SP.

⁴ Doutorando em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista – FMVZ/UNESP

* Autor para correspondência – E-mail: centraldepesquisaepublicacoes@yahoo.com.br.

Introdução

A raiva é uma enfermidade infecciosa viral causada pelo vírus da família Rhabdoviridae, gênero Lyssavirus (GOMES et al., 2007; LIMA et al., 2005; SCHEFFER et al., 2007). Esta enfermidade é uma das principais zoonoses mundiais, que causa encefalite fatal, acomete todos os mamíferos, tem ampla distribuição geográfica (ALBAS et al., 2006; FRANKA et al., 2004; LIMA et al., 2005) e é transmitida para os bovinos, principalmente pelo morcego hematófago *Desmodus rotundus* (GOMES; UIEDA; LATORRE, 2006; LIMA et al., 2005; SCHEFFER et al., 2007). Esta doença causa a morte de cerca de 100 a 500 mil bovinos por ano na América Latina causando prejuízo de aproximadamente 50 milhões de dólares (LIMA et al., 2005) e somente no Brasil na ordem de 30 a 40 mil bovinos/ano segundo o Ministério da Agricultura. Isso representa prejuízos diretos de 15 milhões de dólares e indiretos de 22,5 milhões de dólares. Para fazer o controle desta enfermidade, a vacinação contínua dos bovinos é o método mais efetivo, de menor custo e reduz as perdas econômicas (ALBAS et al., 2006; LIMA et al., 2005; PIZA et al., 2002).

Os probióticos são benéficos para a saúde dos animais e seres humanos. Dentre os efeitos benéficos dos probióticos, estão: são utilizados como promotores de crescimento aumentando o ganho de peso (ARENAS et al., 2007), impedem a colonização da mucosa intestinal por bactérias patogênicas e aumentam a resposta imune humoral (ARENAS et al., 2005).

Objetivou-se avaliar a resposta imune humoral de bovinos primovacinados a uma nova vacina antirrábica de uso veterinário e o efeito da suplementação com probiótico nessa resposta.

Material e métodos

O experimento foi desenvolvido nos meses de maio a outubro de 2006 com o período experimental de 150 dias, no município de Presidente Prudente, extremo oeste do estado de São Paulo, Brasil (latitude 22° 07' 04" e longitude 51° 22' 57") com precipitação anual de média de 1.244 mm, umidade relativa do ar de aproximadamente 65,5%, temperatura média anual de aproximadamente de 28 °C e altitude de 475 metros.

Utilizaram-se 34 bovinos, machos inteiros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) com idade de, aproximadamente, 15 meses e divididos aleatoriamente em 2 grupos (17 bovinos/grupo): o grupo controle (GC) recebeu mistura mineral sem probiótico e no grupo probiótico (GP) os animais foram suplementados com mistura mineral adicionada de probiótico. Os animais do GP consumiram 4 gramas de probiótico/animal/dia durante o período experimental. Após 30 dias de ajuste ao novo suplemento mineral, ao probiótico e às condições de manutenção, iniciou-se o período de observação experimental, que durou 150 dias.

Os piquetes utilizados por ambos os grupos de bovinos 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. Para isso, os bovinos foram levados no período da manhã para o curral, contidos em tronco de contenção e 10 mL de sangue de cada animal foi colhido por meio da punção da veia jugular em tubos à vácuo sem anticoagulante e centrifugados a 2.500 rpm por 10 minutos. Então as amostras de soro foram acondicionadas em tubos de plásticos 1,5 mL e armazenadas por congelamento a -20°C para posterior determinação do título de anticorpos neutralizantes anti-rábicos.

Os títulos de anticorpos neutralizantes antirrábicos foram determinados por meio da técnica de soroneutralização em células BHK₂₁, teste esse baseado no Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test – RFFIT (SMITH; YAGER; BAER, 1996) e no Fluorescent Inhibition Microtest – FIMT (ZALAN; WILSON; PUKITIS, 1979).

Foi utilizada uma nova vacina antirrábica inativada, liofilizada e de uso veterinário, desenvolvida no Instituto Butantan (IB), já previamente testada em camundongos, cães e gatos. Esta vacina foi produzida a partir de suspensões virais obtidas de culturas de células BHK₂₁ infectadas com o vírus rábico PV (Pasteur Virus), concentrada por filtração tangencial, purificada por cromatografia, inativada pela β -propiolactona e liofilizada. Na liofilização foi utilizada como estabilizador a albumina eqüina. O lote de vacina utilizado (IB-VR/BHK21-01/03) apresentou a potência de 3,17 UI/mL, determinada pelo teste NIH (WILBUR; AUBERT, 1996).

No dia zero do experimento, foi aplicada em todos os bovinos uma dose de 2 mL de vacina por via subcutânea.

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

A mistura mineral utilizada foi a Matsuda Fós®, produzida por Matsuda Sementes e Nutrição Animal, Álvares Machado, SP, Brasil, contendo para cada Kg de mistura: cálcio 140 g, fósforo 65 g, cobalto 107 g, iodo 5 g, magnésio 5 g, cobre 1.550 mg, enxofre 9 g, sódio 148 g, ferro 1.120 mg, manganês 1.100 mg, níquel 30 mg, selênio 14 mg, zinco 4.000 mg, flúor (máx.) 650 mg, solúvel em P em ac. cítrico 2% (min.) 95%. Neste suplemento mineral adicionou-se 0 e 66,7 g de probiótico/Kg de suplemento.

O consumo diário médio/animal de ambos os suplementos minerais foram de 60 g durante o período experimental, onde se determinou que nesse período os animais do grupo GP consumiram 4 g de probiótico/dia.

Os dados foram submetidos à análise de variância bifatorial (teste F) e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Em todas as análises considerou-se o nível de 5% de probabilidade (BANZATTO; KRONKA, 2006).

Resultados e discussão

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 e os animais do grupo GP já estavam consumindo o probiótico por 30 dias antes da vacinação. Assim, as variações encontradas nos títulos de anticorpos antirrábicos nos soros desses animais durante o experimento foram induzidas pela vacinação antirrábica realizada no dia zero e pela administração ou não do probiótico.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza que é necessário o título de anticorpos neutralizantes antirrábico igual ou superior a 0,5 UI/mL (Unidade Internacional UI/mL) para proteger os seres humanos dos riscos da infecção com o vírus rábico. Mas Sihvonen, Kulonen e Neuvonen (1994), Albas et al. (1998), Benišek et al. (2000), Rodrigues da Silva et al. (2000) e Albas et al. (2005) defendem a teoria de que este título de anticorpos neutralizantes anti-rábico também é o mínimo protetor para os bovinos.

Primeiramente notou-se que a resposta imune humoral antirrábica nos bovinos dos grupos GC e GP foi heterogênea, ficando confirmada pelo elevado coeficiente de variação (C.V.) dos títulos de anticorpos, para grupos (C.V.= 137,19%) e dias de observação (C.V.= 57,48%), apresentando animais que não responderam à vacinação (títulos de anticorpos $<0,50$ UI/mL) intercalados com outros que apresentaram títulos de anticorpos protetores mínimos ($\geq 0,50$ UI/mL) a elevados. Este fato também foi observado por Ciuchini et al. (1981), Albas et al. (1998, 2005), Giometti et al. (2006) e Maria et al. (2007) avaliando a resposta imune humoral a outras vacinas antirrábicas. Portanto, esta variação nos títulos de anticorpos nos bezerros pode ser uma característica fisiológica da resposta imune humoral antirrábica em bovinos primovacinados.

Os resultados obtidos mostraram que houve efeito da interação entre grupos experimentais e dias de observação. A Figura 1 mostra que no grupo tratado com probiótico (GP) os títulos de anticorpos antirrábicos são 94% e 54% maiores do que os do grupo controle nos dias 75 e 150 após a vacinação, respectivamente. Mesmo assim, não houve diferença significativa ($p>0,05$) nos títulos de anticorpos entre os tratamentos em ambos os dias após a vacinação. Portanto neste experimento, não foi observada a ação imunomoduladora específica do probiótico. Entretanto, Arenas et al. (2005), estudando o efeito da administração do probiótico Proenzime® para bovinos primovacinados contra a raiva relataram aumento significativo nos títulos de anticorpos antirrábicos nos bovinos, 30 e 60 dias após a vacinação. Comparando-se esses dados com outros em que se usou o probiótico para aumentar a resposta imune na vacinação antirrábica, podemos sugerir que quando se usa uma vacina com maior potência e liofilizada o uso desse imunomodulador não tem nenhuma relevância.

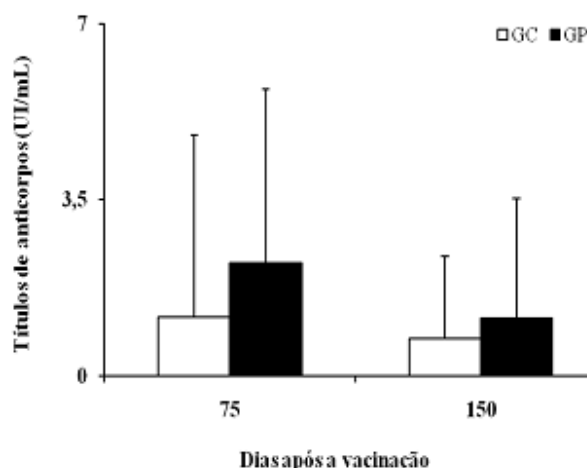


Figura 1. Títulos médios (+ desvio padrão) de anticorpos antirrábicos de bovinos Nelore primovacinados e suplementados (Gc) ou não (GP) com 4 g de probiótico/animal/dia adicionados na mistura mineral.

Os resultados apresentados na Figura 1 mostram que independentemente do uso ou não do probiótico os bovinos primovacinados contra a raiva apresentaram títulos de anticorpos antirrâbicos elevados em até 150 dias após a vacinação. Além disso, com apenas uma dose da vacina do Instituto Butantã observou-se uma elevada porcentagem de bovinos que apresentaram títulos de anticorpos considerados protetores nos dias 75 (76,5% e 82,4% de animais nos grupos GC e GP, respectivamente) e 150 (76,5% dos animais de ambos os grupos experimentais). Estes resultados comprovam que a vacina antirrâbica utilizada neste experimento tem elevada eficiência em produzir e manter a soroconversão nos bovinos primovacinados contra a raiva por longo período de tempo.

Na Figura 2 observa-se que apesar de haver uma redução significativa ($p < 0,01$) nos títulos de anticorpos dos bovinos nos dois grupos (GC e GP) não houve interação significativa, pois aos 150 dias após a vacinação, esses permaneceram elevados quando se leva em consideração o título necessário para proteger o animal ($\geq 0,50$ UI/mL). Os valores encontrados foram 1,5 e 2,3 vezes maiores do que o considerado protetor nos grupos GC e GP, respectivamente. Além disso, foi observada uma elevada porcentagem de bovinos (75,6%) protegidos. Esta redução nos títulos de anticorpos antirrâbicos é um efeito fisiológico da resposta imune humoral em bovinos primovacinados contra a raiva, pois este fato também foi observado por Albas et al. (1998, 2005), Giometti et al. (2006) e Maria et al. (2007) avaliando a resposta imune humoral a outras vacinas antirrâbicas para bovinos devidamente liberadas, registradas e aprovadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

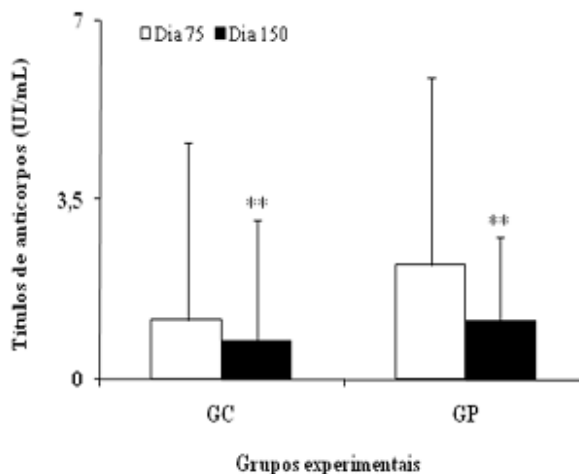


Figura 2. Títulos médios (+ desvio padrão) de anticorpos antirrâbicos de bovinos Nelore primovacinados e suplementados (Gc) ou não (GP) com 4 g de probiótico/animal/dia adicionados na mistura mineral. ** indicam diferença significativa entre os dias de observação ($p < 0,01$).

Apesar da vacina avaliada neste experimento ter excelente capacidade de induzir a soroconversão e de manter os títulos de anticorpos antirrâbicos considerados protetores nos bovinos primovacinados contra a raiva por longos períodos, estes resultados não dispensam a necessidade da aplicação da dose de reforço em bovinos primovacinados conforme preconizado pelo Programa de Controle da Raiva em Herbívoros do Instituto Pasteur.

Conclusões

Os resultados obtidos permitiram concluir que a vacina antirrâbica desenvolvida no Instituto Butantan teve elevada eficiência em induzir a soroconversão e em manter os títulos de anticorpos anti-râbicos em bovinos primovacinados por até 150 dias após a vacinação e que a suplementação da mistura mineral com probiótico não interferiu na resposta imune humoral antirrâbica.

Agradecimentos

Ao Instituto Butantã pelo incentivo e apoio deste experimento.

Referências

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.

ALBAS, A.; PARDO, P. E.; BREMER-NETO, H.; GALLINA, N. M. F.; MOURÃO FUCHES, R. M.; SARTORI, A. Vacinação antirrábica em bovinos: comparação de cinco esquemas vacinais. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 153-159, 2005.

ALBAS, A.; PARDO, P. E.; GOMES, A. A. B.; BERNARDI, F.; ITO, F. H. Effect of a booster-dose of rabies vaccine on the duration of virus neutralizing antibody titers in bovine. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 31, n. 4, p. 367-371, 1998.

ARENAS, S. E.; REIS, L. S. L. S.; FRAZATTI-GALLINA, N. M.; FUJIMURA, S. H.; BREMER NETO, H.; MESSAS, A. C.; PARDO, P. E. Proenzime® probiotic increases the humoral immune response in bovines immunized with the rabies vaccine. In: *INTERNATIONAL CONFERENCE RABIES ON RABIES IN THE AMERICAS*, 16., 2005, Ottawa. Anais... Ottawa: Canadian Food Inspection Agency, 2005. p. 99.

ARENAS, S. E.; REIS, L. S. L. S.; FRAZATTI-GALLINA, N. M.; GIUFFRIDA, R.; PARDO, P. E. Efeito do probiótico proenzime® no ganho de peso em bovinos. Archivos de Zootecnia, Córdoba, v. 56, n. 213, p. 75-78, 2007

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

BENIŠEK, Z.; SÜLI, J.; ŠVRČEK, Š.; MOJŽIŠ OVA, J.; TAKÁČOVA, D.; ZÁVADOVÁ, J.; ONDREJKA, R.; ONDREJKOVÁ, A. Experimental inactivated purified concentrated adjuvant rabies vaccine. Evaluation of its efficacy in cattle. Acta Veterinaria BRNO, Palackého, v. 69, n. 1, p. 39-44, 2000.

CIUCHINI, I. A.; PESTALOZZA, S.; TRANI, L.; ANTONUCCI, G. Risposta immunitaria in bovini vaccinati contro la rabbia con virus attenuato ceppo ERA. Revista di Zootecnia e Veterinária, Milano, v. 9, p. 176-184, 1981.

FRANKA, R.; SVRCEK, S.; MADAR, M.; KOLESAROVA, M.; ONDREJKOVA, A.; ONDREJKA, R.; BENISEK, Z.; SULI, J.; VILCEK, S. Quantification of the effectiveness of laboratory diagnostics of rabies using classical and molecular-genetic methods. Veterinární Medicína, Czech, v. 49, n. 7, p. 259-267, 2004.

GIOMETTI, J.; CHIACCHIO, S.B.; ALBAS, A.; PARDO, P.E.; BREMER NETO, H.; GIOMETTI, A. I.; REIS, L. S. L. S. Influência da suplementação com crômio na resposta imune humoral antirrábica em bovinos. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v. 73, n. 4, p. 421-427, 2006

GOMES, M. N.; MONTEIRO, A. M. V.; NOGUEIRA-FILHO, V. S.; GONÇALVES, C. A. Áreas propícias para o ataque de morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* em bovinos na região de São João da Boa Vista, Estado de São Paulo. Pesquisa Veterinária Brasileira, Seropédica, v. 27, n. 7, p. 307-313, 2007

GOMES, M. N.; UIEDA, W.; LATORRE, M. R. D. O. Influência do sexo de indivíduos da mesma colônia no controle químico das populações do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae) no estado de São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira, Seropédica*, v. 26, n. 1, p. 38-43, 2006

LIMA, E. F.; RIET-CORREA, F.; CASTRO, R. S.; GOMES, A. A. B.; LIMA, F. S. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região nordeste do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira, Seropédica*, v. 25, n. 4, p. 250-254, 2005

MARIA, E. K.; PARDO, P. E.; FRAZATTI-GALLINA, N. M.; PAOLI, R. L.; MOURÃO-FUCHES, R. M.; REIS, L. S. L. S. Efeito da suplementação com zinco na resposta immune humoral antirrábica em bovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 44., 2007, Jaboticabal. Anais... Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2007. p.1-3.

PIZA, A. T.; PIERI, K. M. S.; LUSA, G. M.; CAPORALE, G. M. M.; TERRERAN, M. T.; MACAHDO, L. A.; ZANETTI, C. R. 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, 2002.

RODRIGUES DA SILVA, A. C.; CAPORALE, G. M. M.; GONÇALVES, C. A.; TARGUETA, M. C.; COMIN, F.; ZANETTI, C. R.; KOTAIT, I. Antibody response in cattle after vaccination with inactivated and attenuated rabies vaccines. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba*, v. 42, n. 2, p. 95-98, 2000.

SCHEFFER, K. C.; CARRIERI, M. L.; ALBAS, A.; SANTOS, H. C. P.; KOTAIT, I.; ITO, F. H. Vírus da raiva em quirópteros naturalmente infectados no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública, São Paulo*, v. 41, n. 3, p. 389-395, 2007.

SIHVONEN, L.; KULONEN, K.; NEUVONEN, E. Immunization of cattle against rabies using inactivated cell culture vaccines. *Acta Veterinaria Scandinavica*, Copenhagen, v. 35, n. 4. p. 371-376, 1994.

SMITH, J. S.; YAGER, P. A.; BAER, G. M. A rapid luorescent focus inhibition test (RFFIT) for determing rabies virus-neutralizing antibody. In: MESTIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Ed.). *Laboratory techniques in rabies*. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 181-192.

WILBUR, L. A.; AUBERT, M. F. A. The NIH test for potency. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Ed.). *Laboratory techniques in rabies*. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 360-368.

ZALAN, E.; WILSON, C.; PUKITIS, D. A microtest for the quantitation of rabies virus neutralizing antibodies. *Journal of Biological Standardization*, Saskatchewan, v. 7, n. 3, p. 213-220, 1979.

Normas Editoriais para Publicação – Revista SEMINA

Apresentação dos Trabalhos

1. Os originais devem ser enviados em disquete (3 ½), acompanhado de três cópias impressas, com entrelinhamento duplo. O trabalho deverá ser elaborado no editor de texto Microsoft Word for Windows, fonte Times New Roman, tamanho 11, normal; com margens de no mínimo 2cm, respeitando-se o número de páginas de acordo com a categoria do trabalho e devem estar devidamente numeradas.

2. Categorias dos Trabalhos:

- a) artigos e revisões no máximo 40 páginas;
- b) comunicações; divulgações e resenhas no máximo 20 páginas;
- c) resenhas de livros e revistas no máximo 4 páginas; e

3. Na primeira lauda do original deverá constar o título do trabalho, nome completo do autor principal, minicurrículo, endereço postal, número do telefone e/ou fax e e-mail; categoria do trabalho; área de publicação da Semina e classificação das áreas/sub-áreas do CNPq/CAPES.

3.1. *Título do trabalho*: o título, acompanhado de sua tradução para o inglês, deve ser breve e suficientemente específico e descritivo, contendo as palavras-chave que representem o conteúdo do texto.

3.2. *Nome(s) completo(s) do(s) autor(es)*: Os demais dados como título e/ou credenciais, cargo(s) ocupado(s) pelo(s) autor(es) e local de realização do trabalho deverão constar em nota de rodapé.

3.3. *Resumo*: deve ser incluído um resumo informativo de aproximadamente 200 palavras, em português, acompanhado de sua tradução para o inglês, digitado com entrelinhamento duplo, na segunda lauda do original. (NBR 6028 da ABNT)

3.4. *Agradecimentos*: agradecimentos a auxílios recebidos para a elaboração do trabalho deverão ser mencionados no final do artigo.

3.5. *Notas*: notas referentes ao corpo do artigo devem ser indicadas com um asterisco alto, imediatamente depois da frase a que diz respeito. As notas deverão vir no rodapé do texto.

3.6. *Apêndices*: apêndices podem ser empregados no caso de listagens extensivas, estatísticas e outros elementos de suporte.

3.7. *Materiais gráficos*: fotografias nítidas e gráficos (estritamente indispensáveis à clareza do texto) poderão ser aceitos e deverão ser assinalados, no texto, pelo seu número de ordem, os locais onde devem ser intercalados. Se as ilustrações enviadas já tiverem sido publicadas, mencionar a fonte e a permissão para reprodução.

3.8. *Quadros e Tabelas*: os quadros e/ou tabelas deverão ser acompanhados de cabeçalho que permita compreender o significado dos dados reunidos, sem necessidade de referência ao texto. Assinalar, no texto, por seu número de ordem, os locais onde os quadros e/ou tabelas devem ser intercalados.

3.9. As grandezas, unidades e símbolos deverão obedecer às normas nacionais correspondentes (ABNT).

3.10. *Citações*: deverão seguir o sistema de chamada alfabética (NBR 10520 da ABNT).

3.11. *Referências bibliográficas*: as referências bibliográficas, redigidas segundo a norma NBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), deverão ser listadas na ordem alfabética no final do artigo. A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo são da responsabilidade do autor.

4. O autor principal deverá enviar, junto com o original, autorização para publicação do trabalho na SEMINA, comprometendo-se a não publicá-lo em outro periódico.

5. A publicação dos trabalhos depende de parecer da Assessoria Científica "*Ad hoc*" da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UEL.

6. Após impressa a revista, o autor principal receberá gratuitamente um (1) exemplar da revista.

7. Os trabalhos não aceitos para publicação serão devolvidos ao autor.

8. As questões e problemas não previstos na presente norma serão dirimidos pelo Comitê Editorial da área para a qual foi submetido o artigo para publicação.

9. Os trabalhos devem ser enviados para:

Universidade Estadual de Londrina.
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação.
Edição da SEMINA.
Campus Universitário - Caixa Postal 6001.
86051-990 - Londrina, Paraná, Brasil.