

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Efeito de *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *toyoi* na resposta imune de cordeiros vacinados contra *Escherichia coli* e Herpes vírus bovino-5

Talita Bandeira Roos

Pelotas, outubro de 2006

TALITA BANDEIRA ROOS

**EFEITO DE *Sacharomyces boulardii* E *Bacillus cereus* VAR. *toyoi* NA
RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE CORDEIROS VACINADOS CONTRA
Escherichia coli E HERPESVÍRUS BOVINO-5**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, sob orientação do Prof. Dr. Carlos Gil Turnes, como parte das exigências do programa de Pós Graduação em Veterinária, área de concentração em Veterinária Preventiva, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências (M.Sc.)

Comitê de orientação:

Prof. Dr. Carlos Gil Turnes (DMVP/ FV / UFPel)

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (DEMP / IB / UFPel)

Prof. Dr. Marcio Nunes Corrêa (DCV / FV / UFPel)

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

R776e Roos, Talita Bandeira

Efeito de *Sacharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *toyo*i na resposta imune humoral de cordeiros vacinados contra *Eschechia coli* e herpesvírus bovinos-5 / Ana Laura Pereira Amato. - Pelotas, 2006.
68f.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária Preventiva. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. - Pelotas, 2006, Carlos Gil Turnês, Orientador.

1. Probióticos 2. Ruminantes 3. Imunomodulação I Turnês, Carlos Gil (orientador) II .Título.

CDD 636.089447

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carlos Gil Turnes (orientador)

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (coorientador)

Prof. Dr. Silvia Hubner (DMVP/FV/UFPel)

Prof. Dr. Mario Carlos Araújo Meireles (DMVP/FV/UFPel)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meu irmão e minha avó, pelo apoio e incentivo não somente durante o decorrer deste trabalho, mas em todos momentos de minha vida, compreendendo minhas ausências sempre muito carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Gil Turnes, pelos ensinamentos profissionais e pessoais durante todo o período e por disponibilizar todo o necessário para que este trabalho fosse concluído.

Ao co-orientador Dr. Fábio Leivas Leite pelo convívio e acompanhamento durante diversas etapas do projeto, sempre disposto a acrescentar melhorias e resolver os problemas que surgiram durante o período.

Ao co-orientador Dr. Marcio Nunes Corrêa pelo apoio, convívio e disponibilidade durante todo o período do trabalho.

Aos colegas do laboratório de bacteriologia: Fabrício, João Rodrigo, Leandro, Luana, Lorena, Luciano, Otávio, Nice e Alceu, pela convivência e ajuda durante a execução do experimento.

Ao colega Vinícius Tabeleão, por disponibilizar sua propriedade para realização do experimento e pela convivência desde o período de graduação.

A todos integrantes do NUPEEC, pela amizade, convivência, respeito e troca de experiências profissionais e pessoais. Em especial agradeço a Elisabeth, Maikel, Sandra e Mariane, pelos meses de convívio praticamente diário, pelas experiências pessoais e profissionais que foram trocadas nesse período e principalmente pelas amizades que se formaram.

Aos colegas do CENBIOT, pelo ambiente de trabalho agradável e pelos bo momentos compartilhados.

A todos os “amigos” do Laboratório de Inspeção de Leite e Derivados, não somente aos que estão presentes hoje, mas todos que já passaram por lá e certamente continuam INSPLEITE.

Ao amigo Timm, pelo convívio, ensinamentos profissionais e pessoais, pe orientação e principalmente pela amizade e compreensão.

Agradeço a grande amiga Carina, por estar sempre disposta a ouvir, apoiar, aconselhar, dividindo comigo momentos de extrema felicidade e também aqueles de nem tanta felicidade. Querida muito obrigada por tudo!

A todos amigos que não estão citados aqui, mas que sabem que de alguma forma são fundamentais na minha vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente na execução deste trabalho.

RESUMO

ROOS, TALITA BANDEIRA, Universidade Federal de Pelotas, setembro de 2006. **EFEITO DE *Sacharomyces boulardii* E *Bacillus cereus* VAR. *toyoi* NA RESPOSTA IMUNE DE CORDEIROS VACINADOS.** Orientador: Carlos Gil Turnes. Co-orientadores: Fábio Leivas Leite e Marcio Nunes Corrêa.

Probióticos são produtos que contêm microrganismos viáveis que alteram a microbiota das mucosas e produzem efeitos benéficos à saúde. São úteis na prevenção e no tratamento de doenças, em distúrbios gastrintestinais, na inibição da carcinogênese, como promotores de crescimento constituindo-se em uma alternativa aos antibióticos e como imunomoduladores. Têm sido relatados diversos estudos sobre os efeitos dos probióticos na imunidade, ainda que os mecanismos pelos quais atuem ainda não estão bem esclarecidos. A maioria dos estudos utilizou lactobacilos ou bifidobactérias, microrganismos utilizados na alimentação humana e que apresentam restrições em sua administração na alimentação animal. *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *toyoi* são mais resistentes às condições ambientais adversas que as bactérias ácido-láticas, o que facilita seu uso na elaboração, conservação e administração de rações para uso em alimentação animal. A imunização dos animais domésticos para controlar as doenças infecciosas, iniciada há mais de um século, tem despertado novo interesse em vista das restrições impostas pelos mercados consumidores ao uso de antibióticos e outros quimioterápicos. Vacinas mais potentes e com menores efeitos colaterais foram desenvolvidas mediante a utilização de adjuvantes eficientes e antígenos purificados. Probióticos podem modular a resposta imune, potencializando as vacinas, o que abre uma nova perspectiva de sua utilização. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de dois probióticos, um elaborado em base a *Bacillus cereus* var. *toyoi* e o outro em base de *Saccharomyces boulardii*, na resposta imune de ovinos vacinados com uma bacterina de *Escherichia coli* e com uma vacina inativada contra Herpesvírus Bovino 5 (BoHV-5). Trinta animais com três meses de idade foram imunizados com uma dose de cada vacina nos dias 0 e 30 do experimento, e divididos ao acaso em três grupos de dez animais, sendo mantidos na mesma pastagem natural e suplementados com ração comercial *ad libitum*. Na ração do grupo 1 foi adicionado *Bacillus cereus* var. *toyoi* na concentração de 1×10^6 esporos viáveis gr^{-1} , na do grupo 2 *Saccharomyces boulardii* na concentração de 1×10^6 UFC gr^{-1} , e a do grupo 3 (controle) sem probióticos. Coletou-se sangue semanalmente durante oito semanas. Os títulos de anticorpos foram determinados por ELISA, utilizando como antígeno a cepa vacinal. Os títulos individuais e a média dos grupos foram transformados em soroconversões utilizando como valor 1 o da amostra do dia 0. As soroconversões mais altas contra a bacterina de *E. coli* foram 1,3 para o grupo suplementado com *B. cereus* var. *toyoi*, 1,9 no grupo que recebeu ração contendo *S. boulardii* e 0,9 para o grupo controle, todos diferentes entre si ($p < 0,05$). As soroconversões mais altas contra BoHV-5 foram 2,7 para o grupo suplementado com *B. cereus* var. *toyoi*, 1,7 no grupo que recebeu ração contendo *S. boulardii* e 1,3 para o grupo controle, todos diferentes entre si ($p < 0,05$). Os resultados indicam que *Saccharomyces boulardii* induziu maiores soroconversões contra *E. coli* e *B. cereus* var. *toyoi* induziu maiores soroconversões contra BoHV-5.

Palavras-chave: Probióticos, ruminantes, imunomodulação.

ABSTRACT

ROOS, TALITA BANDEIRA, Universidade Federal de Pelotas, setembro de 2006.
EFFECTS OF *Sacharomyces boulardii* AND *Bacillus. cereus* var. *toyoi* ON THE IMMUNE RESPONSE OF VACCINATED LAMBS. Advisor: Carlos Gil Turnes. Co-advisers: Fábio Leivas Leite e Marcio Nunes Corrêa.

Probiotics are products that contain viable microorganisms that modulate mucosal microbiota with beneficial effects on health. They are useful in the prevention and treatment of diseases, inhibit carcinogenesis, increase feed efficiency being an alternative to antibiotics, and modulate immune responses. Most of the reports on the effects of probiotics on the immune response were produced using lactobacillaceae or bifidobacteria, and although the processes involved are not completely understood, there is no doubt about their beneficial effect on humoral and cellular responses. More potent vaccines that produce less undesirable effects were developed using efficient adjuvants and purified antigens. Probiotics can potentiate the response to vaccines, opening a new perspective for their use. The objective of this work was to evaluate the effect of two probiotics, one prepared with *Bacillus cereus* var. *toyoi* and the other with *Saccharomyces boulardii*, on the immune response of lambs vaccinated against *Escherichia coli* and Bovine Herpesvirus-5. Thirty three-month old lambs were vaccinated with one dose of each vaccine on days 0 and 30 of the experiment, and randomly divided in three groups of 10 each. The animals were maintained in the same pasture and supplemented with the respective feed *ad libitum*. Feed of group 1 contained *Bacillus cereus* var. *toyoi* at a concentration of 1×10^6 viable spores gr^{-1} , and that of group 2, 1×10^6 CFU gr^{-1} of *Saccharomyces boulardii*, while group 3 received non-supplemented feed. Blood samples were obtained at weekly intervals for eight weeks. Antibody titres were determined by ELISA using vaccinal strains as antigens. Individual absorbancies and means for each group were divided by those at day 0 and expressed as seroconversions. The higher seroconversions against the *E. coli* bacterin were 1.3, 1.9 and 0.9 for the *B. cereus* var. *toyoi*, *S. boulardii* and control groups, respectively, all different among them ($p < 0,05$). The higher seroconversions against the BoHV-5 vaccine were 2.7, 1.7 and 1.3 for the *B. cereus* var. *toyoi*, *S. boulardii* and control groups, respectively, all different among them ($p < 0,05$). The results showed that *S. boulardii* induced higher seroconversions against *E. coli* and that *B. cereus* var. *toyoi* higher seroconversions against BoHV-5.

Key words: probiotics, ruminants, immunomodulation

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Artigos indexados em ISI Web of Knowledge sobre probióticos usados em ovinos.....	19
TABELA 1 Médias de soroconversão contra <i>Escherichia coli</i>	47
TABELA 2 Médias de soroconversão contra Herpesvírus Bovino.....	49

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Médias de soroconversão de ovinos vacinados com uma bacterina de *Escherichia coli* suplementados com ração contendo probiótico de *Saccharomyces boulardii*.....47

FIGURA 2 Médias de soroconversão de ovinos vacinados com uma bacterina de *Escherichia coli* suplementados com ração contendo probiótico de *Bacillus cereus* var. *toyoi*.....48

FIGURA 3 Médias de soroconversão de ovinos vacinados com vacina inativada oleosa de BoHV-5 suplementados com ração contendo probiótico de *Saccharomyces boulardii*.....49

FIGURA 4 Médias de soroconversão de ovinos vacinados com vacina inativada oleosa de BoHV-5 suplementados com ração contendo probiótico de *Bacillus cereus* var. *toyoi*.....50

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
1.0 - INTRODUÇÃO GERAL	12
2.0 – OBJETIVO	15
3.0 ARTIGO Nº 1	16
Resumo	17
Abstract.....	18
Introdução.....	19
Importância dos probióticos em face à proibição dos antibióticos	21
Probióticos usados em bovinos	23
Modo de ação dos probióticos	24
Uso de leveduras em ruminantes	26
Esporos de <i>Bacillus</i> spp.....	Erro! Indicador não definido.
Probióticos na resposta imune de ruminantes	28
Conclusões	30
Referências bibliográficas.....	30
4.0 - ARTIGO 2	43
Resumo	44
Introdução.....	45
Materiais e Métodos	47
Resultados.....	48
Discussão	52
Referências citadas	53
5.0 – CONCLUSÕES	55
6.0 - TRABALHOS FUTUROS	57
7.0 - Referências Bibliográficas	58
ANEXOS	67

1.0 - INTRODUÇÃO GERAL

A bibliografia científica disponível sobre a utilização de probióticos em ovinos ainda é escassa. Segundo a base de dados do ISI WEB of KNOWLEDGE (ISI, 2006) somente 10 trabalhos sobre uma base de 29.956.221 artigos estão indexados, nos que na maioria avaliou-se seu efeito nos índices de produção de carne, leite ou lã.

O setor de produção de carne contribui expressivamente na economia brasileira tendo em vista que o produto brasileiro tem grande aceitabilidade no exterior. No que se refere a carne de ruminantes, embora a carne bovina tem maior participação no Produto Interno Bruto que a ovina e caprina, em 2005 a criação de ovinos e caprinos teve um crescimento de 6,5%, embora a carne destas espécies represente apenas 5% do volume total produzido (NOGUEIRA & JUNIOR, 2006). Isso demonstra a tendência de crescimento do consumo no mercado interno, visto que também aumentaram as importações de carne ovina e caprina da Argentina, Nova Zelândia e Uruguai, que é o principal fornecedor, com um volume de 3.600 toneladas no ano de 2005, superando o ano de 1992 quando chegou a 2.500 toneladas (NOGUEIRA & JUNIOR, 2006). Esse crescimento tem sido justificado pela formação de associações comerciais que estão investindo no segmento através de *marketing*, treinamento, tecnologia, sanidade e outros pré-requisitos para o setor (NOGUEIRA & JUNIOR, 2006).

A criação de ovinos é encontrada em várias regiões do país, sendo animais de fácil adaptação em vários sistemas de produção. Possuem algumas características que tornam vantajosa a sua criação: produção de lã, carne e leite, além da facilidade de manejo e adaptação, quando comparado como, por exemplo, a bovinocultura (SELAIVE-VILLARROEL *et al.*, 1997; CEZAR *et al.*, 2004). Devido a seu porte pequeno e facilidade de manejo, os ovinos são também utilizados como

modelo experimental para posterior transposição de resultados a outras espécies (MIKEL *et al.*, 2004).

Técnicas de melhoramento genético, controle sanitário e programas nutricionais têm sido utilizados para tornar a produção ovina mais rentável e competitiva. Para que isso seja possível, é necessário fornecer alimentação adequada a cada categoria animal, assim atendendo suas demandas com alimentação de qualidade (TABELEÃO, 2006).

As indústrias de alimentos animais suplementam as rações com antimicrobianos em doses sub-terapêuticas, utilizados tanto como promotores de crescimento quanto para controlar doenças, embora possam deixar resíduos nos produtos obtidos desses animais. Por esse motivo alguns países tem restringido a entrada de produtos obtidos de animais nos que se tenham utilizado antibióticos no processo de criação. Os consumidores optaram por produtos com menores riscos à saúde, já que com o uso prolongado estes produtos podem induzir ao aumento de populações bacterianas resistentes, causando risco significativo à saúde animal e humana, uma vez que para combater essas bactérias teriam que se usar antibióticos mais potentes (RUSSELL & HOULIHAN, 2003).

Nos últimos anos tem aumentado a procura por uma alternativa aos antibióticos utilizados na alimentação animal, sendo os probióticos a mais plausível, com dados encorajadores em peixes, aves, suínos e bovinos. Os probióticos são utilizados na prevenção e no tratamento de doenças, na regulação da microbiota intestinal, no controle de distúrbios do metabolismo gastrintestinal, como imunomoduladores, na inibição da carcinogênese, e como promotores de crescimento. A maioria dos estudos utilizou lactobacilos ou bifidobactérias, bactérias usadas na alimentação humana e que apresentam restrições em sua comercialização e administração na alimentação animal. O uso de microorganismos não ácido-láticos como probióticos, tais como *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *toyoi*, mais resistentes às condições ambientais a que serão submetidos, justificou a utilização destas espécies no estudo objeto desta Dissertação.

Recentes pesquisas para avaliar a resposta imune de animais alimentados com dietas suplementadas com probióticos, revelaram, em sua grande maioria, os efeitos benéficos destes microorganismos ao estimularem de alguma maneira a resposta imune do hospedeiro, seja a resposta inata, a celular ou a humoral (ERICKSON & HUBBARD, 2000). Na grande maioria dos trabalhos utilizaram-se

espécies monogástricas, tais como camundongos, aves e suínos, o que indica a necessidade da avaliação dos probióticos em espécies ruminantes.

Baseado nos resultados obtidos em outras espécies formulou-se a hipótese que *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *toyo* aumentam a resposta imune humoral de cordeiros vacinados com uma bacterina de *Escherichia coli* e com uma vacina inativada contra o Herpesvírus Bovino 5 (BoHV-5).

2.0 – OBJETIVO

Avaliar a influência de *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *toyoi* na resposta imune humoral de ovinos vacinados contra *Escherichia coli* K88ab e Herpesvírus Bovino-5.

3.0 ARTIGO N° 1

Artigo a ser submetido à **Revista Ciência Rural**

PROBIÓTICOS EM OVINOS

Probiotics in ovines

Talita Bandeira Roos, Fábio Pereira Leivas Leite, Carlos Gil-Turnes

Resumo

Os probióticos são a mais promissora alternativa para substituir os antibióticos utilizados como promotores de crescimento na alimentação animal. Como consequência, aumentou o interesse pelo estudo dos efeitos dos probióticos, prebióticos e simbióticos na saúde e produção animal, principalmente os probióticos elaborados com leveduras do gênero *Saccharomyces* ou bactérias do gênero *Bacillus*, que não deixam resíduos nos alimentos de origem animal. Entre os principais mecanismos de ação dos probióticos estão a competição por sítios de ligação, produção de substâncias antibacterianas e enzimas, competição por nutrientes e estímulo ao sistema imune. Os trabalhos de validação de probióticos em ovinos são escassos, e, embora fossem relatados efeitos benéficos, os mecanismos de ação são pouco conhecidos. Cordeiros suplementados com probióticos apresentaram aumento no ganho de peso diário, na ingestão de leite e na eficiência alimentar e menor taxa de mortalidade. Ovelhas suplementadas tiveram um aumento significativo no volume de produção e no conteúdo de gordura e proteínas do leite. Vários estudos relataram os efeitos dos probióticos na imunidade, envolvendo um ou vários componentes da resposta imune, tais como imunidade inespecífica, humoral ou celular.

Abstract

Probiotics are one of the most promising alternatives to antibiotic supplementation in feedstuffs for animals. For this reason, the interest in the study of the effects of probiotics, prebiotics and symbiotics in animal health and production is constantly increasing. Probiotics prepared with yeasts or *Bacillus* are specially interesting due to their resistance during feed processing, transportation, storage and administration. Among the main mechanisms of action of the probiotics, exclusive competition, bacteriocins and enzyme production, competition for nutrients and enhancement of the immune response, were proposed. Validations of probiotics for ovines are scarce, although few reports showed their beneficial effects. Lambs fed probiotics showed lower mortality rates, and increased daily weight gain, milk consumption and feed efficiency. Probiotics also increased protein and fat concentration and the volume of milk produced by ewes.

Introdução

O termo probiótico deriva do grego e significa “pró-vida”, sendo o antônimo de antibiótico, que significa “contra a vida”, e ainda que ao longo dos anos o termo teve diferentes acepções, atualmente é utilizado para designar preparações ou produtos que contêm microorganismos viáveis definidos e em quantidade adequada, que alteram a microbiota própria das mucosas por implantação ou colonização de um sistema do hospedeiro, produzindo efeitos benéficos em sua saúde (SCHREZENMEIR & DE VRESE, 2001). Os probióticos são usados na prevenção e no tratamento de doenças, na regulação da microbiota intestinal, em distúrbios do metabolismo gastrointestinal, na inibição da carcinogênese, como imunomoduladores e como promotores de crescimento, constituindo-se em uma alternativa aos antibióticos (GOMES & MALCAT, 2006).

Uma das mais promissoras áreas de desenvolvimento de alimentos funcionais tem sido o uso de probióticos e prebióticos devido a seu papel na saúde (ERICKSON & HUBBARD, 2000). Diversos autores relatam que a longevidade da população da Bulgária estaria associada ao alto consumo de produtos lácteos fermentados e que os *Lactobacillus* presentes neles previnem doenças causadas por patógenos intestinais (YOON & STERN, 1995). A maioria das informações sobre a influência dos probióticos na imunidade foi obtida com a utilização de lactobacilos ou bifidobactérias, bactérias utilizadas na alimentação humana e que são difíceis de armazenar e administrar a animais. *Bacillus cereus* var. *toyoi*, pelo contrário, resiste às condições ambientais o que facilita seu uso na elaboração, conservação e administração de rações para animais (GIL-TURNES et al., 1999).

A imunização dos animais domésticos para controlar as doenças infecciosas, iniciada há mais de um século, tem despertado novo interesse em vista das restrições impostas pelos mercados consumidores ao uso de antibióticos e outros quimioterápicos, tanto para uso terapêutico, para a prevenção das doenças ou para incrementar a eficiência alimentar. Alguns

probióticos modulam a resposta imune, potencializando as vacinas, o que abre uma nova perspectiva de sua utilização (ÁVILA et al, 2000).

A bibliografia científica disponível sobre a utilização de probióticos em ovinos ainda é escassa. Segundo a base de dados do ISI WEB of KNOWLEDGE (ISI, 2006) somente 10 trabalhos sobre uma base de 29.956.221 artigos estão indexados, nos que na maioria avaliou-se seu efeito nos índices de produção de carne, leite ou lã.

Tabela 1: ARTIGOS INDEXADOS EM ISI WEB OF KNOWLEDGE SOBRE

Autores	Revista	Ano de publicação
JONECOVA, Z. et al	Zivocisna Vyroba	1992
NEWBOLD, C. J. et al	Journal of Animal Science	1995
MATHIEU, F. et al	Reproduction Nutrition Development	1996
JOUANY, J. P. et al	Animal Feed Science and Technology	1998a
JOUANY, J. P. et al	Reproduction Nutrition Development	1998b
CORONA, L. et al	Small Ruminant Research	1999
ARCOS-GARCIA, J. L. et al	Livestock Production Science	2000
MWENYA, B. et al	Animal Feed Science and Technology	2004
FLORES, M. et al	Cuban Journal of Agricult. Science	2005
KRITAS, S. K. et al	Journal of Veterinary Medicine S. B	2006

Termos de indexação: probiotic for sheep

IMPORTÂNCIA DOS PROBIÓTICOS EM FACE À PROIBIÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS

A partir dos resultados do Comitê Swann (SWANN COMMITTEE, 1969), que alertou para os riscos da utilização de antibióticos em doses subterapêuticas, a utilização indiscriminada de antibióticos foi questionada, concluindo na sua proibição pela União Européia a partir de 2006 (COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION, 2003). Embora o uso de aditivos na alimentação animal na Europa fosse normatizado desde 1970 (Directive 70/524/EEC), adaptada em 1994 ao incluir-se alguns microorganismos e enzimas (Directive 94/40/EC) (ROSEN, 1996), a pecuária tem sido, a partir de 1997, logo após os humanos, o maior consumidor de antibióticos na Europa, devido tanto à suplementação de rações animais como com finalidade terapêutica (HONG et al., 2005).

Face à nova situação referente ao uso de antibióticos, a alternativa mais promissora para sua substituição são os probióticos. Probióticos elaborados com leveduras do gênero *Saccharomyces* ou bactérias do gênero *Bacillus*, entre outros, que não deixam resíduos nos alimentos de origem animal, são utilizados desde há décadas visando a substituição dos antibióticos (KREHBIEL *et al.*, 2003; COPPOLA & GIL-TURNES, 2004). Como resultado, aumentou o interesse pelo estudo dos efeitos dos probióticos, prebióticos e simbióticos na saúde e produção animal (KREHBIEL et al., 2003), assim como o interesse na fabricação e utilização de vacinas mais eficientes (HONG et al., 2005).

PROBIÓTICOS USADOS EM OVINOS

Ovinos são criados tanto em regiões frias, temperadas, subtropicais quanto tropicais, devido a sua adaptação em vários sistemas de produção. Possuem características que tornam vantajosa sua criação, tais como produção de lã, carne e leite, além da facilidade de manejo e adaptação a diferentes condições ecológicas, quando comparados com os bovinos (SELAIVE-

VILLARROEL *et al.*, 1997; CEZAR *et al.*, 2004). O porte pequeno facilita sua utilização como modelo na experimentação e posterior transposição a outras espécies (MIKEL *et al.*, 2004).

Nutricionistas e microbiologistas têm mostrado interesse na manipulação da microbiota ruminal para melhorar a eficiência produtiva nessas espécies (MARTIN & NISBET, 1992). Inicialmente os microorganismos utilizados na alimentação animal foram espécies de *Lactobacillus* (STERN & STORRS, 1975), seguido por *Enterococcus*, *Pediococcus* e *Bacillus*, além de algumas espécies de leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *S. boulardii* (GUILLOT, 1998; THOMKE & ELWINGER, 1998). Embora a maioria dos experimentos utilizando alimentos que contenham microorganismos viáveis, bactérias ou leveduras, apresentem resultados positivos, os mecanismos de ação envolvidos não estão elucidados. A partir do conhecimento do modo de ação dos probióticos poder-se-á selecionar microorganismos mais apropriados para as dietas de ruminantes (KREHBIEL *et al.*, 2003).

Embora sejam escassos os trabalhos de validação de probióticos em ovinos, algumas pesquisas mostraram efeitos benéficos. Cordeiros suplementados com probióticos da primeira até a quinta semana de vida tiveram uma redução no índice de diarreia e maior desenvolvimento (LEMA *et al.*, 2001; BRASHEARS *et al.*, 2003), enquanto o probiótico *PIONEER PDFM*® incrementou o ganho de peso diário, a ingestão de leite e a conversão alimentar (ANTUNOVIC *et al.*, 2005). Ovinos suplementados com *Bacillus licheniformis* e *B. subtilis* apresentaram aumento da produção e no conteúdo de gordura e proteínas do leite, e menor taxa de mortalidade nos cordeiros (KRITAS *et al.*, 2006).

TABELEÃO *et al.* (2005) comunicaram que as concentrações de glicose sanguínea, triacilglicerol e colesterol não foram diferentes ($p>0,05$) em cordeiros suplementados com *B. cereus* var. *toyoi*, *S. boulardii*, Monensina e nos controles. No entanto, as concentrações de

uréia foram maiores ($p < 0,05$) nos ovinos suplementados com *B. cereus* var. *toyoi*, diferindo dos demais, exceto dos que receberam Monensina, concluindo que a utilização de probióticos na alimentação de ruminantes foi eficiente, visto que as alterações ruminais não foram expressivas e as metabólicas foram benéficas, além de não deixarem resíduos na carcaça.

PROBIÓTICOS USADOS EM BOVINOS

Pesquisas realizadas em gado de leite com *Saccharomyces cerevisiae* demonstraram que a digestibilidade de proteína bruta e hemicelulose aumentaram em vacas não lactantes, no entanto a digestibilidade da matéria seca e fibra detergente ácida permaneceu inalterada (WIEDMEIER et al., 1987). Culturas de *Lactobacillus* utilizadas em substituição aos antibióticos na ração de vacas de leite no pré-parto, aumentaram a produção de leite e o ganho de peso em gado de corte (GOMEZ-ALARCON et al., 1990). *Aspergillus oryzae* adicionado à ração aumentou a digestibilidade no rúmen e no trato digestivo total, não sendo afetadas a concentração de ácidos graxos voláteis e amônia (GOMEZ-ALARCON et al., 1990), assim como a produção diária de leite (GOMEZ-ALARCON et al., 1991), resultados similares os de KELLEMS et al. (1990).

ROTH & KIRSCHGESSNER (1988) comprovaram que terneiros que receberam ração contendo *B. cereus* var. *toyoi* na concentração de 1×10^9 esporos viáveis por kg aumentaram o ganho de peso em 3,9 % e a conversão alimentar em 3,2 %. GRITZER e LEITGEB (1998), pelo contrario, observaram que touros da raça Simenthal suplementados com *B. cereus* var. *toyoi*, Monensina ou *Lactobacillus* não mostraram diferenças significativas no ganho de peso diário, eficiência energética, peso ao abate, terminação de carcaça e nem nos parâmetros de qualidade da carne (maciez e sabor), embora o grupo suplementado apresentou melhor performance.

MODO DE AÇÃO DOS PROBIÓTICOS

Os mecanismos envolvidos na resposta aos probióticos em ruminantes são pouco esclarecidos, embora os numerosos trabalhos realizados para esclarecer o modo de ação dos probióticos em monogástricos (HOLZAPFEL *et al.*, 1998). Os probióticos podem atuar modificando o equilíbrio dos microorganismos intestinais, aderindo-se à mucosa intestinal e assim prevenindo a aderência e ativação dos patógenos, influenciando a permeabilidade intestinal e modulando respostas do sistema imune (SALIMEN *et al.*, 1996). Algumas espécies secretam metabólitos que estimulam outras bactérias benéficas aos ruminantes (KAMEL *et al.*, 2004; MWENYA *et al.*, 2004), entanto alguns trabalhos relatam ainda aumento na produção de ácidos graxos voláteis, precursores de compostos energéticos (ENJALBERT *et al.*, 1999).

Os probióticos podem competir pelos sítios de ligação com os patógenos (JONES & RUTTER, 1972), processo denominado exclusão competitiva (NURNI & RANTALA, 1973). A ligação poderia dever-se a mediadores não específicos, específicos ou a fatores físico-químicos (HOLZAPFEL *et al.*, 1998). A capacidade de aderência da bactéria à parede intestinal parece depender da interação entre mucopolissacarídeos da parede das células intestinais e carboidratos presentes na parede bacteriana (FULLER & BROOKER, 1974). As fimbrias são os elementos de aderência bacteriana mais conhecidos e estudados, representando fatores importantes para essa adesão (FULLER & BROOKER, 1980). Seus receptores são específicos e diferem de espécie para espécie e também entre os diferentes locais ao longo do trato intestinal (LODDI, 2006).

As bactérias da microbiota intestinal, assim como os probióticos, podem produzir e liberar compostos tais como bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio, que tem ação antibacteriana. Ainda não deve ser descartada a possibilidade que todas essas

substâncias possam atuar em associação, não somente entre si, mas também como bloqueio físico (LODDI, 2006). Algumas bactérias secretam enzimas com a β -glucoronidase e hidrolases de sais biliares com ação inibitória sobre as outras bactérias (JIN et al., 1997).

Várias espécies de *Lactobacillus* demonstraram atividade inibitória de patógenos, entre elas *Lactobacillus acidophilus* que inibiu patógenos entéricos tais como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens* (GILLILAND & SPECK, 1977). MANN et al. (1980) comprovaram que cordeiros inoculados com *E. coli* e suplementados com *Lactobacillus* toleraram a presença do patógeno sem causar doença nos animais.

A competição entre as bactérias intestinais pelos nutrientes disponíveis na luz intestinal é um fator limitante para sua sobrevivência nesse ambiente. Os probióticos também se nutrem de ingredientes que foram parcialmente degradados pelas enzimas digestivas, estabelecendo-se assim uma competição entre os probióticos e as bactérias intestinais pelos nutrientes (LODDI, 2006).

Vários estudos têm relatado os efeitos dos probióticos na imunidade, ainda que os mecanismos pelos quais isto ocorre não estão bem esclarecidos. Eles podem envolver um ou vários componentes da resposta imune, tais como imunidade não específica, humoral ou celular (ERICKSON & HUBBARD, 2000).

Alguns gêneros de bactérias intestinais, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* estimulam a resposta imune por aumento da produção de anticorpos, ativação de macrófagos, proliferação de células T e produção de interferon (FULLER & GIBSON, 1997). Algumas possuem propriedades adjuvantes estimulando a resposta anticorpo específica após a vacinação (KREHBIEL et al., 2003).

Pesquisas em animais demonstraram que o efeito na fagocitose depende do microorganismo utilizado (HERICH & LEVKUT, 2002). A administração de bactérias ácido-

láticas produziu melhora na atividade de macrófagos peritoniais e pulmonares, e leucócitos sanguíneos (de PETRINO et al., 1995).

USO DE LEVEDURAS EM RUMINANTES

O efeito mais consistente como resposta à suplementação com leveduras tais como *Saccharomyces cerevisiae* parece ser o aumento do número de bactérias totais no rúmen (NEWBOLD, 1996), ainda que este efeito dependa da levedura utilizada. Também foi evidenciado aumento do número de protozoários ruminais após a ingestão dessa levedura (MIRANDA et al., 1996), assim como o aumento de proteínas de origem microbiana no rúmen e aumento da concentração de aminoácidos no intestino delgado (ERASMUS et al., 1992).

GIVER-REVERDIN et al. (1996) relataram que cabras suplementadas com leveduras conseguiram corrigir o nível de gordura no leite, mesmo recebendo uma dieta com baixo nível protéico. Ainda que não tem sido explicado como pequenas quantidades de leveduras adicionadas à ração podem estimular os microorganismos ruminais, foi demonstrado que elas fornecem vitaminas (principalmente tiamina) para suporte e crescimento de fungos no rúmen (CHAUCHEYRAS et al., 1995). A microbiota e microfauna ruminais são estritamente anaeróbicas, ainda que suportam as pequenas quantidades de oxigênio que são ingeridas durante a deglutição junto com o alimento e com a saliva. O aumento do potencial redox observado em ovelhas após a alimentação pode dever-se ao oxigênio ingerido com o alimento, mastigação e ingestão de água (MATHIEU et al., 1996). A propriedade das cepas de *S. cerevisiae* estimularem o aumento do número de bactérias viáveis no rúmen parece estar relacionada com o consumo do oxigênio do fluido ruminal, uma vez que cepas mutantes com capacidade oxidante reduzida produzem um estímulo menor (NEWBOLD et al., 1996).

ESPOROS DE *Bacillus* sp. EM RUMINANTES

Estudos em humanos e modelos animais demonstraram que esporos administrados por via oral estimulam o sistema imune, já que se detectaram IgG antiespоро em níveis significantes, após sua administração. Logo após a ingestão uma pequena proporção de esporos consegue se disseminar e chegar aos tecidos linfóides secundários, como placas de Peyer e linfonodos mesentéricos (DUC et al., 2003), que após fagocitados germinam e expressam genes (DUC et al., 2004). IgG anti-esporo e IgA são produzidas por um processo normal de produção de anticorpos pelas células B (BALLOUL et al., 1987; ROBINSON et al., 1997). Interferon γ (INF γ) é um efector da resposta celular e pode ser produzido por uma resposta imune inata que inclui as células NK (*Natural Killer*). Foi demonstrado que a administração oral de *B. subtilis* leva a uma rápida indução da produção de interferon por células mononucleares do sangue periférico, o que estimula a atividade dos macrófagos e das células NK (KOSAK et al., 1998).

Várias espécies de *Bacillus* produzem um grande número de antimicrobianos (UDARCI & PINCHUK, 2004), tais como bacteriocinas, substâncias inibitórias semelhantes as bacteriocinas e enzimas, ativos contra uma gama de bactérias patogênicas intestinais (HONG et al., 2005). O efeito desses antimicrobianos *in vivo* não está claro, mas pode-se admitir que os efeitos *in vitro*, citados anteriormente, podem ser semelhantes aos efeitos no trato gastrointestinal do hospedeiro (HOSOI et al., 1999).

A influência dos probióticos sobre a microbiota intestinal depende de vários fatores, que podem afetar a sobrevivência dos microorganismos benéficos assim como a secreção de antimicrobianos (HONG et al., 2005). Diversos mecanismos foram propostos para explicar a exclusão competitiva, incluindo a competição por receptores na parede intestinal, secreção de antimicrobianos, produção de ácidos graxos voláteis, competição por nutrientes e estímulo das funções imunes (ENDO et al., 1999). Algumas espécies de *Bacillus* demonstraram “*in vitro*”

converter componentes tóxicos em produtos não reativos o que também foi proposto como um mecanismo que o probiótico pode desenvolver no intestino (CALDINI et al., 2002).

PROBIÓTICOS NA RESPOSTA IMUNE DE RUMINANTES

Embora sejam escassas as pesquisas sobre o efeito de probióticos na imunidade de ruminantes, vários estudos relataram seus efeitos na imunidade de outras espécies, embora os processos envolvidos ainda não sejam bem esclarecidos, podendo envolver um ou vários componentes da resposta imune (ERICKSON & HUBBARD, 2000). Os efeitos sobre a fagocitose dependem do microorganismo utilizado (HERICH & LEVKUT, 2002).

Bactérias ácido-láticas apresentam atividade imunomoduladora comprovada em monogástricos. ÁVILA et al. (1998) demonstraram que leitões imunizados com vacina de *E. coli* enterotoxigênica, suplementados com *L. acidophilus*, tiveram uma melhor resposta imune. YASUI et al. (1999) demonstraram que a administração de *Bifidobacterium breve* estimulou o sistema imune humoral em camundongos, provocando aumento da produção de IgA anti-Rotavírus e de IgG antivírus da Influenza. NICOLI & VIEIRA (2000) demonstraram que camundongos livres de germes que receberam *Lactobacillus acidophilus* ou *Saccharomyces boulardii* combateram com maior eficácia uma septicemia provocada por *E. coli* patogênica, comparado com animais não tratados com probióticos, e que camundongos com microbiota normal, tratados diariamente com *Lactobacillus acidophilus* ou *Saccharomyces boulardii*, mostraram-se mais resistentes a patógenos intestinais tais como *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae* e *Shigella flexneri*. Leitões tratados com *B. lactis* reduziram os índices de diarreia associada a Rotavírus e *E. coli*, paralelamente ao aumento de títulos de anticorpos contra esses patógenos no trato gastrointestinal, da concentração de neutrófilos sanguíneos e da resposta proliferativa dos linfócitos T (SHU et al., 2001).

A administração de bactérias ácido lácticas produziu uma melhora na atividade de macrófagos peritoniais e pulmonares e leucócitos sanguíneos (de PETRINO et al., 1995). A administração oral de *Lactobacillus casei* demonstrou proteção contra patógenos intestinais devido à estimulação da capacidade fagocítica dos macrófagos peritoniais e da atividade das enzimas envolvidas na fagocitose (PERDIGÓN & ALVAREZ, 1992), além da estimulação da atividade das células *Natural Killer* (KATO et al, 1984). Pesquisas realizadas com o mesmo lactobacilo demonstraram aumento significativo da quantidade de IgA em resposta à infecção por *Salmonella typhimurium* (PERDIGÓN et al.,1991). MATSUZAKI (2000) demonstrou um aumento significativo da atividade das células *Natural Killer* do baço de camundongos alimentados com *Lactobacillus casei* cepa Shirota, o que confirma que a administração deste probiótico melhora a resposta imune inata.

Poucos trabalhos relatam estudos da influencia de probióticos não pertencentes às bactérias ácido-lácticas na imunidade. COPPOLA et al. (2003) estudaram o efeito de *Bacillus cereus* var. *toyoi* e *Saccharomyces boulardii* na resposta imune de camundongos vacinados com uma bacterina de *E. coli* e uma vacina replicante contra Parvovírus canino, comprovando que *S. boulardii* induziu uma resposta humoral significativamente mais alta à bacterina, enquanto o *B. cereus* var. *toyoi* induziu uma resposta significativamente mais alta à vacina de Parvovírus canino. Também detectaram que os esplenocitos de camundongos suplementados com *S. boulardii* produziram IL-4 quando estimulados com fimbrias purificadas de *E.coli*.

ROOS et al. (2006) estudaram o efeito do probiótico a base de *Sacharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *toyoi* em camundongos vacinados com antígeno viral e bacteriano, observaram que o *Sacharomyces boulardii* aumentou a resposta imune humoral a ambos antígenos tanto com o adjuvante de Hidróxido de Alumínio como com adjuvante oleoso, enquanto *Bacillus cereus* var. *toyoi* induziu resposta humoral similar a *S. boulardii* contra BoHV-5 na vacina contendo Hidróxido de Alumínio.

ROOS et al. (2005a) estudaram o efeito de *Bacillus cereus* var. *toyoi* e *Saccharomyces boulardii* adicionados à alimentação de ovinos vacinados contra Herpes Vírus Bovino tipo V, comprovando que ambos grupos apresentaram médias de soroconversão significativamente ($p < 0.05$) maiores que as do grupo controle. Em ovinos vacinados com uma bacterina monovalente de *Escherichia coli* as médias de soroconversão foram maiores para o grupo que recebeu ração contendo *S. boulardii*, seguido pelo grupo suplementado com *B. cereus* var. *toyoi*, e pelo grupo controle ($p < 0.05$), sugerindo que, assim como foi comprovado em animais monogástricos, ambos probióticos exerceram um efeito imunoestimulante também em ovinos (ROOS et al. 2005b).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos até agora demonstraram que várias bactérias e leveduras possuem capacidade probiótica em ruminantes, atuando como promotores de crescimento, reguladores da microbiota intestinal e imunomoduladores, embora a forma de ação não esteja esclarecida.

A suplementação com probióticos é uma alternativa para a substituição dos antibióticos utilizados na alimentação de ruminantes, já que, embora os trabalhos realizados são escassos, os resultados promissores obtidos justificam o aprofundamento nos estudos dessa área.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNOVIC, Z. et al. Influence of feeding the probiotic pioneer PDFM® to growing lambs on performances and blood composition. **Acta Veterinaria (Beograd)**, v. 55, n. 4, p. 287-300, 2005.

ARCOS-GARCIA, J. L. et al. Effect of two commercial yeast cultures with *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal fermentation and digestion in sheep fed sugar cane tops. **Livestock Production Science**, v. 63, p. 153-157, 2000.

ÁVILA, F. A. et al. Use of vaccine and probiotic in the control of swine diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 50, p. 505- 511, 1998.

ÁVILA, F. A. et al. Avaliação da eficiência de um probiótico no controle de diarréia e no ganho de peso de bezerros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, p. 41-46, 2000.

BRASHEARS, M. M. et al. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and performance by feedlot cattle given *Lactobacillus* direct-fed microbials. **Journal of Food Protection**, v.66, p. 748–754, 2003.

CALDINI, G. et al. Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide genotoxicity by *Bacillus* strains. **Research in Microbiology**, v. 153, p. 165-171, 2002.

CEZAR, M. F. et al. Avaliação de parâmetros fisiológicos de ovinos Dorper, Santa Inês e seus mestiços perante condições climáticas do trópico semi-árido nordestino. **Ciência Agrotécnica de Lavras**, v. 28, n. 3, p. 614-620, 2004.

CHAUCHEYRAS, F. et al. Effects of live *Saccharomyces cerevisiae* cells on zoospore germination, growth and cellulolytic activity of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* MHC3. **Current Microbiology**, v. 31, p. 201-205, 1995.

COPPOLA, M. M.; CONCEIÇÃO, F. R.; GIL-TURNES, C. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. toyoi on the humoral and cellular response of mice to vaccines. **Food and Agricultural Immunology**, Basingstoke, v. 16, n. 3, p. 213-219, 2005.

COPPOLA, M. M.; GIL-TURNES C. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.

CORONA, L. et al. Evaluation of two yeast cultures (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal fermentation and digestion in sheep fed a corn stover diet. **Small Ruminant Research**, v.31, p.209-214, 1999.

COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. **Council regulation on the authorization of the additive avilamycin in feedingstuffs**. Disponível em:

[http://www.wetgiw.gov.pl/inspekcja_weterynaryjna/FUS/Srodki_z_zwierzat/dodatki_paszowe/COUNCIL%20REGULATION%20\(EC\)%20No%20355%202003.pdf](http://www.wetgiw.gov.pl/inspekcja_weterynaryjna/FUS/Srodki_z_zwierzat/dodatki_paszowe/COUNCIL%20REGULATION%20(EC)%20No%20355%202003.pdf) Acesso em: 14 set. 2006.

DE PETRINO, S. F. et al. Protective ability of certain lactic acid bacteria against an infection with *Candida albicans* in a mouse immunosuppression model by corticoid. **Food and Agricultural Immunology**, v. 7, p. 365-373, 1995.

DONOVAN, D. C. et al. Growth and health of Holstein calves fed milk replacers supplemented with antibiotics or Enteroguard. **Journal of Dairy Science**, v.85, p. 947–950, 2002.

DUC, L. H. et al. Germination of the spore in the gastrointestinal tract provides a novel route for heterologous antigen presentation. **Vaccine**, v. 21, p. 4215-4224, 2003.

DUC, L. H. et al. Bacterial spores as vaccine vehicles. **Infection and Immunity**, v. 22, p. 2810-2518, 2003.

DUC, L. H. et al. Intracellular fate and immunogenicity of *B. subtilis* spores. **Vaccine**, v. 22, p. 1873-1885, 2004.

ENDO, T. et al. Effects of a probiotic on the lipid metabolism of cocks fed on a cholesterol-enriched diet. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 133, p. 1569-1575, 1999.

ENJALBERT, F. et al. Effects of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal digestion in non-lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 76 p. 195-206, 1999.

ERASMUS, L. J.; BOTHA, P. M.; KISTNER, A. Effect of yeast culture supplementation on production, rumen fermentation and duodenal nitrogen flow in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 3056-3065, 1992.

ERIKSON, L. K.; HUBBARD, E. N. Probiotic immunomodulation in health and disease. **Journal of Nutrition**, 130, p. 403-109, 2000.

FLORES, M. et al. Microbial culture on coconut meal and their effects on the productive behavior of feedlot lambs. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v. 39, p. 169-174, 2005.

FULLER, R.; BROOKER, B. E. Lactobacilli which attach to the crop epithelium of the fowl. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 27, p. 1305-1312, 1974.

FULLER, R.; BROOKER, B. E. The attachment of bacteria to the squamous epithelial cells and its importance in the microecology of the small intestine. **Microbial Adhesion to Surfaces**. R. C. W. Berkley, ed., Ellis Horwood, Chichester, U. K., p. 495-507, 1980.

FULLER, R.; GIBSON, G. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 222, p. 28-31, 1997.

GIL-TURNES, C. et al. Properties of the *Bacillus cereus* strain used in probiotic CenBiot. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 11-14, 1999.

GILLILAND, S. E.; SPEECK, M. L. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and food-borne pathogens in associative cultures. **Journal of Food Protection**, v. 40, p. 820-823, 1977.

GIGER-REVERDIN, S. et al. Effects of probiotic yeast in lactating ruminants: Interaction with dietary nitrogen level. **Animal Feed Science and Technology**, v. 63, p. 149-162, 1996.

GOMES, A. M. P.; MALCAT, F.X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos e aplicações tecnológicas. **Biotechnologia alimentar, Escola Superior de Biotechnologia, Universidade Católica Portuguesa**, p.12-22 Disponível em: http://dequim.ist.utl.pt/bbio/64/pdf/agentes_probioticos_em_alimentos.pdf Acesso em: 14 set. 2006.

GOMEZ-ALARCON, R. A. et al. Influence of cultures of *Aspergillus oryzae* on rumen and total tract digestibility of dietary components. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 703, 1990.

GOMEZ-ALARCON, R. A. et al. Influence of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the milk yields, eating patterns, and body temperatures of lactating cows. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 1733, 1991.

GRITZER, K.; LEITGEB, K. Evaluation of the effectiveness of antibiotic and probiotic growth promoters on the performance of fattening bulls. **Bodenkultur**, v.49, p. 51-59, 1998.

GUILLOT, J. F. Les probiotiques en alimentation animale. **Cahiers d'Agriculture**, v. 7, p. 49-54, 1998.

HERICH, R.; LEVKUT, M. Lactic acid bacteria, probiotic and immune system, **Veterinarni Medicina**, Praga, v.47, p.169-180, 2002.

HOLZAPFEL, W. H. et al. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 85-101, 1998.

HONG, H. A.; et al. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 813 – 835, 2005.

JIN, L. Z. et al. Probiotics in poultry: modes of action. **World Poultry Science Journal**, v. 53, p. 351-368, 1997.

JONECOVA, Z. et al. The effect of yeast-cells and *Lactobacillus* administration on the sheep rumen fermentation. **Zivocisna Výroba**, Rep. Checa, v. 37, p. 771-776, 1992.

JONES, G. W.; RUTTER, I. M. Role of K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by *Escherichia coli* in piglets. **Infection and Immunity**, v. 6, p. 918-927, 1972.

JOUANY, J. P. et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on the digestion of nitrogen in the rumen of defaunated and refaunated sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 75, p. 1-13, 1998a.

JOUANY, J. P. et al. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on the digestion of the cell wall fraction of a mixed diet in defaunated and refaunated sheep rumen. **Reproduction Nutrition Development**, v. 38, p. 401-416, 1998b.

KAMEL, H. E. M. et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* on the synchronization of organic matter and nitrogen degradation kinetics and microbial nitrogen synthesis in sheep fed Berseem hay (*Trifolium alexandrinum*). **Small Ruminant Research**, v. 52, p. 211-216, 2004.

KATO, I. et al. Augmentation of mouse natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* and its surface antigens. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v.28, n.2, p.209-217, 1984.

KELLEMS, R. O. et al. Effect of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation extract or *Aspergillus oryzae* plus yeast culture plus mineral and vitamin supplement on performance of Holstein cows during a complete lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 2922, 1990.

KOSAK, T. et al. Effect of *Bacillus subtilis* spore administration on activation of macrophages and natural killer cells in mice. **Veterinary Microbiology**, v. 60, p. 215-225, 1998.

KREHBIEL, C. R.; et al. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. **Journal of Animal Science**, v.81, supplement 2, p. E120-E132, 2003.

KRITAS, S. K. et al. Effect of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* supplementation of ewe's feed on sheep milk production and young lamb mortality. **Journal of Veterinary Medicine**, v.53 , p.170–173, 2006.

LEMA, M. et al. Reduction of fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in lambs by feeding microbial feed supplement. **Small Ruminant Research**, v.39, p. 31–39, 2001.

LODDI, M. M. Probióticos e prebióticos na nutrição de aves. Disponível em: <http://www.adip.com.br/ftp/Probprebaves.doc> Acesso em: 30 agosto de 2006.

MANN, S. O. et al. Interactions of *E. coli* and lactobacilli in gnotobiotic lambs. **Microbios Letters**, Cambridge, v. 15, p. 141-144, 1980.

MARTIN, S. A.; NISBET D. J. Effect of direct-fed microbials on rumen. In: Symposium: Direct-fed microbials and rumen fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 1736-1744, 1992.

MATHIEU, F. et al. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep; protozoal and probiotic interactions. **Reproduction Nutrition Development**, v.36, p. 271-287, 1996.

MATSUZAKI, T.; CHIN, J. Modulating immune responses with probiotic bacteria. **Immunology and Cell Biology**, v.78, p. 67-73, 2000.

MIKEL, A. et al. The role of sex steroid receptors in sheep female reproductive physiology. **Reproduction Fertility and Development**, v. 16, p. 385-394, 2004.

MIRANDA, R. L. A. et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae* cultures and NDF level on parameters of ruminal fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 63, p. 289-296, 1996.

MWENYA, B. et al. Effect of including β 1-4 galacto-oligosaccharides, lactic acid bacteria or yeast culture on methanogenesis as well as energy and nitrogen metabolism in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 115, p. 313-326, 2004.

NEWBOLD, C. J. et al. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers *in-vitro* and in sheep. **Journal of Animal Science**, v. 73, p.1811-1818, 1995.

NEWBOLD, C. J. Probiotics for ruminants. **Annales de Zootechnie**, n. 45, p. 329-335, 1996.

NICOLI, J. R.; VIEIRA, L.Q. Prebióticos e Probióticos, **Ciência Hoje**, v.28, n. 163, p.34-38, 2000.

NURNI, E.; RANTALA, M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. **Nature**, v. 241, p. 210-211, 1973.

PERDIGÓN, G.; ALVAREZ, S. Probiotics and the immune state. In: FULLER, R., ed. **Probiotics: the scientific basis**. London: Chapman and Hall, p.145-180, 1992.

ROOS, T. B. et al. Efeito de probióticos de *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *toyoi* na resposta imune de cordeiros a uma vacina contra Herpes Vírus Bovino. In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2005, Santos. **Anais...** Santos: Mendes Convention Center, Santos, S. P., 2005a. p. 216.

ROOS, T. B. et al. Efeito de probióticos de *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *toyoi* na resposta imune de cordeiros a uma bacterina de *Escherichia coli*. In: XIV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, VII ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2005, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2005b.

ROOS, T. B. et al. Efeito de *Bacillus cereus* var *toyoi* e *Saccharomyces boulardii* na resposta humoral de camundongos a dois antígenos com diferentes adjuvantes. In: XVII CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2006, Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 2006.

ROTH, F. X.; KIRCHGESSNER, M. Nutritive wirksamkeit von Toyocerin. 2 Kalbermast. **Landwirtschaftliche-Forschung**, Frankfurt, v. 41, n. 1-2, p. 63-70, 1998.

ROSEN, D. Feed additive nomenclature. **World Poultry Science Journal**, v. 52, p. 53-57, 1996.

SALIMEN, S. et al. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. **Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology**, v. 70, p. 347-358, 1996.

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

SELAIVE-VILLARROEL, A. B.; SILVEIRA, V. C. P.; OLIVEIRA, N. M. Desenvolvimento e produção de carne de ovinos Corriedale abatidos com diferentes idades sobre pastagem natural ou artificial. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 3, n. 3, p. 111-118, 1997.

SHU, Q. et al. Probiotic treatment using *Bifidobacterium lactis* HNO19 reduces weanling diarrhea associated with rotavirus and *Escherichia coli* infection in a piglet model. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v. 33, n. 2, p. 171-177, 2001.

STERN, R. M.; STORRS, A. B. The rationale of *Lactobacillus acidophilus* in feeding programs for livestock. **Proc. 36th Minnesota Nutrition Confederation**, Bloomington, p.191, 1975.

SWANN COMMITTEE BVA and RCVS evidence to the Swann Committee. **The Veterinary Record**, jan. 25, p. 91-92, 1969.

TABELEÃO, V. C. et al. Efeito de probiótico no metabolismo energético de cordeiros semiconfinados. In: XIV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, VII ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2005, Pelotas. **Anais...**Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2005.

THOMKE, S.; ELWINGER, K. Growth promotants in feeding pigs and poultry. III Alternatives to antibiotic growth promotants. **Annales de Zootechnie**, v. 4, p. 245-271, 1998.

UDARCI, M. C.; PINCHUK, I. Antimicrobial activity of *Bacillus* probiotics. In: Bacterial spore formers: probiotics and emerging applications, Ricca, E., Henriques, A. O. and Cutting, S. M., eds., **Horizon Bioscience**, p. 171-187, 2004.

YASUI, H. et al. Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, Dordrecht, v. 76, n. 1, p. 383-389, 1999.

YOON, I. K.; STERN, M. D. Influence of direct-fed microbials on ruminal microbial fermentation and performance of ruminants: A review. **Journal of Animal Science**, v. 8, p. 533- 555, 1995.

WIEDMEIER, R. D. et al. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 2063, 1987.

4.0 - ARTIGO 2

Este trabalho será submetido a **Food and Agricultural Immunology**

Efeito de *Sacharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *toyoi* na resposta imune de cordeiros à vacinas

ROOS, Talita Bandeira, SCHWEGLER, Elisabeth, MOURA, Sandra Vieira, WEISER, Mariane Aline, GOULART, Maikel Alan, TABELEÃO, Vinicius Coitinho, RODRIGUES, Cleonice Pereira, CORRÊA, Marcio Nunes, GIL-TURNES, Carlos

Efeito de *Sacharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. toyoi na resposta imune de cordeiros à vacinas

Resumo

Saccharomyces boulardii e *Bacillus cereus* var. toyoi são dois probióticos utilizados em produção animal que demonstraram efeito imunomodulador em suínos e camundongos. Os efeitos dos probióticos na imunidade de ruminantes, porém, foram pouco estudados. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de dois probióticos, um elaborado em base a *Bacillus cereus* var. toyoi e o outro em base a *Saccharomyces boulardii*, na resposta imune de ovinos a vacinas para *Escherichia coli* K88ab e Herpesvírus Bovino tipo 5 (BoHV-5). Trinta animais com três meses de idade foram imunizados com uma dose de vacina inativada contra cada uma das vacinas nos dias 0 e 30 do experimento, e divididos ao acaso em três grupos de dez animais, sendo mantidos na mesma pastagem natural e suplementados com ração comercial *ad libitum*. Na ração do grupo 1 foi adicionado *Bacillus cereus* var. toyoi na concentração de 1×10^6 esporos viáveis gr^{-1} , na do grupo 2 *Saccharomyces boulardii* na concentração de 1×10^6 UFC gr^{-1} , e a do grupo 3 (controle) sem probióticos. Coletou-se sangue semanalmente durante oito semanas. Os títulos de anticorpos foram determinados por ELISA, utilizando como antígeno a cepa vacinal respectiva, e transformados em conversões. As soroconversões mais altas contra a bacterina de *E. coli* foram 1,3 para o grupo suplementado com *B. cereus* var. toyoi, 1,9 no grupo que recebeu ração contendo *S. boulardii* e 0,9 para o grupo controle, todos diferentes entre si ($p < 0,05$). As soroconversões mais altas contra BoHV-5 foram 2,7 para o grupo suplementado com *B. cereus* var. toyoi, 1,7 no grupo que recebeu ração contendo *S. boulardii* e 1,3 para o grupo controle, todos diferentes entre si ($p < 0,05$). Concluiu-se que ambos probióticos aumentaram a resposta humoral.

Palavras-chave: Probióticos, ruminantes, imunomodulação.

INTRODUÇÃO

A necessidade de maior eficiência na produção animal tem levado à utilização de aditivos alimentares que propiciem a máxima expressão do potencial produtivo dos animais. Após a segunda guerra mundial comprovou-se que antibióticos em doses subterapêuticas incrementavam a eficiência alimentar em várias espécies animais. A partir dos resultados do Comitê Swann (SWANN COMMITTEE, 1969) a utilização indiscriminada de antibióticos, porém, foi questionada, concluindo na sua proibição pela União Européia a partir de 2006 (COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION, 2003), embora o uso de aditivos na alimentação animal fosse normatizado desde 1970 (Directive 70/524/EEC). Essa diretiva (Directive 94/40/EC) foi adaptada em 1994 incluindo-se alguns microorganismos e enzimas (ROSEN, 1996). No ano 2000, 19 preparações de probióticos foram aprovados pela União Européia, entretanto, o modo de ação deles não está completamente claro. A interação dos probióticos com bactérias patogênicas e não patogênicas é muito importante, modificações de microestruturas e barreiras funcionais do tecido intestinal, assim como o extenso sistema imune intestinal podem estar envolvidos (SIMON et al, 2001).

Uma das mais promissoras áreas de desenvolvimento de alimentos funcionais tem sido o uso de probióticos e prebióticos e seu papel na saúde (ERICKSON & HUBBARD, 2000). Embora ao longo dos anos o termo probiótico teve diferentes definições, atualmente é utilizado 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 na saúde do mesmo (SCHREZENMEIR & DE VRESE, 2001). São úteis na prevenção e no tratamento de doenças, em distúrbios gastrintestinais, na inibição da carcinogênese, como imunomoduladores e como promotores de crescimento, constituindo-se em uma alternativa aos antibióticos (GOMES & MALCAT, 2006).

Probióticos elaborados com leveduras do gênero *Saccharomyces* ou bactérias do gênero *Bacillus*, entre outros, que não deixam resíduos nos alimentos

de origem animal, são utilizados desde há décadas visando a substituição dos antibióticos (KREHBIEL *et al.*, 2003; COPPOLA & GIL-TURNES, 2004).

A imunização dos animais domésticos para controlar as doenças infecciosas, iniciada há mais de um século, tem despertado novo interesse em vista das restrições impostas pelos mercados consumidores ao uso de antibióticos e outros quimioterápicos, tanto para uso terapêutico, para a prevenção das doenças ou para incrementar a eficiência alimentar. Vacinas mais eficientes e com menores efeitos colaterais estão sendo desenvolvidas mediante a utilização de antígenos purificados e adjuvantes eficientes. Alguns probióticos modulam a resposta imune, potencializando as vacinas, o que abre uma nova perspectiva de sua utilização. Como resultado, aumentou o interesse pelo estudo dos efeitos dos probióticos, prebióticos e simbióticos na saúde e produção animal (KREHBIEL *et al.*, 2003), assim como o interesse na fabricação e utilização de vacinas mais eficientes (HONG *et al.*, 2004).

Recentes pesquisas na área de probióticos foram direcionadas para avaliação da resposta imune de animais suplementados com eles, indicando em sua grande maioria, que estimulam, de alguma maneira, a resposta do hospedeiro, seja na resposta imune inata, celular ou humoral. A grande maioria dos trabalhos realizados nesta área tem utilizado espécies animais monogástricas, tais como camundongos, aves e suínos, registrando-se carência de estudos em ruminantes.

A maioria dos estudos utilizou lactobacilos ou bifidobactérias (PERDIGÓN *et al.*, 1995), microorganismos utilizados na alimentação humana e que apresentam restrições em sua administração na alimentação animal. *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *toyoi* são mais resistentes às condições ambientais que as bactérias ácido-láticas, o que facilita seu uso na elaboração, conservação e administração de rações para alimentação animal.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência do *Bacillus cereus* var. *toyoi* e do *Saccharomyces boulardii* na resposta imune humoral de vacinas contra *Escherichia coli* e Herpesvírus bovino-5 em ovinos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e desenho experimental

Trinta cordeiros com três meses de idade foram divididos aleatoriamente em três grupos de 10. Os animais foram mantidos na propriedade de origem, arraçoados duas vezes por dia de forma separada com ração comercial isenta de antimicrobianos suplementada com o respectivo probiótico e depois soltos na mesma pastagem natural. Na ração do grupo 1 foi adicionado *Bacillus cereus* var. toyoi na concentração de 1×10^6 esporos viáveis gr^{-1} , na do grupo 2 *Saccharomyces boulardii* na concentração de 1×10^6 UFC gr^{-1} , e a do grupo 3 (controle) sem probióticos. Os ovinos foram vacinados com uma dose de bacterina contra *Escherichia coli* K88ab contendo hidróxido de alumínio como adjuvante e com uma vacina inativada oleosa de BoHV-5 nos dias 0 e 30 do experimento. A bacterina foi aplicada por via subcutânea e a vacina de BoHV-5 por via intramuscular.

Titulação de anticorpos

Amostras de sangue foram obtidas nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 após a vacinação. Os anticorpos foram titulados por ELISA, utilizando-se placas de Poliestireno (Greiner Labortechnik, Alemanha) com 96 cavidades. Os cultivos utilizados como antígenos tinham as seguintes concentrações: *E. coli* K88ab 10^9 UFC mL^{-1} e o BoHV-5 10^6 DICT₅₀ mL^{-1} . As placas de ELISA foram sensibilizadas com 50 μL de suspensão de *E. coli* inativada com a mesma concentração utilizada na vacina ou com 10^5 DICT₅₀ mL^{-1} de BoHV-5 inativado. Seguiram-se protocolos aceitos para a realização do teste, suspendendo-se os antígenos em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6, os soros foram diluídos 1/20 em tampão fosfato pH 7,6 contendo Tween 20 a 0,5 % (PBS-T), e o conjugado 1/2000 em PBS-T. As placas foram sensibilizadas com o antígeno correspondente por 18 horas a 4°C, após lavadas três vezes com PBS-T pH 7,6 e incubadas por 90 minutos a 37°C com 50 μL de soro de cada cordeiros (em duplicata) diluídos 1:20 em PBS-T. Após foram novamente lavadas três vezes com PBS-T, foi adicionado 50 μL de imunoglobulina de coelho anti-ovino conjugada com peroxidase (DAKOPATTS A/S, Dinamarca, Peroxidase-conjugated rabbit anti-sheep immunoglobulins) diluída 1:2000 em PBS-T e incubadas por 90 minutos a 37°C. Após as placas foram lavadas cinco vezes com

PBS-T e em seguida adicionado 50 µl de substrato/cromógeno, deixando reagir por 15 minutos no escuro, a temperatura ambiente. As absorbâncias foram medidas em um leitor de microplacas (MR 700 Microplate Reader, Dynatech Laboratories, Alemanha) a 492 nm. As absorbâncias de cada amostra foram divididas pela absorbância do soro da coleta 1 do mesmo animal, e os resultados expressos como soroconversão.

Análise Estatística

As médias de soroconversão de cada grupo foram transformadas em $\log_{10}$ para serem avaliadas por análise de variância com medida repetida através do teste de LSD, pelo programa SAS (SAS, 1997).

RESULTADOS

Resposta sorológica à bacterina de *E. coli*

A soroconversão para o antígeno de *E. coli* foi superior ($p < 0,001$) no grupo suplementado com *Saccharomyces boulardii*, quando comparado tanto ao grupo controle como quando comparado ao grupo tratado com *Bacillus cereus* var. *toyoi*.

A soroconversão mais alta no grupo tratado com *Saccharomyces boulardii* foi obtida nos dias 7, 21 e 49 do experimento, alcançando o valor médio de 1,9, no grupo tratado com *B. cereus* var. *toyoi* foi de 1,3 e foi obtida no dia 49 do experimento, enquanto no grupo controle se obteve uma soroconversão de 1,3 no dia 7 e a partir desse dia as soroconversões ficaram abaixo de 1, ficando a média desse grupo em 0,9. A tabela 1 mostra as médias das soroconversões obtidas em cada grupo. Os valores das soroconversões durante todo o experimento são mostrados na figura 1 e figura 2.

TABELA 1: Médias de soroconversão de ovinos vacinados com uma bacterina de *Escherichia coli* suplementados com ração contendo probióticos.

Soroconversão média dos animais de cada grupo			
	<i>B. cereus</i>	<i>S. boulardii</i>	Controle
Dia 0	1 ^a	1 ^a	1 ^a
Dia 7	1,2 ^a	1,9 ^b	1,3 ^a
Dia 14	1,2 ^a	1,8 ^b	0,7 ^c
Dia 21	0,9 ^a	1,9 ^b	0,9 ^a
Dia 28	0,8 ^a	1,6 ^b	0,9 ^a
Dia 35	1,1 ^{ab}	1,4 ^b	0,9 ^a
Dia 42	1,0 ^a	1,6 ^b	1,0 ^a
Dia 49	1,3 ^a	1,9 ^b	0,9 ^c

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

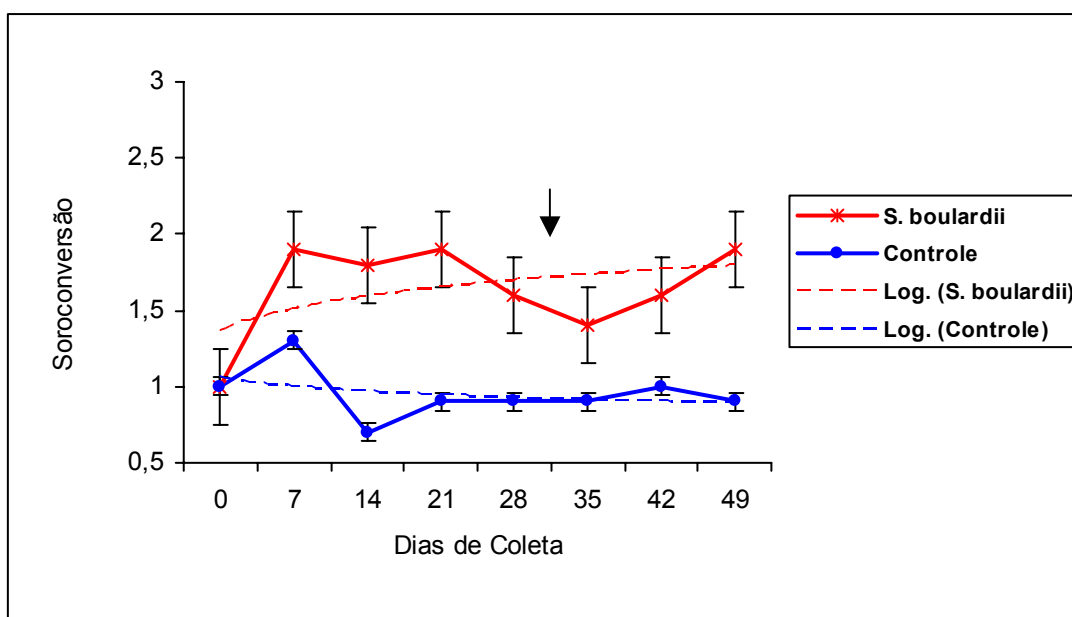


FIGURA 1: Médias de soroconversão de ovinos vacinados com uma bacterina de *Escherichia coli* suplementados com ração contendo probiótico *Saccharomyces boulardii*.

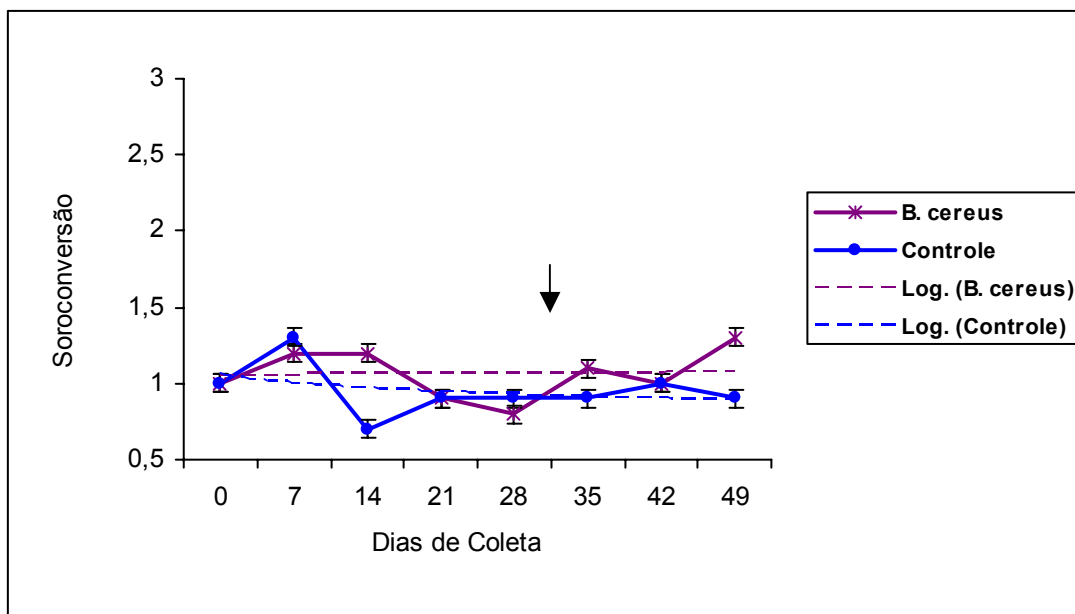


FIGURA 2: Médias de soroconversão de ovinos vacinados com uma bacterina de *Escherichia coli* suplementados com ração contendo probiótico de *Bacillus cereus* var toyoi.

Resposta sorológica ao antígeno de BoHV-5

Para BoHV-5 a soroconversão foi superior ($p < 0,001$) no grupo alimentado com probiótico a base de *B. cereus* var. toyoi em relação aos outros dois grupos, sendo que o grupo tratado com *S. boulardii* também apresentou diferença ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle (Figura 3 e figura 4).

A soroconversão mais alta no grupo tratado com *S. boulardii*, foi obtida nos dias 35 e 49 do experimento, alcançado o valor de 1,7, e no grupo tratado com *B. cereus* var. toyoi foi de 2,7, obtida nos dias 21, 35 e 49 do experimento, enquanto no grupo controle se obteve uma soroconversão máxima de 1,3 nos dias 35 e 49. A tabela 2 mostra as médias das soroconversões obtidas em cada grupo. Os valores das soroconversões durante todo o experimento são mostrados na figura 3 e na figura 4.

TABELA 2: Médias de soroconversão de ovinos vacinados com vacina inativada oleosa de BoHV-5 suplementados com ração contendo probióticos.

Soroconversão média dos animais de cada grupo			
	<i>B. cereus</i>	<i>S. boulardii</i>	Controle
Dia 0	1 ^a	1 ^a	1 ^a
Dia 7	1,2 ^a	1,6 ^b	1,1 ^a
Dia 14	1,6 ^a	1,5 ^a	1,1 ^b
Dia 21	2,7 ^a	1,5 ^b	1,2 ^b
Dia 28	2,1 ^a	1,4 ^b	1,0 ^c
Dia 35	2,7 ^a	1,7 ^b	1,1 ^c
Dia 42	2,0 ^a	1,5 ^b	1,3 ^b
Dia 49	2,6 ^a	1,7 ^b	1,3 ^c

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

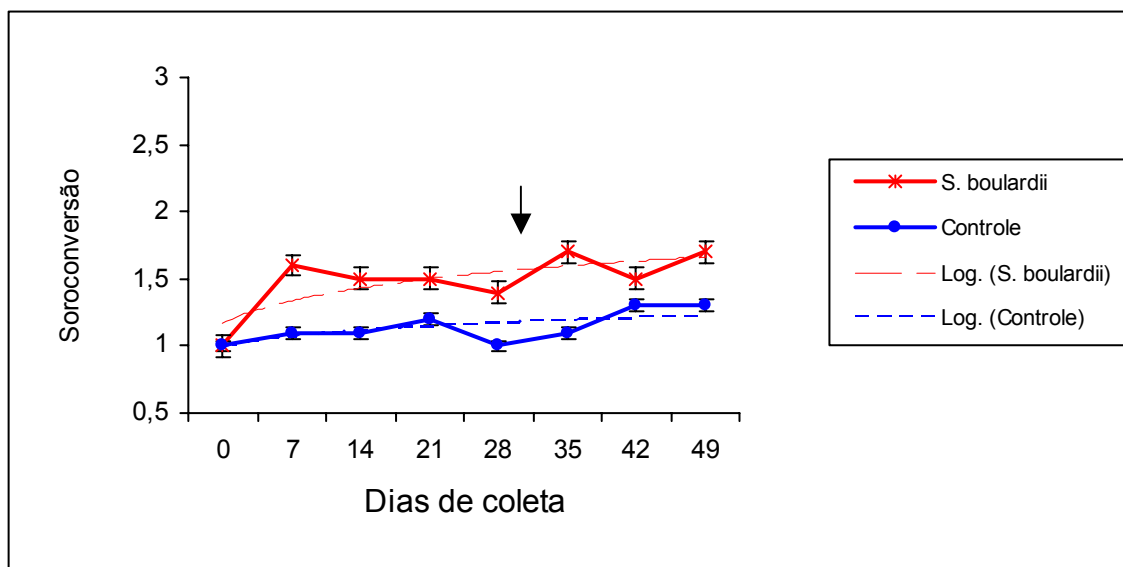


FIGURA 3: Médias de soroconversão de ovinos vacinados com vacina inativada oleosa de HVB-5 suplementados com ração contendo probiótico de *Saccharomyces boulardii*.

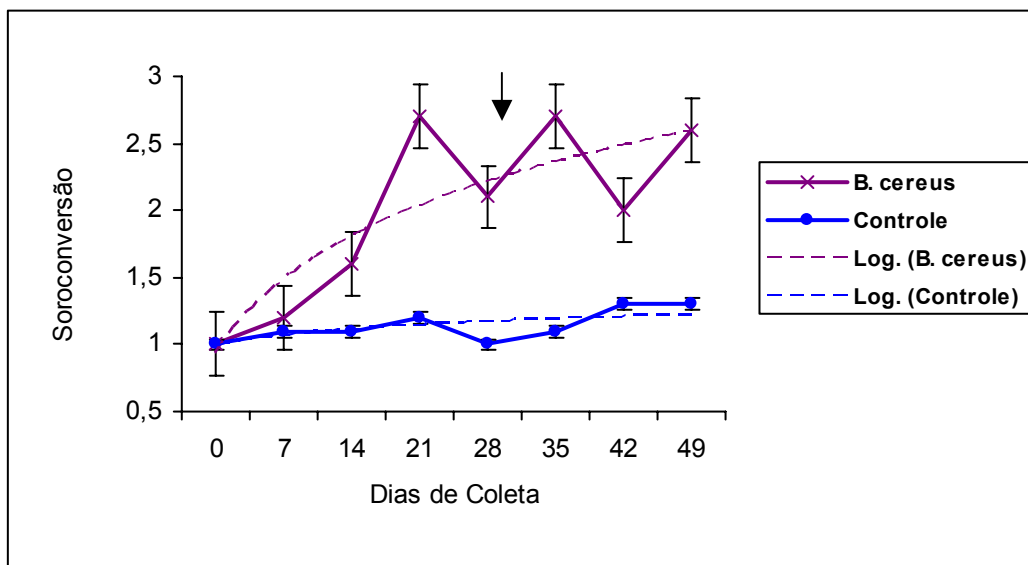


FIGURA 4: Médias de soroconversão de ovinos vacinados com vacina inativada oleosa de HVB-5 suplementados com ração contendo probiótico de *Bacillus cereus* variedade toyoi.

DISCUSSÃO

As bactérias ácido lácticas são os probióticos mais utilizados e conhecidos, embora outras espécies tais como *B. subtilis*, *B. cereus*, *Enterococcus faecium*, esporos de *B. cereus* var. toyoi e as Bífidobactérias sejam utilizadas em nutrição animal, individualmente ou associadas (JOHANSEN et al, 2000). Esporos de *B. cereus* var. toyoi são especialmente interessantes para alimentação animal, devido a sua maior capacidade de resistir às alterações climáticas e também às condições de armazenamento a que são submetidas as rações para uso animal.

Ambas vacinas utilizadas neste experimento induziram soroconversão contra os dois antígenos utilizados. A soroconversão para a bacterina de *E. coli*, em cordeiros alimentados com ração suplementada com *B. cereus* var. toyoi foi na última semana 1,4 vezes mais alta que no grupo controle, entanto a do grupo suplementado com *S. boulardii* foi 2,1 vezes superior a do grupo controle, concordando com os resultados obtidos por Coppola et al. (2005) que detectaram em camundongos vacinados com uma bacterina de *E. coli*, soroconversões de 1,2 a

1,4 no grupo suplementado com *B. cereus* var. *toyoi* e de 1,6 a 1,8 no grupo suplementado com *S. boulardii*, maiores que o grupo controle.

A soroconversão induzida pelo antígeno viral, em cordeiros alimentados com ração suplementada com *B. cereus* var. *toyoi* foi, na última semana, 2,1 vezes mais alta que no grupo controle, e a do grupo suplementado com *S. boulardii* 1,3 vezes superior a do grupo controle, concordando também com os resultados de Coppola *et al.* (2005) em camundongos vacinados com Parvovírus canino-2, que detectaram soroconversões de 5,2 a 12 no grupo suplementado com *B. cereus* var. *toyoi*, e de 6,8 a 9,1 no grupo suplementado com *S. boulardii*. No estudo realizado por Coppola *et al.* (2005) as soroconversões contra o antígeno viral foram maiores no grupo suplementado com *B. cereus* var. *toyoi* quando comparadas ao grupo suplementado com *S. boulardii*, resultados semelhantes foram obtidos em nosso estudo, onde obtivemos soroconversões superiores contra o Herpesvírus Bovino-5 nos grupos suplementados com *Bacillus cereus* var. *toyoi* quando comparadas às do grupo suplementado com *Saccharomyces boulardii* e com o grupo controle. Deve considerar-se que o antígeno viral utilizado por Coppola *et al.* (2005) foi um antígeno replicante enquanto o utilizado neste estudo foi inativado, o que pode ter uma influência nos resultados, assim como que as vias de administração da vacina viral e bacteriana e os adjuvantes utilizados nas vacinas, foram diferentes.

Dos resultados do presente estudo se conclui que ambos probióticos induziram um efeito imunoestimulante quanto à resposta vacinal. *S. boulardii* induziu maiores soroconversões contra *Escherichia coli*, enquanto *B. cereus* var. *toyoi* induziu maiores soroconversões contra Herpesvírus Bovino-5, sugerindo que o efeito dos probióticos testados difere em função do antígeno utilizado.

REFERÊNCIAS

COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. **Council regulation on the authorization of the additive avilamycin in feedingstuffs.** Disponível em: [http://www.wetgiw.gov.pl/inspekcja_weterynaryjna/FUS/Srodki_z_zwierzat/dod_atki_paszowe/COUNCIL%20REGULATION%20\(EC\)%20No%20355%202003.pdf](http://www.wetgiw.gov.pl/inspekcja_weterynaryjna/FUS/Srodki_z_zwierzat/dod_atki_paszowe/COUNCIL%20REGULATION%20(EC)%20No%20355%202003.pdf) Acesso em: 14 set. 2006.

- COPPOLA, M. M. & GIL-TURNES C. (2004) Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural** 34:1297-1303.
- COPPOLA, M. M.; CONCEIÇÃO, R.F. & GIL-TURNES, C. (2005). Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *toyo* on the humoral and cellular response of mice to vaccines. **Food and Agricultural Immunology**, 16: 3, 213-219.
- ERIKSON, L. K. & HUBBARD, E. N. (2000) Probiotic immunomodulation in health and disease. **Journal of Nutrition**, 130: 403-109.
- GOMES, A. M. P. & MALCAT, F.X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos e aplicações tecnológicas. **Biotecnologia alimentar, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa**, p.12-22 Disponível em: http://dequim.ist.utl.pt/bbio/64/pdf/agentes_probioticos_em_alimentos.pdf Acesso em: 14 set. 2006.
- HONG, H. A.; DUC, Le H. & CUTTING, S. M. (2005) The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews** 29: 813 – 835.
- JOHANSEN, M.; JORSAL, S. E.; ANDERSEN, L. O.; THOMSEN, L. K. & BAEKBO, P. (2000) Prevention and treatment of oedema disease in Denmark, 1994-1998. A review of the results of Danish experiments. **Dansk Veterinær** 83: 6–9.
- KREHBIEL, C. R.; RUST, S. R.; ZHANG, G. & GILLILAND, S. E. (2003) Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. **Journal of Animal Science** 81:120-132.
- PERDIGÓN, G.; ALVAREZ, S.; RACHID, M.; AGÜERO G. & GOBBATTO, N. (1995) Immune system stimulation by probiotics. **Journal of Dairy Science** 78: 1597-1606.
- ROSEN, D. (1996) Feed Additive nomenclature. **World Poultry Science Journal**. 52: 53-57.
- SAS. SAS/STAT User's Guide. SAS Inst. Inc., Cary, NC. 1997.
- SCHREZENMEIR, J. & DE VRESE, M. (2001) Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, 73: 361-364.

SIMON, O.; JADAMUS, A. & VAHJEN, W. (2001) Probiotic feed additives – effectiveness and expected modes of action. In: New Trends In Animal Nutrition. 28–29 June, 2000. Jacharanka, Poland. **Journal of Animal and Food Science** 10: 51-67.

SWANN COMMITTEE. BVA and RCVS evidence to the Swann Committee. **Veterinary Record**, jan. 25, p. 91-92, 1969.

5.0 – CONCLUSÕES

- 1- Os probióticos induziram aumento da soroconversão a vacinas.
- 2- *Saccharomyces boulardii* induziu maiores soroconversões contra *Escherichia coli*.
- 3- *Bacillus cereus* var. *toyoi* induziu maiores soroconversões contra Herpesvírus Bovino-5.

6.0 - TRABALHOS FUTUROS

Baseado nos resultados deste trabalho e demais pesquisas realizadas na área de probióticos e modulação da resposta imune, conclui-se que os probióticos promovem imunomodulação, embora não se saiba quais os mecanismos pelos quais esse efeito ocorre. Portanto é importante expandir as pesquisas nesta área, tentando definir quais as direções dessas respostas e assim entender melhor o mecanismo desse efeito na imunidade.

7.0 - Referências Bibliográficas

- ANTUNOVIC, Z., SPERANDA, M., LIKER, B., SERIC, V., SENCID, D., DOMACINOVIC, M.; SPERANDA, T. Influence of feeding the probiotic pioneer pdfm® to growing lambs on performances and blood composition. **Acta Veterinaria (Beograd)**, v. 55, n. 4, p. 287-300, 2005.
- ÁVILA, F.A., SCHOCKEN-ITURRINO, R.P., BASSO, A. et al. Use of vaccine and probiotic in the control of swine diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 50, p. 505- 511, 1998.
- ÁVILA, F. A.; PAULILLO, A. C.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; LUCAS, F. A.; ORGAZ, A.; QUINTANA, J.L. Avaliação da eficiência de um probiótico no controle de diarréia e no ganho de peso de bezerros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, p. 41-46, 2000.
- BALLOUT, J. M., GRZYCH, J. M., PIERCE, R. J.; CAPRON, A. A purified 28,000 Dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. **Journal of Immunology**, v. 138, p. 3448-3453, 1987.
- BRASHEARS, M. M., GALYEAN, M. L., LONERAGAN, G. H., MANN, J. E.; KILLINGER, K. Prevalence of *Escherichia coli* O157: H7 and performance by feedlot cattle given lactobacillus direct-fed microbials. **Journal of Food Protection**, v.66, p. 748–754. 2003.
- CALDINI, G., TROTTA, F.; CENCI, G. Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide genotoxicity by *Bacillus* strains. **Research in Microbiology**, v. 153, p. 165-171, 2002.
- CEZAR, M. F.; SOUZA, B. B.; SOUZA, W. H.; FILHO, E. C. P., TAVARES, G. P.; MEDEIROS, G. X. Avaliação de parâmetros fisiológicos de ovinos Dorper, Santa

Inês e seus mestiços perante condições climáticas do trópico semi-árido nordestino. **Ciência Agrotécnica de Lavras**, v. 28, n. 3, p. 614-620, 2004.

CHAUCHEYRAS, F., FONTY, G., BERTIN, G.; GOUET, P. Effects of live *Saccharomyces cerevisiae* cells on zoospore germination, growth and cellulolytic activity of the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis* MHC3. **Current Microbiology**, v. 31, p. 201-205, 1995.

COPPOLA, M. M.; CONCEIÇÃO, F. R.; GIL-TURNES, C. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the humoral and cellular response of mice to vaccines. **Food and Agricultural Immunology**, Basingstoke, v. 16, n. 3, p. 213-219, 2005.

COPPOLA, M. M.; GIL-TURNES C. Probióticos e resposta immune. **Ciência Rural**. v. 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.

COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. **Council regulation on the authorization of the additive avilamycin in feedingstuffs**. Available in:

[http://www.wetgiw.gov.pl/inspekcja_weterynaryjna/FUS/Srodki_z_zwierzat/dodatki_paszowe/COUNCIL%20REGULATION%20\(EC\)%20No%20355%202003.pdf](http://www.wetgiw.gov.pl/inspekcja_weterynaryjna/FUS/Srodki_z_zwierzat/dodatki_paszowe/COUNCIL%20REGULATION%20(EC)%20No%20355%202003.pdf)

Accessed on set. 14th 2006.

DE PETRINO, S. F.; DE JORRAT, M. E. B. B.; MESON, O.; PERDIGÓN, G. Protective ability of certain lactic acid bacteria against an infection with *Candida albicans* in a mouse immunosuppression model by corticoid. **Food and Agricultural Immunology**, v. 7, p. 365-373, 1995.

DONOVAN, D. C.; FRANKLIN, S.; CHASE, C. C.; HIPPEN, A. R. Growth and health of Holstein calves fed milk replacers supplemented with antibiotics or Enteroguard. **Journal of Dairy Science** v.85, p. 947–950, 2002.

DOYLE, M. E. Alternatives to antibiotic use for growth promotion in animal husbandry. **Food Research Institute, FRI Briefings**. p. 1-17; 2001.

DUC, L. H.; HONG, H. A.; CUTTING, S. M. Germination of the spore in the gastrointestinal tract provides a novel route for heterologous antigen presentation. **Vaccine**, v. 21, p. 4215-4224, 2003.

DUC, L. H.; HONG, H. A.; FAIRWEATHER, N.; RICCA, E.; CUTTING, S. M. Bacterial spores as vaccine vehicles. **Infection and Immunity**, v. 22, p. 2810-2518, 2003.

DUC, L. H.; HONG, H. A.; UYEN, N. Q.; CUTTING, S. M. Intracellular fate and immunogenicity of *B. subtilis* spores. **Vaccine**, v. 22, p. 1873-1885, 2004.

ENDO, T.; NAKAMO, M.; SHIMIZU, S.; FUKUSHIMA, M.; MIYOSHI, S. Effects of a probiotic on the lipid metabolism of cocks fed on a cholesterol-enriched diet. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 133, p. 1569-1575, 1999.

ENJALBERT, F.; GARRETT, J.E.; MONCOULON, R.; BAYOURTHE, C.; CHICOTEAU, P. Effects of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal digestion in non-lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 76 p. 195-206. 1999.

ERASMUS, L. J., BOTHA, P. M.; KISTNER, A. Effect of yeast culture supplementation on production, rumen fermentation and duodenal nitrogen flow in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 3056-3065, 1992.

ERIKSON, L. K.; HUBBARD, E. N. 2000 Probiotic immunomodulation in health and disease. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 403-109.

FULLER, R.; BROOKER, B. E. Lactobacilli which attach to the crop epithelium of the fowl. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 27, p. 1305-1312, 1974.

FULLER, R.; BROOKER, B. E. The attachment of bacteria to the squamous epithelial cells and its importance in the microecology of the small intestine. In: **Microbial Adhesion to Surfaces**. R. C. W. Berkley, ed. Ellis Horwood, Chichester, U. K., p. 495-507, 1980.

FULLER, R. Probiotics. **The Scientific Basis**. Chapman & Hall, London, 1992.

FULLER, R.; GIBSON, G. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 32 sup., v. 222, p. 28-31, 1997.

GIL-TURNES, C.; DOS SANTOS, A. F.; DA CRUZ, F. W.; MONTEIRO, A. V. Properties of the *Bacillus cereus* strain used in probiotic CenBiot. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 11-14, 1999.

GILLILAND, S. E.; SPEECK, M. L. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and food borne pathogens in associative cultures. **Journal of Food Protection**, v. 40, p. 820-823, 1977.

GIGER-REVERDIN, S., BEZAULT, N., SAUVANT, D.; BERTIN, G. Effects of the probiotic yeast in lactating ruminants: Interaction with dietary nitrogen level. **Animal Feed Science and Technology**, v. 63, p. 149-162, 1996.

GOMES, A. M. P.; MALCAT, F.X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos e aplicações tecnológicas. **Biotecnologia alimentar, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa**, p.12-22

Disponível em:

http://dequim.ist.utl.pt/bbio/64/pdf/agentes_probioticos_em_alimentos.pdf Acesso

em: 14 setembro de 2006.

GOMEZ-ALARCON, R. A.; DUDAS, C.; HUBER, J. T. Influence of cultures of *Aspergillus oryzae* on rumen and total tract digestibility of dietary components.

Journal of Dairy Science, v. 73, p. 703, 1990.

GOMEZ-ALARCON, R. A.; HUBER, J. T.; HIGGIN-BOTHAM, F. W.; AMMON, D.; TAYLOR, B. Influence of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the milk-yields, eating patterns, and body temperatures of lactating cows. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 1733, 1991.

GUILLOT, J. F. Les probiotiques en alimentation animale. **Cahiers d'Agriculture**, v. 7, p. 49-54, 1998.

HERICH, R.; LEVKUT, M. Lactic acid bacteria, probiotic and immune system.

Veterinarni Medicina, República Tcheca, v. 47, p.169-180, 2002.

HOLAZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLIMGER, U.; HUIS IN'T VELD, J. H. J. Overview of gut flora and probiotics. **Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 85-101, 1998.

HOWART, F.; POULTER, D. Avoparcin ban. **Veterinary Record**, v. 140, p. 103 – 104. 1997.

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

JIN, L. Z.; HO, Y. W.; ABDULLAN, N.; JALALUDIN, S. Probiotics in poultry: modes of action. **World Poultry Science Journal**, v. 53, p. 351-368, 1997.

JONES, G. W.; RUTTER, I. M. Role of K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by *Escherichia coli* in piglets. **Infection and Immunity**, v. 6, p. 918-927, 1972.

JOHANSEN, M.; JORSAL, S. E.; ANDERSEN, L. O.; THOMSEN, L. K.; BAEKBO, P. Prevention and treatment of oedema disease in Denmark, 1994 -1998. A review of the results of Danish experiments. **Dansk Veterinaer**. V. 83, p. 6 – 9, 2000.

KAMEL, H. E. M.; SEKINE, J.; EL-WAZIRY, A. M.; YACOUT, M. H. M. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* on the synchronization of organic matter and nitrogen

degradation kinetics and microbial nitrogen synthesis in sheep fed Berseem hay (*Trifolium alexandrinum*). **Small Ruminant Research**, v. 52, p. 211-216, 2004.

KATO, I.; YOKOKURA, T.; MUTAI, M. Augmentation of mouse natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* and its surface antigens. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v.28, n.2, p.209-217, 1984.

KELLEMS, R. O.; LAGERSTEDT, A.; WALLENTINE, M. V. Effect of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation extract or *Aspergillus oryzae* plus yeast culture plus mineral and vitamin supplement on performance of Holstein cows during a complete lactation. **Journal of Dairy Science**. v. 73, p. 2922, 1990.

KOSAK, T.; MAEDA, T.; NAKADA, Y.; YUKAWA, M.; TANAKA, S. Effect of *Bacillus subtilis* spore administration on activation of macrophages and natural killer cells in mice. **Veterinary Microbiology**, v. 60, p. 215-225, 1998.

KREHBIEL, C. R.; RUST, S. R.; ZHANG, G.; GILLILAND, S. E. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. **Journal of Animal Science**. v.81, p. 120-132, 2003.

KRITAS, S. K.; GOVARIS, A.; CHRISTODOULOPOULOS, G.; BURRIEL, A. R. Effect of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* supplementation of ewe's feed on sheep milk production and young lamb mortality. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 53, p.170–173, 2006.

LEMA, M.; WILLIAMS, L.; Rao, D. R. Reduction of fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 in lambs by feeding microbial feed supplement. **Small Ruminant Research**, v.39, p. 31–39, 2001.

LODDI, M. M. Probióticos e prebióticos na nutrição de aves. Disponível em: <http://www.adip.com.br/ftp/Probprebaves.doc> Acesso em: 30 agosto de 2006.

MANN, S. O.; GRANT, C.; HOBSON, P. N. Interactions of *E. coli* and lactobacilli in gnotobiotic lambs. **Microbios Letters**, v. 15, p. 141-144, 1980.

MARTIN, S. A.; NISBET D. J. Effect of direct-fed microbials on rumen, In: Symposium: Direct-fed microbials and rumen fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 1736-1744, 1992.

MATHIEU, F.; JOUANY, J. P.; SENAUD, J.; BOHATIER, J.; BERTIN, G.; MERCIER, M. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations

in the rumen of faunated and defaunated sheep; protozoal and probiotic interactions.

Reproduction Nutrition Development, v. 36, p. 271-287, 1996.

MATSUZAKI, T.; CHIN, J. Modulating immune responses with probiotic bacteria.

Immunology and Cell Biology, v.78, p. 67-73, 2000.

MBANZAMIHIGO, L.; NEVEL, C.J. V.; DEMEYER, D.I. Lasting effects of monensin on rumen and caecal fermentation in sheep fed a high grain diet. **Animal Feed Science Technology**. v. 62, pág. 215-228. 1996.

MIKEL, A.; TASENDE, C.; SOSA, C. ; GARÓFALO, E. G. The role of sex steroid receptors in sheep female reproductive physiology. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 385-394, 2004.

MIRANDA , R. L. A.; MENDONZA, M. G. D.; BARCENA-GAMA, J. R.; GONZALEZ, M. S. S.; FERRARA, R.; ORTEGA, C. M. E.; COBOS, P. M. A. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae* cultures and NDF level on parameters of ruminal fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 63, p. 289-296, 1996.

MWENYA, B.; SANTOSO, B.; SAR, C.; GAMO, Y.; KOBAYASKI, T.; ARAI, I.; TAKAHASKI, J. Effect of including β 1-4 galacto-oligosaccharides, lactic acid bacteria or yeast culture on methanogenesis as well as energy and nitrogen metabolism in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 115, p. 313-326, 2004.

NEWBOLD, C. J. Probiotics for ruminants. **Annales de Zootechnie**, n. 45, p. 329-335, 1996.

NICOLI, J. R.; VIEIRA, L.Q. Prebióticos e Probióticos. **Ciência Hoje**, v.28, n. 163, p.34-38, 2000.

NOGUEIRA, E. A.; NOGUEIRA JÚNIOR, S. Ovinos e Caprinos avançam em São Paulo. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/OUT/verTexto.php?codTexto=4136>
Acesso em: 05 de novembro de 2006.

NURNI, E.; RANTALA, M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. **Nature**, v. 241, p. 210-211, 1973.

PERDIGÓN, G.; ALVAREZ, S. Probiotics and the immune state. In: FULLER, R. **Probiotics: the scientific basis**. London: Chapman e Hall, p.145-180, 1992.

- PERDIGÓN, G.; ALVAREZ, S.; RACHID, M.; AGÜERO G.; GOBBATTO, N. Immune system stimulation by probiotics. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 1597-1606, 1995.
- ROBINSON, K.; CHAMBERLAIN, L. M.; SCHOFIELD, K. M.; WELLS, J. M.; LE PAGE, R. W. F. Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 653-657, 1997.
- RODRIGUES, P. H. M.; MATTOSA, W. R. S.; MELOTTIZ, L.; RODRIGUES, R. Monensina e digestibilidade aparente em ovinos alimentados com proporções de volumoso/concentrado. **Scientia Agrícola**, Brasil, v. 58, n. 3, p. 449-455, 2001.
- ROGERS, M.; JOUANY, J.P.; THIVEND, P.; FONTENOT, J.P. The effects of short-term and long-term monensin supplementation, and its subsequent withdrawal on digestion in sheep. **Animal Feed Science Technology**, v. 65, p. 113-127. 1997.
- ROOS, T. B.; TABELÃO, V. C.; LEITE, F. P.L.; CORRÊA, M. N.; VIDOR, T.; FISCHER, G.; GIL-TURNES, C. Efeito de probióticos de *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. toyoii na resposta imune de cordeiros a uma vacina contra Herpes Vírus Bovino. In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2005, Santos. **Anais...** Santos: Mendes Convention Center, Santos, S. P., 2005b. p. 216.
- ROOS, T. B.; TABELÃO, V. C.; WEISER, M. A.; SCHWEGLER, E.; MOURA, S. V.; GOULART, M. A.; PEREIRA, C. R.; LEITE, F. P. L.; CORRÊA, M. N.; GIL-TURNES, C. Efeito de probióticos de *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. toyoii na resposta imune de cordeiros a uma bacterina de *Escherichia coli*. In: XIV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, VII ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2005, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2005b.
- ROOS, T. B.; MORAES, C. M.; ROCHA, A. R.; PEREIRA, C. R.; LEITE, F. P. L.; GIL-TURNES, C. Efeito de *Bacillus cereus* var toyoii e *Saccharomyces boulardii* na resposta humoral de camundongos a dois antígenos com diferentes adjuvantes. In: XVII CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2006, Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 2006.
- ROTH, F. X.; KIRCHGESSNER, M. Nutritive wirksamkeit von toyocerin. 2 Kalbermast. **Landwirtschaftliche-Forschung**, Frankfurt, v. 41, n. 1-2, p. 63-70, 1998.

ROSEN, D. Feed Additive nomenclature. **World Poultry Science Journal**, v. 52, p. 53-57, 1996.

RUSSEL, J. B.; HOULIHAN, A. J. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 65-74, 2003.

SAS. SAS/STAT User's Guide. SAS Inst. Inc., Cary, NC. 1997.

SALIMEN, S., ISOLAURI, E.; SALIMEN, E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. **Antonie Leeuwenhoek**, v. 70, p. 347-358, 1996.

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

SELAIVE-VILLARROEL, A. B.; SILVEIRA, V. C. P.; OLIVEIRA, N. M.

Desenvolvimento e produção de carne de ovinos Corriedale abatidos com diferentes idades sobre pastagem natural ou artificial. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 3, n. 3, p. 111-118, 1997.

SHU, Q.; QU, F.; GILL, H. S. Probiotic treatment using *Bifidobacterium lactis* HNO19 reduces weanling diarrhea associated with rotavirus and *Escherichia coli* infection in a piglet model. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v. 33, n. 2, p. 171-177, 2001.

SIMON, O.; JADAMUS, A.; VAHJEN, W. Probiotic feed additives – effectiveness and expected modes of action. In: New. **Journal Animal & Food Science**, v.10, n.1, p. 51-67, 2001.

STERN, R. M.; STORRS, A. B. The rationale of *Lactobacillus acidophilus* in feeding programs for livestock. Proc. 36 th **Minnesota Nutrition Confederation Bloomington**, p.191, 1975.

SWANN COMMITTEE. BVA and RCVS evidence to the Swann Committee. **Veterinary Record**, jan. 25, p. 91-92, 1969.

TABELEÃO, V. C.; CORRÊA, M. N.; DEL PINO, F. A. B.; GIL-TURNES, C.; WEISER, M. A.; ROOS, T. B.; MOURA, S. V.; GOULART, M. A.; SCHWEGLER, E; SILVA, V. M. Efeito de probiótico no metabolismo energético de cordeiros semi-confinados. In: XIV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, VII ENCONTRO DE

PÓS-GRADUAÇÃO, 2005, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2005.

TABELEÃO, Vinícius Coitinho. **Efeito da suplementação com Monensina ou Probióticos em cordeiros sobre parâmetros ruminais e metabólicos**. 2006. 55f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

THOMBKE, S.; ELWINGER, K. Growth promotants in feeding pigs and poultry. III Alternatives to antibiotic growth promotants. **Annales de Zootechnie** v. 47, p. 245-271, 1998.

UDARCI, M. C.; PINCHUK, I. Antimicrobial activity of *Bacillus* probiotics. In: Bacterial spore formers: probiotics and emerging applications (Ricca, E., Henriques, A. O. and Cutting, S. M. Eds.), **Horizon Bioscience**, New York, p. 171-187, 2004.

YASUI, H.; SHIDA, K.; MATSUZAKI, T.; YOKOKURA, T. Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, Dordrecht, v. 76, n. 1, p. 383-389, 1999.

YOON, I. K.; STERN, M. D. Influence of direct-fed microbials on ruminal microbial fermentation and performance of ruminants: A review. **Journal of Animal Science**, v. 8, p. 533- 555, 1995.

WIEDMEIER, R. D., ARAMBEL, M. J.; WALTERS, J. L. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 2063, 1987.

ANEXOS

ANEXO 1

Soroconversões individuais de ovinos vacinados com uma bacterina de *Escherichia coli* suplementados com ração contendo probiótico de *B. cereus* var. *toyoi*.

Animal	Tratamento	Antígeno	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4	Coleta 5	Coleta 6	Coleta 7	Coleta 8
1	B. cereus	E. coli	1	0,81	0,88	0,77	0,47	0,39	0,94	3,38
2	B. cereus	E. coli	1	3,71	2,75	2,31	2,93	2,05	4,25	1,29
3	B. cereus	E. coli	1	1,7	1,75	1,66	1,21	1,04	1,21	2,11
4	B. cereus	E. coli	1	2,18	3,64	2	1,81	3,82	2,57	0,77
5	B. cereus	E. coli	1	1,16	1,14	0,5	0,87	1,13	1,28	1,05
6	B. cereus	E. coli	1	1,04	0,63	0,51	0,47	0,7	0,67	0,77
7	B. cereus	E. coli	1	0,89	0,69	0,75	0,42	0,87	0,75	1,13
8	B. cereus	E. coli	1	1,12	1,08	0,8	0,75	1,03	0,79	0,93
9	B. cereus	E. coli	1	0,41	0,62	0,6	0,38	0,7	0,69	1,53
10	B. cereus	E. coli	1	0,91	0,91	1,16	1,49	1,21	0,24	3,38

ANEXO 2

Soroconversões individuais de ovinos vacinados com vacina inativada oleosa de HVB-5 suplementados com ração contendo probiótico de *B. cereus* var. *toyoi*.

Animal	Tratamento	Antígeno	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4	Coleta 5	Coleta 6	Coleta 7	Coleta 8
1	B. cereus	HVB	1	1,44	1,13	2,61	1,86	2,28	2,11	3,22
2	B. cereus	HVB	1	0,88	1,05	2,5	1,71	2,94	1,16	2,72
3	B. cereus	HVB	1	1,23	2,21	3,01	2,15	2,19	2,82	1,88
4	B. cereus	HVB	1	1,06	1,49	2,97	1,48	4	3,31	1,65
5	B. cereus	HVB	1	1,36	2,04	4,04	2,44	4,68	2,41	2,75
6	B. cereus	HVB	1	1,42	1,6	3,01	3,43	3,4	2,3	3,76
7	B. cereus	HVB	1	1,12	1,04	0,96	1,45	2,04	1,77	1,34
8	B. cereus	HVB	1	1,21	2,51	1,97	1,92	2,92	1,85	3,92
9	B. cereus	HVB	1	1,53	2,33	3,98	2,31	1,97	4,01	3,75
10	B. cereus	HVB	1	1,05	1,05	3,56	2,96	2	0,64	2,64

ANEXO 3

Soroconversões individuais de ovinos vacinados com uma bacterina de *Escherichia coli* suplementados com ração contendo probiótico de *S. boulardii*.

Animal	Tratamento	Antígeno	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4	Coleta 5	Coleta 6	Coleta 7	Coleta 8
1	S. boulardii	E. coli	1	4,02	2,84	3,2	3,6	1,58	3,62	1,52
2	S. boulardii	E. coli	1	2,97	2,18	2,85	2,8	1,12	1,92	2,91
3	S. boulardii	E. coli	1	2,09	1,86	1,86	2,09	1,26	2,11	2,23
4	S. boulardii	E. coli	1	3,2	4,1	4	3,05	4	3,21	3,74
5	S. boulardii	E. coli	1	6,6	7,08	6,75	4,2	5,7	6,4	5,7
6	S. boulardii	E. coli	1	1,27	0,92	1,01	0,73	0,84	0,84	0,92
7	S. boulardii	E. coli	1	1,22	1,11	1,06	0,37	0,86	1,15	1,2
8	S. boulardii	E. coli	1	1,27	0,97	1,05	1,08	0,61	0,39	1,36
9	S. boulardii	E. coli	1	0,65	1,01	0,98	0,75	0,91	0,87	1,3
10	S. boulardii	E. coli	1	1,26	1,32	1,59	1,4	1,34	1,37	1,59

ANEXO 4

Soroconversões individuais de ovinos vacinados com vacina inativada oleosa de HVB-5 suplementados com ração contendo probiótico de *S. boulardii*.

Animal	Tratamento	Antígeno	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4	Coleta 5	Coleta 6	Coleta 7	Coleta 8
1	S. boulardii	HVB	1	2,52	1,08	1,81	1,56	1,69	2,53	2,58
2	S. boulardii	HVB	1	3,70	3,60	3,87	2,47	3,84	4,20	4,56
3	S. boulardii	HVB	1	2,52	2,84	3,07	3,55	3,55	2,21	3,48
4	S. boulardii	HVB	1	1,41	1,32	1,12	1,24	1,14	0,57	1,12
5	S. boulardii	HVB	1	2,28	2,42	1,66	2,24	2,38	1,17	2,21
6	S. boulardii	HVB	1	0,96	1,08	1,08	0,48	0,95	0,72	1,04
7	S. boulardii	HVB	1	1,06	1,16	1,32	1,08	1,40	1,07	1,61
8	S. boulardii	HVB	1	0,96	1,20	1,46	0,78	1,49	1,44	1,78
9	S. boulardii	HVB	1	1,24	1,01	0,98	1,40	1,30	1,51	0,94
10	S. boulardii	HVB	1	1,10	0,85	0,50	1,46	1,33	1,76	0,85

ANEXO 5

Soroconversões individuais de ovinos vacinados com uma bacterina de *Escherichia coli* sem suplementação na ração.

Animal	Tratamento	Antígeno	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4	Coleta 5	Coleta 6	Coleta 7	Coleta 8
1	Controle	E. coli	1	1,45	1,33	0,81	1,13	1,20	1,08	1,20
2	Controle	E. coli	1	1,11	0,49	0,69	0,77	0,65	0,62	0,73
3	Controle	E. coli	1	0,72	0,45	0,63	0,58	0,53	0,51	0,73
4	Controle	E. coli	1	1,54	0,68	1,09	0,85	0,73	1,31	1,14
5	Controle	E. coli	1	1,11	0,42	0,62	0,56	0,74	0,76	0,80
6	Controle	E. coli	1	0,95	1,30	0,96	1,50	2,13	2,08	1,74
7	Controle	E. coli	1	1,08	0,89	1,11	0,70	0,70	0,69	0,59
8	Controle	E. coli	1	2,07	1,29	1,76	1,37	1,24	1,63	0,88
9	Controle	E. coli	1	0,90	0,48	0,95	1,07	0,89	1,08	0,69
10	Controle	E. coli	1	0,90	0,78	0,81	0,71	0,76	0,94	0,78

ANEXO 6

Soroconversões individuais de ovinos vacinados com vacina inativada oleosa de HVB-5 sem suplementação na ração.

Animal	Tratamento	Antígeno	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4	Coleta 5	Coleta 6	Coleta 7	Coleta 8
1	Controle	HVB	1	1,73	1,89	1,73	1,95	1,44	2,10	2,24
2	Controle	HVB	1	0,92	0,56	1,31	0,66	0,80	0,87	1,02
3	Controle	HVB	1	1,10	1,10	1,05	1,02	0,80	1,13	1,22
4	Controle	HVB	1	0,99	1,11	1,12	0,49	1,00	1,16	0,43
5	Controle	HVB	1	1,24	1,56	1,93	1,05	1,82	2,00	1,62
6	Controle	HVB	1	0,88	1,02	1,15	0,96	1,15	1,18	1,28
7	Controle	HVB	1	1,06	0,86	0,93	0,84	1,07	1,10	1,16
8	Controle	HVB	1	1,25	0,88	0,92	0,77	1,29	1,30	1,96
9	Controle	HVB	1	1,33	1,41	0,86	0,95	0,85	0,95	1,26
10	Controle	HVB	1	1,00	1,07	0,96	1,34	1,69	1,68	1,83