

RESUMO

Esse estudo avaliou o efeito da suplementação do probiótico (DBR SACCH) adicionado à mistura mineral na resposta imune humoral em bovinos vacinados com uma única dose de vacina antirrábica. 15 bovinos machos, Girolando, com idade de 18 meses foram divididos aleatoriamente em 2 grupos (15 bovinos/grupo): Grupo Controle (GC) com 70 gramas de suplemento mineral/animal/dia, Grupo Teste (GT) com 70 gramas de suplemento mineral adicionado 4 gramas de probiótico/animal/dia. Os títulos individuais de anticorpos neutralizantes foram determinados por meio da técnica de soroneutralização baseado no Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) e no Fluorescent Inhibition Microtest (FIMT). Houve diferenças estatísticas significativas entre as médias de concentrações séricas entre os grupos nos 73 dias do experimento, concluindo que a administração de probióticos interfere na resposta imune humoral antirrábica.

ABSTRACT

This study evaluated the effect of probiotic supplementation (DBR SACCH) of mineral mixture added to the humoral immune response in cattle vaccinated with a single dose of rabies vaccine. 30 steers, Girholando, aged 12 months were randomly divided into 2 groups (15 animals / group): control group (CG) with 70 grams of mineral/animal / day, probiotic test (GT) with 70 grams of supplement mineral added 4 grams of probiotic / animal. The individual titles of neutralizing antibodies were determined by neutralization technique based on the Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) and Fluorescent Inhibition Microtest (FIMT). There was statistically significant differences between the mean serum concentrations between groups, concluding that the administration of probiotics interfere with the humoral immune response rabies

Efeito da suplementação do probiótico DBR SACCH sobre a resposta imune humoral em bovinos vacinados com vacina antirrábica.

INTRODUÇÃO

A raiva é uma enfermidade infecciosa viral do sistema nervoso central dos mamíferos, causada por um vírus neurotrópico, RNA, de ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae* e do gênero *Lyssavirus* (GIOMETTI et al., 2006; ACHKAR et al., 2007; CONSALES e BOLZAN, 2007; REIS et al., 2008), onde no Brasil, o principal agente transmissor do vírus rábico é o morcego hematófago *Desmodus rotundus* (ALBAS et al, 2006; SCHEFFER et al., 2007).

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

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

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

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

Bifidobacterium ssp, *Bacillus subtilis*, *B. toyoi*, *Aspergillus oryzae* e *Saccharomyces cerevisiae* (MATOS, 2008).

Para um produto probiótico apresentar a alegação de promoção de saúde, no seu rótulo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008), estabelece que a quantidade mínima viável da cultura deva estar entre 10^8 a 10^9 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) por porção do produto (HOLANDA et al., 2008).

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

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

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

OBJETIVO

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

Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido nos meses de maio e outubro de 2013 com o período experimental de 90 dias, no município de Presidente Bernardes. É um município brasileiro do estado de São Paulo. Localiza-se a uma latitude 22°00'22" sul e a uma longitude 51°33'11" oeste, estando a uma altitude de 429 metros. Utilizaram-se 15 bovinos, machos inteiros da raça Girhondo (*Bos indicus*) com idade, 18 meses, divididos aleatoriamente em 2 grupos (15 bovinos/grupo), onde o Grupo Controle (GC) recebeu mistura mineral sem probiótico e no Grupo Teste (GT) os animais foram suplementados com mistura mineral proteinada adicionada de probiótico DBR SACCH. Os animais do GT consumiram 4g de probiótico/animal/dia durante o período experimental conforme Arenas et al.(2009). No dia zero do experimento, aplicou-se em todos os bovinos uma dose de 2 mL desta vacina por via subcutânea.

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

As amostras de sangue dos bovinos foram colhidas nos dias 0, 42 e 73. O sangue foi colhido por meio da punção da veia jugular em tubos à vácuo sem anticoagulante, centrifugados a 2.500 rpm por 10 minutos e as amostras de soro foram acondicionadas em tubos plásticos de 1,5 mL e armazenadas em freezer a -20 °C para posterior determinação do título de anticorpos neutralizantes anti-rábicos.

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

Utilizou-se um probiótico comercial devidamente registrado e aprovado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Inicialmente, todos os grupos de dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para, pelo qual constatou-se que as variáveis estudadas não apresentaram distribuição paramétrica. Diante destes fatos, recorreu-se ao teste de Mann-Whitney para verificar se os grupos controle e experimental diferiram dentro de cada momento e o teste de Wilcoxon para determinar se os momentos diferiram dentro de cada grupo. Todas as comparações foram realizadas com auxílio do software Biostat 5.3 e adotando-se 5% de nível de significância (AYRES et al., 2007).

Resultados

Tabela 1- Médias, desvios padrões, medianas e desvios interquartílicos da concentração de anticorpos anti-rábicos mensurados pela técnica de RIFF em bovinos vacinados.

	Dias pós-vacina								
	zero			42			73		
Grupo	média ± D.P.	med	DIQ	média ± D.P.	Med	DIQ	média ± D.P.	med	IIQ
CONTRO	0,066±0,020	0,06	0	0,673±0,447*	0,64	0,615	0,264±0,216	0,21	0,145
DBR SACCH	0,063±0,007	0,06	0	2,419±2,191	1,7	1,515	1,919±1,969	1,1	1,32
p	0,9174			0,0003			< 0,0001		

D.P. – desvio padrão; DIQ –desvio interquartílico; p-valor de significância no teste de Mann-Wiyhney.

No dia 0 os soros dos animais não foram reativos para a raiva, mostrando que os bovinos não haviam tido contato com o vírus rábico selvagem ou vacinal. Assim, as variações encontradas nos títulos de anticorpos anti-rábicos nos soros dos bovinos durante o experimento foram produzidas pela vacinação antirrábica realizada no dia zero juntamente com o efeito da suplementação com probiótico.

Assim a suplementação com probiótico foi capaz de imunoestimular os bovinos primovacinaados durante os 73 dias do experimento conforme a tabela 1. Estes resultados concordam com o de ARENAS et al. (2009) que observaram aumento significativo nos títulos de anticorpos antirrábicos nos bovinos suplementados com probiótico Proenzime[®].

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que aos 42 dias após a imunização antirrábica dos bovinos, independente da suplementação ou não com o probiótico, grupos GT ou GC respectivamente, as médias dos títulos de anticorpos antirrábicos estavam acima do considerado protetor ($\geq 0,50$ UI/mL). Na Tabela 1 nota-se que houve redução significativa nos títulos de anticorpos antirrábicos entre os dias 0 e 73 em ambos os grupos experimentais. Provavelmente isto seja uma característica da resposta imune humoral anti-rábica em bovinos primovacinaados. Este fato também foi observado por GIOMETTI et al. (2006).

Durante todo o experimento de 73 dias o uso do probiotico elevou as médias dos títulos de anticorpos acima do considerado protetor ($\geq 0,50$ UI/mL) enquanto o grupo controle não apresentou títulos protetores.

Com os resultados obtidos neste estudo, conclui-se, que a suplementação com probiótico adicionado ao sal mineral aumentou a resposta imune humoral .

Referências Bibliográficas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SILVA, C. A. et al. Avaliação de probióticos (*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.