



EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAESENSIS* NA RESPOSTA IMUNE DE FRANGOS VACINADOS CONTRA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS

CAMILA VON MÜHLEN¹; PAOLA DE FREITAS FELTRIN²; ALINE PICCINI ROLL³; NEIDA CONRAD⁴; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁵; VICTOR FERNANDO BÜTTOW ROLL⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – camila_vonmuhlen@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – paolafeltrin@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – apiroll@yahoo.es

⁴Universidade Federal de Pelotas – conradneida@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – roll2@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, produzem efeitos benéficos no hospedeiro (HILL et al., 2014). Podem atuar na prevenção e tratamento de doenças como imunomoduladores, bem como estimular o crescimento de animais (COPPOLA, 2004). Pesquisas realizadas ao longo dos últimos anos demonstram resultados promissores pela adição de probióticos na dieta de frangos de corte (DA SILVA & PINHEIRO, 2008).

Bactérias do gênero *Bacillus* sp. tem a capacidade de esporular, apresentam estabilidade ao calor e são capazes de sobreviver a barreira gástrica, sendo usadas em rações animais, suplementos dietéticos para humanos e em medicamentos registrados (CUTTING, 2011). *Bacillus toyonensis* é amplamente utilizado na alimentação animal, para melhorar variáveis fisiológicas, além de exercer imunomodulação da resposta vacinal aumentando sua eficácia (SANTOS et. al., 2020). Por sua vez o *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) é um bastonete Gram-positivo, entomopatogênico e destaca-se como a principal bactéria utilizada no controle biológico (ANGELO et al., 2010). Entretanto, suas características probióticas e seu efeito modulador da resposta imune ainda não estão bem descritos.

Um dos principais limitantes à produção de frangos de corte é o controle de agentes infecciosos, dentre eles destaca-se o Vírus da Bronquite Infecciosa das galinhas (IBV). A Bronquite Infecciosa das galinhas é uma doença respiratória aguda e altamente contagiosa, responsável por problemas de bem-estar e perdas econômicas significativas na avicultura mundial (SILVA & WINCK, 2016). Apesar da disponibilidade de vacinas, estas apresentam falhas na indução de proteção a longo prazo e a isolados distintos da estirpe vacinal (LIU et al., 2009), tornando essencial o desenvolvimento de novas estratégias de vacinação para frangos de corte.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação com *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses* na resposta imune de frangos de corte vacinados contra IBV.

2. METODOLOGIA

Para a produção do suplemento, *B. thuringiensis* var. *israelenses* (Bti) foi semeado em meio BHI ágar (Brain Heart Infusion, Difco) e incubado por 24 h à 28

°C. Após crescimento, colônias isoladas foram inoculadas em 200 mL de meio BHI e incubados em agitador orbital a 200 rpm durante 24h. Os cultivos foram inoculados em 4L de meio NYSM (Nutrient Yeast Extract Salt Medium) a 28 °C sob agitação (250 rpm) e aeração (1vvm), por 72 h. As células foram recuperadas por centrifugação a $6000 \times g$ por 20 min e concentrados em um volume final de 1L de solução salina fosfatada (PBS).

A vacina experimental contra IBV, é baseada em células de *E. coli* BL21 (DE3) expressando a proteína N de IBV (FINGER et al., 2016). Para avaliar o efeito do probiótico na resposta à vacina, foram utilizados pintos de corte, com um dia de vida (machos e fêmeas) da linhagem comercial Cobb. Os animais foram distribuídos randomicamente em 2 grupos, contendo 12 animais em cada: 1. Vacinados e Suplementados; 2. Vacinados e Não Suplementados. A suplementação contendo 1×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) de Bti por g de ração ocorreu durante todo o período experimental (dia 1 a 42). Os animais foram vacinados com a bacterina recombinante adsorvida em 10% de Hidróxido de Alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$), via intramuscular, nos dias 7 e 28. Amostras de sangue para obtenção do soro foram coletadas a partir de punção na veia ulnar nos dias 7, 21, 28, 35 e 42. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPEL (CEEA: 9053).

A resposta imune humoral foi avaliada através de ensaio imunoenzimático (ELISA). Placas de 96 cavidades (CRAL®, Brasil) foram sensibilizadas com a bacterina recombinante (1×10^6 UFC/cavidade), diluído em tampão carbonato bicabornato (pH 9,8), por 18 h a 4 °C. Os soros, coletados no dia 42, foram avaliados em pool e diluídos de 1:200 a 1:6400 e adicionados nas placas, em triplicata. A seguir foi adicionado o anticorpo conjugado anti-IgG de galinha, diluído 1:6000 em PBS e incubados por 1h a 37 °C. Por fim, foi adicionado 100 µL de solução de revelação (10 mL de tampão para substrato, 0,004g de Ortho-Phenylenediamine (Sigma-Aldrich) e 15µL de H_2O_2). As placas foram incubadas por 15 min no escuro à temperatura ambiente. Para interromper a reação, foram adicionados 50 µL/cavidade de H_2SO_4 . Entre cada etapa as placas foram incubadas a 37 °C e lavadas 3X PBS-T. As absorbâncias foram medidas em leitor de microplacas EZ Read 400 (Biochrom, UK) com filtro de 492 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos relatam que a suplementação com probióticos a base de *Bacillus subtilis* fmbJ e *Bacillus subtilis* BYS2 incrementaram a resposta imune humoral (IgG) em frangos de corte (BAI et al., 2017; DONG et al., 2020). Os estudos de Ahmed et al. (2014) e Luan et al. (2019) utilizando probióticos a base de *Bacillus amyloliquefaciens*, também observaram aumento nos níveis de IgG em frangos de corte comparado com o grupo controle, não suplementado.

Neste trabalho foi avaliado o efeito da suplementação com *B. thuringiensis* var. *israelenses* na resposta imune humoral de frangos de corte vacinados contra IBV. Observou-se que a vacina experimental apresentou imunogenicidade em ambos os grupos, suplementados ou não. Na titulação dos anticorpos coletados ao final do estudo (dia 42), o grupo que recebeu a suplementação com *B. thuringiensis* var. *israelenses* apresentou anticorpos até o título de 3200, enquanto o grupo não suplementado apresentou título de 800 (Figura 1). Estes resultados sugerem que a suplementação teve efeito imunomodulador à vacinação contra IBV.

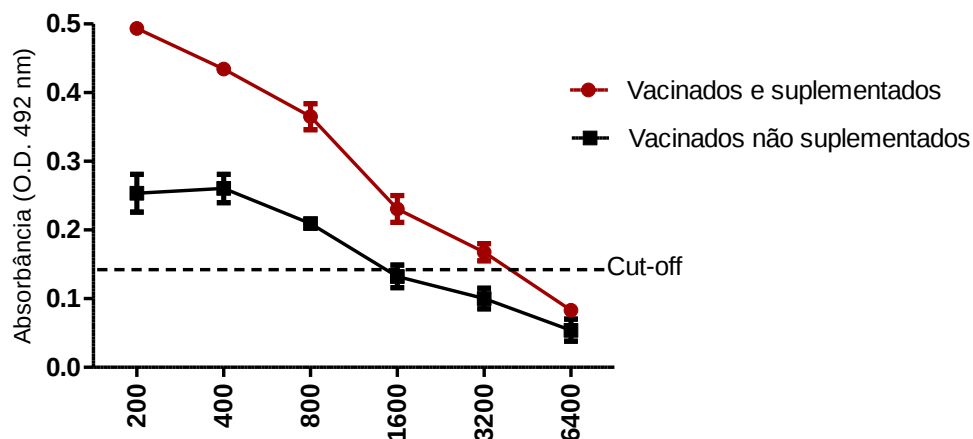


Figura 1. Titulação da IgG total específica contra a bacterina expressando proteína rN de IBV. Os dados representam a média das absorbâncias (+/- desvio padrão) dos títulos de IgG em frangos de corte suplementados com *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses* e controles vacinados contra IBV. O *cut-off* foi determinado na média dos valores obtidos no dia 0 mais 3 vezes o desvio padrão.

4. CONCLUSÕES

Frangos de corte suplementados com *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses* apresentaram título de anticorpos superior ao grupo não suplementado, sugerindo que a suplementação teve efeito imunomodulador na resposta à vacina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S.T.; ISLAM, MD. M.; MUN, H-S.; SIM, H-J.; KIM, Y-J.; YANG, C-H. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora, and fecal noxious gas emissions of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 93, p.1963–1971, 2014.

ANGELO, E.A.; VILAS-BOAS, G.T.; CASTRO-GÓMEZ, R.J.H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.31, n.4, p.945-958, 2010.

BAI, K.; HUANG, Q.; ZHANG, J.; HE, J.; ZHANG, L.; WANG, T. Supplemental effects of probiotic *Bacillus subtilis* fmbJ on growth performance, antioxidant capacity, and meat quality of broiler chickens. **Poultry Science**, v.96, n.1, p.74-82, 2017.

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

CUTTING, S. M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**, v.28, p.214-220, 2011.

DA SILVA, C.R.; PINHEIRO, A.L.B.C. Utilização de probióticos como melhoradores de desempenho em aves. **Revista eletrônica Nutritime**, v. 5, n.6, p. 690-706, 2008.



DONG, Y.; LI, R.; LIU, Y.; MA, L.; ZHA, J.; QIAO, X.; CHAI, T.; WU, B. Benefit of Dietary Supplementation with *Bacillus subtilis* BYS2 on Growth Performance, Immune Response, and Disease Resistance of Broilers. **Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020**, 2020.

FINGER, P.; DUMMER, L.; PEPE, M.S.; MAGALHAES, C.G.; ESTEVES, P. A.; LEITE, F.L.; CONCEIÇÃO, F.R.; HUBNER, S. Metodologia para expressão da glicoproteína S1 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas em sistemas procarioto e eucarioto. **Science and Animal Health**, v. 4, p. 81-90, 2016.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G.R.; MERENSTEIN, D.J.; POT, B. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.11, n.8, p.506-514, 2014.

LIU, S.; ZHANG, X.; WANG, Y.; LI, C.; LIU, Q.; HAN, Z.; ZHANG, Q.; KONG, X.; TONG, G. Evaluation of the protection conferred by commercial vaccines and attenuated heterologous isolates in China against the CK/CH/LDL/97I strain of infectious bronchitis coronavirus. **Veterinary Journal**, v.179, n.1, p.130-136, 2009.

LUAN, S.J.; SUN Y.B.; WANG, Y.; SA, R.N.; ZHANG H.F. Spray de *Bacillus amyloliquefaciens* melhora o desempenho de crescimento, o estado imunológico e a barreira mucosa respiratória em frangos de corte. **Poultry Science**, Pequim, v.98, n.3, p.1403-1409, 2019.

SANTOS, F.D.S.; FERREIRA, M.R.A.; MAUBRIGADES, L.R.; GONÇALVES, V.S.; DE LARA, A.P.S.; MOREIRA, C.; SALVARANI, F.M.; CONCEIÇÃO F.R.; LEIVAS LEITE, F.P. *Bacillus toyonensis* BCT-7112^T transient supplementation improves vaccine efficacy in ewes vaccinated against *Clostridium perfringens* epsilon toxin. **Journal of Applied Microbiology**, 2020.

SILVA, G.N.M.S.; WINCK, C.A. Bronquite Infecciosa Aviária: Revisão de Literatura. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v.16, n.1, p.1, 2016.