



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LETICIA SAYURI MURATE

**EFEITO DE PREBIÓTICOS, PROBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS
NA DIETA DE AVES DESAFIADAS COM *SALMONELLA*
ENTERICA SUBSPÉCIE *ENTERICA* SOROVAR
ENTERITIDIS:
ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS, HISTOLÓGICAS E
IMUNOLÓGICAS**

LETICIA SAYURI MURATE

**EFEITO DE PREBIÓTICOS, PROBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS
NA DIETA DE AVES DESAFIADAS COM *SALMONELLA*
ENTERICA SUBSPÉCIE *ENTERICA* SOROVAR
ENTERITIDIS:
ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS, HISTOLÓGICAS E
IMUNOLÓGICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Área de Concentração em Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina como do requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Massami Shimokomaki

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca
Central da Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M972e Murate, Leticia Sayuri.

Efeito de prebióticos, probióticos e simbióticos na dieta de aves desafiadas com *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar enteritidis : análises microbiológicas, histológicas e imunológicas / Leticia Sayuri Murate. – Londrina, 2014.
54 f. : il.

Orientador: Massami Shimokomaki.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Ave – Doenças – Teses. 2. *Salmonella enteritidis* – Teses. 3. Bactérias patogênicas – Teses. 4. Rações – Aditivos – Teses. I. Shimokomaki, Massami. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:636.5

LETICIA SAYURI MURATE

**EFEITO DE PREBIÓTICOS, PROBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS NA
DIETA DE AVES DESAFIADAS COM *SALMONELLA ENTERICA*
SUBSPÉCIE *ENTERICA* SOROVAR ENTERITIDIS:
ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS, HISTOLÓGICAS E IMUNOLÓGICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Área de Concentração em Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção de título de Doutor em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Massami Shimokomaki
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Luci Sayori Murata
Universidade de Brasília - UnB

Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior
Universidade Estadual Paulista "Julio de
Mesquita Filho" (Campus Jaboticabal) - UNESP

Prof. Dr. Emerson José Venancio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Ana Paula F. R. L. Bracarense
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 31 de março de 2014.

AGRADECIMENTOS

À minha família, meu pai Carlos, mãe Sonia, irmãs Patrícia e Marcia pelo amor, paciência e apoio durante a realização do curso.

Ao Prof. Dr. Massami Shimokomaki pela oportunidade e confiança em realizar este trabalho.

Aos professores (as): Dr. Angelo Berchieri Junior, Dr^a Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense, Dr. Emerson Jose Venancio, Dr^a Sueli Fumie Yamada Ogatta, Dr^a Lucy Megumi Yamauchi Lioni e Dr. Alexandre Oba pelo incentivo, disponibilidade, apoio e sugestões.

Aos pós-doutorandos: Dr^a. Fernanda Gonzales Paião e Dr. Alexandre Tadachi Morey pelo apoio e sugestões.

Aos amigos (as) da UNESP, campus Jaboticabal: Pricila Diniz Lopes, Adriana Almeida, Janine Denadai, Rafael A. C. Penha Filho, Oliveira C. de Freitas Neto e Diego F. A. Batista.

Aos amigos (as) do Laboratório de Anatomia Patológica, UEL: Thalísie do Carmo Drape, Elisângela Olegário, Karina Basso, Rogério Marcasso, Isabela Domiciniano, Juliana Rubira, Victor Marutani e Fernando C. Gomes.

Aos amigos (as) do Laboratório de Imunologia IV, UEL: Miriele e Eduardo.

Aos amigos (as) do Laboratório NIP 5, UEL: Alexandre Tadachi Morey, Caio F. de Oliveira, Eliane S. Otaguiri, Eliandro R. Tavares, Virgínia P. Santos, Pollyana M. C. dos Santos, Danielle Kian, César A. C. Lancheros, Carline Longhi, Caroline S. Azevedo, Marina Bosini, Jussevânia P. Santos, Mayara Fernandes, Ana Elisa B. Morguette, Renata P. Biasi e Ediel.

Aos amigos (as) da turma do doutorado: Micheli Frehse, Liza Ogawa e Luiz Gustavo Alessi Aristides pelas conversas e muitas risadas.

Ao meu noivo Wilson, pela paciência e compreensão.

Ao prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri por sempre estar disposto a ajudar os alunos da pós-graduação.

As professoras Dr^a Alice Alfieri e Dr^a Lucienne Preto-Giordano pela ajuda nos momentos difíceis.

A Helenice, secretária da pós-graduação pela disponibilidade em ajudar.

As amigas Graziela G. Romagnoli, Sílvia F. Mardegan, Erika Izumi e Graciele Shiozawa e ao amigo Wanner Galves pelo incentivo.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

MURATE, Leticia Sayuri. **Efeito de prebióticos, probióticos e simbióticos na dieta de aves desafiadas com *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis**: análises microbiológicas, histológicas e imunológicas. 2014. 54f. Tese (Pós-Graduação em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

Dentre os sorovares mais importantes causadores do paratifo aviário encontra-se *Salmonella* Enteritidis, que possui grande importância em saúde pública e econômica, por estar ligada principalmente a produtos de origem avícola. No sentido de garantir a qualidade sanitária de produtos sem o uso de antimicrobianos, faz-se necessário a busca por alternativas aos promotores de crescimento. Nesse contexto podem ser utilizados aditivos alimentares, tais como os prebióticos, probióticos e simbióticos. Avaliou-se o efeito de um prebiótico, probiótico e simbiótico adicionados à ração de frangos de corte e poedeiras desafiadas com *Salmonella* Enteritidis resistente ao ácido nalidíxio e espectomicina (SE Nal^r Spec^r) com 1 dia de vida. Utilizou-se quatro tratamentos: controle (sem adição de aditivo), probiótico (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium longum*), prebiótico (inulina, fruto-oligossacarídeo, mananaoligossacarídeo e oligossacarídeo) e simbiótico (85% de probiótico e 15% de prebiótico). Para análises microbiológicas, analisou-se suabes de cloaca e contagem de SE Nal^r Spec^r de conteúdo cecal. Somente em frangos de corte fez-se análises de morfologia intestinal (escore morfológico e altura de vilosidades) por coloração de hematoxilina e eosina, quantificação de imunoglobulinas (Ig) M (IgM), G (IgG) e A (IgA) através de ensaios imunoenzimáticos e expressão relativa dos genes, interleucina 1 β (IL-1 β), sintetase do óxido nítrico induzível (iNOS), interleucina 10 (IL-10), interferon- γ (IFN- γ) e interleucina 4 (IL-4) utilizando-se a técnica de PCR em tempo real. Observou-se nas análises microbiológicas diminuição significativa de SE Nal^r Spec^r somente com o tratamento prebiótico tanto em frangos de corte quanto em poedeiras na primeira semana pós-infecção. Os grupos prebiótico e probiótico tiveram melhor ação na preservação do epitélio intestinal. Todos os aditivos testados contribuíram para o aumento da altura das vilosidades. E também como imunomoduladores, tanto na dosagem de imunoglobulinas séricas e expressão dos genes da toncila cecal.

Palavras-chave: Bactéria patogênica. Aditivos alimentares. Aves.

MURATE, Leticia Sayuri. **Effect of prebiotics, probiotics and synbiotics in the diet of birds challenged with *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis**: microbiological, histological and immunological analyzes. 2014. 54p. Thesis (Doctor's Degree in Animal Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

The most important serovar that cause avian paratyphoid disease is *Salmonella* Enteritidis, which has great economic and public health importance, and is related mainly to products of poultry origin. To ensure high health quality products without the use of antimicrobials, it is necessary to search for alternatives to growth promoters. In this context, feed additives such as prebiotics, probiotics and synbiotics may be used. The effect of a prebiotic, probiotic and synbiotic added to the feed of broilers and laying hens challenged with *Salmonella* Enteritidis resistant to nalidixic acid and spectinomycin (SE Nal^r Spec^r) with 1 day old were analyzed. We used four treatments: control (without additive), probiotic (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium longum*), prebiotics (inulin, fructo-oligosaccharide, oligosaccharide and mananoligosaccharide) and symbiotic (85% probiotic and prebiotic 15%). For microbiological analysis, we analyzed cloacal swabs and count SE Nal^r spec^r of cecal contents. Only in broilers became intestinal morphology analysis (morphological score and villi height) by hematoxylin and eosin staining, quantification of immunoglobulins (Ig) M (IgM), G (IgG) and A (IgA) by immunoenzymatic tests and relative gene expression of the genes, interleukin-1 β (IL-1 β), inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin 10 (IL-10), interferon- γ (IFN- γ) and interleukin 4 (IL-4) using real time PCR. The results of these analyzes showed a significant decrease in SE Nal^r Spec^r only with prebiotic treatment both in broilers and laying at first week post-infection. The prebiotic and probiotic groups were that better act in the preservation of intestinal epithelium. All the additives tested contributed to the increase in villus height. And also as the immunomodulators, both the dosage of serum immunoglobulins and expression of cecal tonsil's genes.

Keywords: Pathogenic bacteria. Feed additives. Birds.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1 - Basal composition and nutrient content per 100 kilogram of broiler diet.....	31
Table 2 - Composition of the diet feed additives.....	31
Table 3 - The presence <i>Salmonella</i> Enteritidis in cloacal swabs analyzed at 7, 14 and 21 days post-infection (dpi) from laying hens and broilers (experiment 1) and broilers (experiment 2) fed rations with either prebiotic, synbiotic or probiotic additives.....	32
Table 4 - Experiment 1 cecal results from laying hens giving the viable number (\log_{10}) of SE Nal ^r Spec ^r bacteria in the cecal contents analyzed at 7, 14 and 21 days post-infection	32
Table 5 - Experiment 2 cecal results from broilers giving the viable number (\log_{10}) of SE Nal ^r Spec ^r bacteria in the cecal contents analyzed at 5, 7, 14 and 21 days post-infection.....	33

ARTIGO 2

Tabela 1 - Tratamentos e dosagem dos aditivos	37
Tabela 2 - Sequência e temperatura de hibridação dos oligonucleotídeos GAPDH, IFN- γ , iNOS, IL10, IL4 e IL1 β utilizados para análise da expressão relativa de genes.....	39
Tabela 3 - Volume e concentração dos componentes utilizados na reação de PCR quantitativa em tempo real para os genes GAPDH, IFN- γ , iNOS, IL10, IL4 e IL1 β (μ L)	40
Tabela 4 - Parâmetros utilizados na fase de amplificação (40 ciclos) e temperatura de melting dos genes GAPDH, IFN- γ , iNOS, IL10, IL4 e IL1 β	40

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 2

- Figura 1** - Efeito do tratamento com prebiótico, probiótico e simbiótico sobre a morfologia intestinal de aves desafiadas com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis aos 2, 5, 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção (dpi) na região do duodeno, jejuno, íleo e ceco. Up= aumento significativo ao $P < 0,05$ e down= diminuição significativa ao $P < 0,05$, analisando-se com o tratamento controle.....42
- Figura 2** - Efeito do tratamento com prebiótico, probiótico e simbiótico sobre a altura das vilosidades de aves desafiadas com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis aos 2, 5, 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção (dpi) na região do duodeno, jejuno e íleo. Up= aumento significativo ao $P < 0,05$ e down= diminuição significativa ao $P < 0,05$, analisando-se com o tratamento controle.43
- Figura 3** - Efeito do tratamento com prebiótico, probiótico e simbiótico sobre a concentração de imunoglobulinas séricas das classes IgM, IgG e IgA de aves desafiadas com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis aos 2, 5, 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção (dpi). Up= aumento significativo ao $P < 0,05$ e down= diminuição significativa ao $P < 0,05$, analisando-se com o tratamento controle.....44
- Figura 4** - Efeito do tratamento com prebiótico, probiótico e simbiótico sobre a expressão dos genes IL1 β , iNOS, IFN- γ , IL4 e IL10 da toncila cecal de aves desafiadas com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis aos 2, 5, 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção (dpi). Up= aumento significativo ao $P < 0,05$ e down= diminuição significativa ao $P < 0,05$, analisando-se com o tratamento controle.....45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BGA Nal/Spec	Agar verde brilhante com ácido nalidíxico e espectomicina
Dpi	Dias pós-infecção
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato deidrogenase
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulinas
iNOS	Sintetase do óxido nítrico
Nal ^r Spec ^r	Resistente ao ácido nalidíxico e espctomicina
SE	<i>Salmonella</i> Enteritidis
SN	Caldo selenito

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	CLASSIFICAÇÃO DE <i>SALMONELLA</i> SPP	12
2.2	SALMONELOSES E SUA IMPORTÂNCIA NA AVICULTURA	12
2.3	SISTEMA IMUNE	13
2.4	PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS.....	16
3	OBJETIVOS	18
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4	ARTIGO A – Efficacy of prebiotics, probiotics and synbiotics on laying hens and broilers challenged with <i>Salmonella</i> Enteritidis	19
5	ARTIGO B – Efeito de aditivos alimentares sobre a morfologia intestinal e sistema imune de frangos de corte desafiados com <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	34
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
	REFERÊNCIAS	49
	APÊNDICE	52
	APÊNDICE 1 - Critérios para determinação do escore histológico do intestino delgado.....	53
	APÊNDICE 2 - Critérios para determinação do escore histológico do intestino grosso	54

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira ocupa lugar de destaque no mercado mundial como produtor de carne de frango. Sendo desde 2004 o maior exportador e a partir de 2011 o terceiro maior produtor, atrás dos Estados Unidos e China (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, 2014). Apesar do rápido crescimento da indústria avícola ter proporcionado uma fonte de proteína rapidamente disponibilizada e de custo reduzido, por outro lado a criação intensiva dos animais de produção gerou um aumento na taxa de infecção das aves e consequentemente a contaminação das carcaças (TESSARI et al., 2003).

Dentre os microrganismos presentes em frangos e que causam doenças em humanos relacionadas ao consumo de carnes contaminadas, se destacam as bactérias do gênero *Salmonella* (SILVA; DUARTE, 2002). O gênero *Salmonella* engloba sorovares que podem causar infecções alimentares em seres humanos e possuem grande importância em saúde pública. Sorovares de *Salmonella* são patógenos intracelulares capazes de causar doenças em aves e mamíferos (FORTES et al., 2012). Contudo, sorovares da espécie *Salmonella enterica*, como Enteritidis e Typhimurium causam infecções em seres humanos mas possuem pouco ou nenhum impacto sob a saúde ou produtividade de aves adultas (CALLAWAY et al., 2004).

Os antimicrobianos foram utilizados em larga escala na avicultura durante décadas. Apesar de serem usados terapêuticamente para melhorar a saúde e o bem-estar animal, a maioria foi administrada com propósitos profiláticos para aumentar a taxa de crescimento e a eficiência da conversão alimentar. A emergência de micro-organismos resistentes a antimicrobianos fez com que em 2006 a União Europeia proibisse o uso de antibióticos como promotores de crescimento. Em outros países como os Estados Unidos da América, existe grande pressão do mercado consumidor sobre a indústria avícola para criação sem esses produtos (HUYGHEBAERT; DUCATELLE; VAN IMMERSSEEL, 2011).

A busca por soluções alternativas aos antimicrobianos tem sido objeto de interesse de muitas pesquisas, no sentido de garantir a qualidade sanitária sem o uso de antimicrobianos e para contribuir com a manutenção dos produtos avícolas nacionais em um patamar aceitável nas negociações internacionais (QUEVEDO, 2006). Com essas preocupações faz-se necessário a busca por

alternativas aos promotores de crescimento e nesse contexto podem ser utilizados os prebióticos, probióticos e simbióticos. Estes produtos atuam diretamente na microbiota normal das aves a qual interage com o sistema imune das mesmas, realizando mudanças durante o seu desenvolvimento (CUNNINGHAN-RUNDLES, 2004). Mas o fato é que até o momento os antimicrobianos continuam sendo empregados na avicultura, pois não foi encontrado um substituto que mantivesse o baixo custo e os altos níveis de produção alcançados até o momento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CLASSIFICAÇÃO DE *SALMONELLA* SPP

O gênero *Salmonella* pertence a família *Enterobacteriaceae*, são bactérias aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, bastonetes Gram-negativas e oxidase negativa e a maioria possui flagelo peritríquio. O gênero é dividido em duas espécies: *Salmonella enterica* e *S. bongori*. *Salmonella enterica* é dividida em seis sub-espécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, *S. enterica* subsp. *indica* (FORSHELL; WIERUP, 2006).

A nomenclatura para sorovares de *Salmonella* spp. é complexa e os cientistas utilizam diferentes sistemas para se referir a este gênero (VELGE; CLOECKAERT; BARROW, 2005). A nomenclatura a ser utilizada neste trabalho se refere em nomes para os sorovares e subespécies, por exemplo, *Salmonella enterica* subsp *enterica* sorovar Enteritidis que ficará *Salmonella* Enteritidis (SE).

2.2 SALMONELOSES E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA NA AVICULTURA

Vários sorovares de *Salmonella* spp. podem infectar as aves, causando três enfermidades distintas. A pulorose, cujo agente é *Salmonella Pullorum*; o tifo aviário causado por *S. Gallinarum* e o paratifo aviário causado por qualquer outro sorovar que não seja biovar *Pullorum* ou biovar *Gallinarum* (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

Dentre os sorovares mais importantes causadores do paratifo aviário encontra-se *Salmonella* Enteritidis, que se tornou uma questão de saúde pública de grande importância econômica, ligada principalmente a produtos de origem avícola (HUMPHREY, 2004). A susceptibilidade a *Salmonella* diminui com a idade e aves adultas podem converter-se em portadoras assintomáticas da bactéria através da colonização entérica (RANTALA, 1973). A detecção de *Salmonella* em produtos de origem avícola pode levar a rejeição de grandes remessas de carne de frango, trazendo um grande impacto econômico (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). A ausência de determinados micro-organismos causadores de zoonoses, tais como as salmonelas,

em produtos de origem animal específicos é uma exigência de regulamentos nacionais e internacionais. Em vista disso, no Brasil existe o "Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA)" que definem ações que possibilitem a certificação sanitária do plantel avícola nacional e também, favorecer a elaboração de produtos avícolas saudáveis para o mercado interno e externo. E internacionalmente existem manuais, tais como o "Guidelines on detection and monitoring of *Salmonella* infected poultry flocks with particular reference to *Salmonella* Enteritidis" que tem como objetivo monitorar *Salmonella* Enteritidis em aves (WRAY; DAVIES, 1994).

O sistema intensivo de criação adotado em avicultura industrial favorece a introdução, instalação, permanência e disseminação de salmonelas. Mesmo com todos os cuidados de monitoramento e controle de salmonelas, estas podem ser facilmente reintroduzidas em plantéis avícolas, através de roedores, insetos e aves silvestres (GUARD-PETTER, 2001).

2.3 SISTEMA IMUNE

O sistema imune das aves é parecido com o de mamíferos apresentando algumas diferenças tais como, ausência de linfonodos e presença de um órgão linfóide específico denominado Bursa de Fabricius. A estrutura e a distribuição dos tecidos linfóides das aves diferem daquelas existente em mamíferos. Por exemplo; o timo das aves é constituído por vários lobos separados e também a glândula de Harder que é uma aglomeração óculo-nasal especial de tecido linfóide. Ainda, a organização do tecido linfóide junto ao intestino é diferente da encontrada em mamíferos, sendo que a principal distinção é a presença, nas aves, da Bursa de Fabrícus, onde ocorrem os estágios finais do desenvolvimento e a diferenciação dos linfócitos B (BERCHIERI JUNIOR; FREIAS NETO, 2009). Os órgãos linfóides que participam do sistema imunológico das aves podem ser divididos em órgão linfóides primários que consistem na medula óssea, bursa de Fabricius e timo, e os órgãos linfóides secundários os quais são o baço, Placa de Peyer, glândula de Harder, CALT (tecido linfóide associado à conjuntiva), BALT (tecido linfóide associado aos brônquios) e o GALT (tecido linfóide associado ao intestino) (SCOTT, 2004).

O sistema imune pode ser dividido sob o ponto de vista funcional em duas partes: imunidade inata e imunidade adquirida ou adaptativa. A imunidade inata é caracterizada por não apresentar especificidade com antígenos, memória,

duração mais prolongada e ser menos eficiente na destruição e eliminação de agentes infecciosos. Esta compreende quatro tipos de barreiras de defesa: anatômica e física, fisiológica, fagocítica e endocítica e inflamatórias (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2002), as quais são de grande importância pois é a primeira linha de defesa contra patógenos. O sistema imune adaptativo se expressa por meio das respostas imunes humorais, onde os principais mediadores são os anticorpos e as respostas imunes mediadas por citocinas. Este sistema possui como características o reconhecimento, especificidade e memória imunológica, o que permite ao organismo hospedeiro responder mais rapidamente e com maior intensidade a partir de um segundo desafio realizado por um dado patógeno (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

Segundo Goldsby, Kindt e Osborne (2002), as barreiras da imunidade inata agem como: 1) barreira anatômica e física, as membranas mucosas possuem mecanismos de defesa contra microrganismos que agem como barreira mecânica retardando a entrada dos mesmos, ambiente ácido que reduz o crescimento de alguns patógenos, flora normal que compete com micro-organismos patogênicos pelos sítios de ligação e nutrientes, produção de muco que ajudam a expelir microrganismos estranhos; 2) barreira fisiológica impede o crescimento de alguns microrganismos através da temperatura, acidez, lisozimas (rompe parede celular bacteriana), interferon (induz um estado antiviral em células não infectadas), ação dos sistema complemento (lisa os microrganismos ou facilita a fagocitose); 3) A barreira fagocítica/endocítica age internalizando (endocitose) e degrada macromoléculas estranhas. As células especializadas (monócitos sanguíneos, macrófagos tissulares, entre outros) internalizam (fagocitose), eliminando microrganismos patogênicos; 4) barreira inflamatória inicia-se quando ocorre dano e/ou infecção tissular induzindo o vazamento de fluido vascular contendo proteínas séricas com atividade antibacteriana e influxo de células fagocíticas na área afetada.

O sistema imune adaptativo das aves, assim como nos vertebrados, é dividido em imunidade humoral e celular. A resposta imune humoral é caracterizada pela participação de anticorpos, destacando-se as imunoglobulinas (Ig) das classes IgG, IgM e IgA, que são secretadas pelos linfócitos B após o contato e reconhecimento de antígenos. A resposta imune celular é caracterizada pela participação dos linfócitos T efetores, T citotóxicos e T secretores de interleucinas

pró-inflamatórias que se desenvolvem após estímulo antigênico. Ainda, deve ser destacado que o principal tipo de fagócitos polimorfonucleares em galinhas são os heterófilos, que são equivalentes dos neutrófilos de mamíferos e, à semelhança dessas últimas, os heterófilos exercem um papel muito significativo na fagocitose e morte de microrganismos patogênicos. A resposta humoral é mais apropriada para eliminação dos antígenos exógenos e a resposta celular para eliminação dos antígenos endógenos. As células efetoras da resposta humoral são as células plasmáticas que secretam os anticorpos solúveis (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

As imunidades inata e adaptativa agem em conjunto e cooperam para produzir uma imunidade mais eficaz. Quando um micro-organismo patogênico entra em contato com o macrófago estimula e conduz uma resposta imune adaptativa, através da exposição do antígeno para reconhecimento do mesmo pelas células T específicas ao antígeno e também pela secreção de citocinas. A imunidade adaptativa também produz sinais para estimular e aumentar a efetividade da resposta inata, algumas citocinas secretadas pelas células T aumentam a capacidade do macrófago de eliminar o micro-organismo patogênico em seu interior, quando ocorre a produção de anticorpos contra um patógeno tem efeito no recrutamento do sistema complemento para a defesa do hospedeiro (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2002).

A resposta imune contra *Salmonella* depende da espécie do hospedeiro e do sorovar de *Salmonella* a qual causou a infecção. A imunidade mediada por células é mais importante do que a resposta humoral na proteção contra *Salmonella* (MASTROENI et al., 1993). De acordo com estudos de Farnell et al. (2001), a administração intraperitoneal de IFN- γ recombinante diminuiu a colonização de órgãos internos em aves infectadas experimentalmente com *S. Enteritidis*. Em outro trabalho utilizando-se aves bursectomizadas e infectadas com *S. Enteritidis* observou-se aumento na excreção fecal e altas contagens de *Salmonella*, e contagem normal nos órgãos internos, indicando efeito protetor de IgA contra colonização intestinal (DESMIDT et al., 1998). Neste mesmo trabalho, a colonização do fígado e baço diminuiu no decorrer do tempo no grupo controle assim como nos animais bursectomizados, indicando outro mecanismo de resposta imune responsável pela eliminação sistêmica de *S. Enteritidis* em aves.

Em aves, heterófilos se acumulam na lamina própria do ceco dentro de 18h após a infecção por *S. Enteritidis* (VAN IMMENSEEL et al., 2002). Em

resposta a *S. Enteritidis*, heterófilos tem demonstrado aumentar a expressão de RNAm para as quimiocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 assim como as citocinas anti-inflamatórias transformando o fator de crescimento β -4, enquanto que diminui a expressão de IL-18 e IFN- γ (KOGUT et al., 2003).

2.4 PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS

O tratamento com antimicrobianos para controlar patógenos gastrointestinais podem modificar o ecossistema microbiano intestinal, alterando negativamente a saúde dos animais, desempenho e/ou segurança alimentar (CALLAWAY et al., 2004). Além disso, deve-se levar em consideração a preocupação do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento em animais de produção na seleção de resistência a antibióticos por micro-organismos patogênicos (WITTE, 2000). Com isso, existe a necessidade de buscar alternativas viáveis que poderiam melhorar os mecanismos de defesa naturais dos animais e reduzir o uso de antimicrobianos. Neste contexto, podem-se inserir produtos como prebióticos, probióticos e simbióticos. Ademais foi demonstrado no nosso laboratório que tais bióticos são nutricionalmente factíveis na substituição dos promotores de crescimento já que os índices zootécnicos das aves tratadas foram semelhantes aos dos animais alimentados com a ração sem aditivos, além de ter contribuído pela melhora da qualidade da carne (ARISTIDES et al., 2012).

Segundo Fuller (1989) o termo probiótico é definido como sendo um suplemento alimentar constituído por micro-organismos vivos capazes de beneficiar o hospedeiro através do equilíbrio da microbiota intestinal. Existem vários relatos dos efeitos benéficos do uso de probióticos em aves, tais como, melhora na performance animal (ZULKIFLI et al., 2000), modulação da microflora intestinal e inibição de *Salmonella enteritidis* (PASCUAL et al., 1999), mudanças histológicas no intestino (KABIR et al., 2005) e imunomodulação (NAYEBPOR; FARHOMAND; HASHEMI, 2007).

Os prebióticos são definidos como ingredientes alimentares que não são digeridos na porção proximal do trato gastrintestinal de animais monogástricos e que proporcionam efeito benéfico ao hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou metabolismo de um limitado grupo de bactérias no cólon (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Os prebióticos também possuem efeitos benéficos sob as

aves, atuando no bloqueio de sítios de aderência reduzindo a capacidade de fixação de algumas bactérias patogênicas a mucosa intestinal (PANG; XIE; LING, 2000), outra ação é sob a microbiota intestinal normal fornecendo nutrientes para a mesma e melhorando a saúde intestinal (BABU; RAYBOURNE, 2008).

O conceito de simbiótico alia o fornecimento de micro-organismos probióticos juntamente com substâncias prebióticas específicas que estimulem seu desenvolvimento e atividade, potencializando o efeito de ambos para o hospedeiro (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002). Existem trabalhos que relatam os efeitos benéficos dessa associação de produtos como por exemplo, diminuição da colonização do ceco por SE (FUKUTA; SASAI, 1999). E também já foi relatada diminuição da colonização por *Salmonella* Typhimurium em frangos de corte com o uso desses tipos de produtos (DONALSON et al., 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Propor alternativas eficazes no controle de salmonelas em aves através do incremento de aditivos alimentares à ração.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar contagem microbiológica em conteúdo cecal de SE em aves inoculadas com essa bactéria e tratadas com probióticos, prebióticos e simbióticos.
- Analisar a morfologia da mucosa intestinal dos frangos alimentados com probióticos, prebióticos e simbióticos através de microscopia;
- Avaliar os efeitos de aditivos alimentares (probióticos, prebióticos e simbióticos) sobre sistema imune de frangos mediante a quantificação dos níveis de imunoglobulinas e citocinas;

4 ARTIGO A

Efficacy of prebiotics, probiotics and synbiotics on laying hens and broilers challenged with *Salmonella* Enteritidis

Leticia Sayuri Murate¹, Fernanda Gonzales Paião², Adriana Maria de Almeida³, Angelo Berchieri Junior³, Massami Shimokomaki^{1,2}.

¹Departamento de Medicina Veterinária e Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

², Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Londrina, Londrina, PR, Brasil.

³Departamento de Patologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP, Brasil.

Running Title: *Salmonella* control in hens and broilers

Correspondence: Dr Massami Shimokomaki, Departamento de Medicina Veterinária e Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil, (E-mail: mshimo@uel.br)

Abstract

The objective of this work was to evaluate the efficacy of dietary prebiotic, probiotic and synbiotic products in controlling infection in laying hens and broiler chickens challenged with *Salmonella* Enteritidis (SE). These products may be able to replace the use of antibiotics, which would avoid the problem of eliciting antimicrobial resistance for both types of birds. *Salmonella*-free one-day-old layers chicks and broilers chicks were inoculated with SE resistant to nalidixic acid and spectinomycin (SE Nal^r Spec^r). The presence of SE Nal^r Spec^r in cloacal swabs was analyzed by isolating and counting the SE Nal^r Spec^r bacteria at 7, 14 and 21 days post-infection (dpi) in laying hens and broilers. The results showed that the prebiotic additive reduced the occurrence of SE in cloacal swabs from laying hens but not from broilers. The isolation and counts of SE Nal^r Spec^r were lower during the first week post-infection, but not throughout the experiment, in the groups of laying hens and broilers that received prebiotics. The probiotic and synbiotic additives did not influence the infection by SE in laying hens and broilers; in contrast prebiotics had a protective effect during the first week post-infection (dpi).

Keywords: pathogenic bacteria, prebiotics, probiotics, synbiotics, chickens.

Introduction

Salmonella is one of the most reported pathogenic bacteria found in the food production chain that affect human health (Mead et al., 1999); therefore, it is frequently the subject of food safety policy and intervention (Scallan et al., 2011). Investigations into outbreaks and sporadic cases have repeatedly indicated that, when a food vehicle is identified, the most common sources of *Salmonella enterica* infection are poultry and poultry products, especially in cases of outbreaks from undercooked and raw eggs (Velge et al., 2005).

Once introduced onto farms, enteric pathogens such as *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE) easily become disseminated among animals (Freitas Neto et al., 2010). To prevent potential food borne infections caused by *Salmonella* spp. in humans, it is imperative that an effective inspection of food production lines and/or the later steps of industrial processing, distribution, commercialization and consumption is performed. The infection of birds may occur orally or vertically, where a contaminated egg produces a naturally infected chick (Desmidt et al., 1998). Nevertheless, in the case of meat production, enteropathogenic organisms might contaminate the carcasses during slaughter and evisceration, which may represent another possible transmission route for these agents to infect humans (Uyttendaele et al., 1998).

The use of prebiotic, probiotic and synbiotic additives for pathogen control and performance enhancement in poultry production has gained attention recently due to the increasing restriction of antibiotics as growth promoting agents (Gaggia et al., 2010). According to Van Immerseel et al., (2009), the prophylactic and curative use of antibiotics to control *Salmonella* is not recommended for three reasons: 1)

antibiotic resistant *Salmonella* (and other) strains have emerged (Van Duijkeren et al., 2003; Bywater, 2004); 2) there is a concern about the presence of antibiotic residues in meat and 3) most antibiotics fail to eliminate *Salmonella* from animals, although some decreased contamination from this pathogen in animals has been observed (Van Immerseel et al., 2009).

Probiotics are products that exert beneficial health effects in the host. They are viable, defined microorganisms in sufficient numbers which alter the micro-flora by implantation or colonization in a compartment of this host (Schrezenmeir and De Vrese, 2001). Prebiotics are compounds that are unavailable to, or indigestible by the host animal, but are available to a specific proportion of the microbial population; they are often described as functional foods or nutraceuticals (Schrezenmeir and De Vrese, 2001). Products containing both probiotics and prebiotics are known as synbiotics, and this term should be reserved for products in which the prebiotic compound selectively favors the probiotic compound (Schrezenmeir and De Vrese, 2001). The aim of this study was to evaluate the effect of probiotic, prebiotic and synbiotic products on laying hens and broilers challenged with *Salmonella* Enteritidis.

Materials and Methods

Bacteria and inocula

A spontaneous mutant of SE resistant to both nalidixic acid and spectinomycin (SE Nal^r Spec^r), was used maintained by the Ornitopathology Laboratory of FCAV-UNESP, campus (Jaboticabal, Brazil). Cultures were prepared in Luria-Bertani broth incubated overnight in a shaking incubator (100 rev/min) at 37°C. This culture contained approximately 10⁹ colony-forming units/mL (CFU/mL).

Experimental procedure

Two types of birds were used: commercial layers of brown/white variety (experiment 1) and broilers from a commercial hatchery (experiment 2). They were obtained at one day old from commercial hatcheries. A total of 120 and 96 birds were used in each experiment, respectively. All birds received 10^9 CFU/mL SE Nal^r Spec^r by gavage, at 1 day old, and were randomly distributed into four groups. In laying hens 10 birds per treatment and in broilers 6 birds per treatment were analyzed in different occasions. Groups were caged in a room under controlled environmental management ($27 \pm 2^\circ\text{C}$ with a 12 h light/dark cycle). The ration (diet) composition and the experimental treatments are provided in Tables 1 and 2, respectively. The birds had unrestricted access to water and consumed diet ad libitum. In both experiments, cloacal swabs were taken at 7, 14 and 21 days post-infection (dpi). To collect the cecal contents, the birds were killed by cervical dislocation in experiment 1 at 7, 14 and 21 dpi and in experiment 2 at 5, 7, 14 and 21 dpi.

On arrival, all birds used in these experiments were tested to ensure their *Salmonella*-free status using the methodology reported by Zancan et al., (2000), which consisted of checking the transport boxes.

The feeding trial was conducted under the approval of the Ethic Committee of, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Jaboticabal Campus (Process number 014143/12).

Bacteriological analyses

Bacteriological analyses were carried out as described by Barrow and Lovell (1991) with some modification. Briefly, cloacal swabs were placed in selenite broth containing novobiocin (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (SN) and directly placed onto Brilliant Green agar

with nalidixic acid (25 µg/mL) and spectinomycin (100 µg/mL) (BGA Nal/Spec). The cultures were incubated at 37°C for 24 h. In the absence of growth, the appropriate enriched swab cultures were inoculated onto fresh BGA Nal/Spec plates.

After the harvesting of cecal contents, the samples were serially diluted (1:10) in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. Viability counts for the SE Nal^r Spec^r in the samples were measured by plating aliquots of the serial dilutions on Brilliant Green agar with nalidixic acid (100 µg/mL) and spectinomycin (100 µg/mL) and incubating the plate at 37°C for 24 hr. The first dilution was added to an equal volume of double-strength SN. This dilution was incubated at 37°C overnight and plated on BGA Nal/Spec when there was no growth from the viability count assay.

Statistical Analysis

Cloacal swabs were analyzed with the chi-square test to determine significant differences among treatment groups for SE incidences. The means of Log₁₀ viable bacterial counts from cecal contents were submitted to one-way ANOVA. The means were compared using Tukey's multiple comparison tests to verify the protective effect of the additives. Significant differences were assessed at the probability level of $P < 0.05$.

Results and Discussion

A number of feed additives have gained commercial acceptance in order to help to reduce *Salmonella* (Berge and Wierup, 2012). Although there are several non-antibiotic feed supplements on the market, until the moment there isn't a product as efficient as antibiotics to control chicken pathogens, with low costly and high level of meat production. In this study, three feed additives were tested - prebiotics, probiotics

and synbiotics - by adding them to rations fed to laying hens and broilers inoculated with *Salmonella* Enteritidis. Table 3 shows the results of the cloacal swab analyses from laying hens and broilers at 7, 14 and 21 dpi, with a total of 18 observations for each treatment. In laying hens, a significant difference was observed between the prebiotic treatment and the control treatment, while the probiotic and synbiotic treatments did not show effects on the presence of SE. In broilers, the prebiotic, probiotic and synbiotic treatments did not demonstrate significant differences compared with the control treatment. The results of the swab experiments were in accordance with SE counts from the cecal contents of broiler chickens (Tables 4 and 5) which showed higher SE counts compared with that of laying hens. This difference in SE recovery between hens and broilers, most likely occurred because they have differences in immune responses eventually affected by growth rates. These finds are in agreement with Parmentier et al. (2010) that suggested a higher broilers body weight negatively affected the humoral response while the genetic changes of layers towards egg production had less negative impact on the birds immune system. Koenen et al., (2002) observed that the immune responses of laying hens were higher and more permanent than those of broilers. Broilers' growth is faster than that of laying hens, demanding more energy for protein production and less for immune response, leading to a reduction in infectious disease resistance.

An overall gradual reduction in the number of SE occurred in hens and broilers. Probably because natural immunity was concomitantly developing. It should be reminded that for chicks, *Salmonella* Enteritides may cause disease (diarrhea) only in newly hatched chicks but is not pathogenic in adult chickens (Barrow et al., 1994). With increasing of age, chickens become more resistant to *Salmonella*

infection due to the increasing and development of gut immune system as well as the acquisition of a complete and protective intestinal microflora (Beal et al., 2004).

The prebiotic additive was the only product that had any effect in reducing SE counts. Table 4 show a significant reduction in the SE count in laying hens treated with the prebiotic additive at 7 dpi. A significant reduction was also observed in broilers receiving prebiotic feed at 5 dpi (Table 5). At 14 and 21 dpi, no significant difference was in laying hens and broiler chickens receiving prebiotic fed. The prebiotic acts directly on existing host microorganisms that confer specific changes in the composition and/or activity of the native gastrointestinal microbiota (Figueroa-Gonzales et al., 2011). These changes could be the alterations within the environment as the pH values, competition for nutrients and direct antagonists effects that inhibit growth of some pathogenic microorganisms as suggested by Collins and Gibson (1999). Furthermore, it could prevent the adherence of gram-negative pathogens that express Type-1 *fimbriae* such as *Salmonella*, resulting in their excretion from the intestine (Thomas et al., 2004). The prebiotics used in this study significantly reduced SE recovery in challenged neonatal layer chicks and broilers chicks at first week.

The prebiotic product tested was a mix of different prebiotics, including inulin, fructooligosaccharide, mananaoligosaccharide and oligosaccharide. The prebiotic effect of these substances was evaluated individually by different authors. For example, Bayley et al. (1991) and Fukata et al., (1999) reported that the inclusion of oligofructose in the diets of chicks enabled a substantial reduction of *Salmonella* colonization in the gastrointestinal tract. Nabizadeh (2012) showed that inulin supplementation caused no significant differences in the microfloral counts of the ileal contents but significantly increased the *Bifidobacteria* counts and decreased the *E.*

coli counts of the cecal contents. Baurhoo et al., (2007) pointed out that the mannanoligoccharides act by blocking the sites of adhesion reducing binding capacity of some pathogenic bacteria in the intestinal mucosa. Thus, the mix of different prebiotics could be an advantage on reducing the number of SE.

The finding that supplementation with probiotics or synbiotics in the present study had no effect on *Salmonella* reduction is in agreement with Ribeiro et al., (2007), but differs, from the results reported by Higgins et al., (2005) and Wolfenden et al., (2007) which demonstrated a beneficial effect of a probiotic culture in poultry that were experiencing a *Salmonella* infection. The experiments related to these products are somewhat controversial; for example, reported recently by Berge and Wierup (2012) that the challenges with nutritional interventions for *Salmonella* control were variable depending on the nutritional management and *Salmonella* status of the flock. Both probiotic and synbiotic used were limited on decreasing SE colonization although it was not certain that the microorganisms present in this products failed to colonize the enteric microenvironment.

Conclusion

The obtained results showed that prebiotics seem to contribute a protective effect during first days post-infection, while probiotics and synbiotics tested here did not influence infection by SE in laying hens and broilers.

Acknowledgements

This project was financially support by CNPq/MAPA (Proc.475503/2009-0) LSM holds a CAPES graduate scholarship, FGP is under CAPES Pos Doctor

scholarship (Process: 23038007638201119). ABJ and MS are CNPq Research Fellows.

References

Barrow PA and Lovell MA. Experimental infection of egg-laying hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. *Avian Pathology*, 20: 335-348. 1991.

Barrow PA, Huggin MB and Lovell MA. *Salmonella* infection in chickens and mice expresses *in vivo* primarily at the level of the reticuloendothelial system. *Infection and Immunity*, 62: 4602-4610. 1994.

Bailey J, Blankenship LC and Cox NA. Effect of fructooligosaccharide on *Salmonella* colonization of the chicken intestine. *Poultry Science*, 70: 2433-2438. 1991.

Baurhoo B, Lettelier A, Zhao X and Ruiz-Feria A. Cecal populations of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* and *Escherichia coli* populations after *in vivo* *Escherichia coli* challenge in birds fed diets purified lignin or mannanoligosaccharides. *Poultry Science*, 86: 2509-2516. 2007.

Beal RK, Wigley P, Powers C, Hulme SD, Barrow PA and Smith AL. Age at primary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chickens influences persistence of infection and subsequent immunity to re-challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 100(3-4): 151-164. 2004.

Berge AC and Wierup M. Nutritional strategies to combat *Salmonella* in mono-gastric food animal production. *Animal*, 6: 557-564. 2012.

Bywater RJ. Veterinary use of antimicrobials and emergence of resistance in zoonotic and sentinel bacteria in the EU. *Journal of Veterinary Medicine*, 51: 361-363. 2004.

Collins MD and Gibson GR. Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69: 1052S-1057S.1999.

Desmidt M, Ducatelle R and Haesebrouck F. Serological and bacteriological observations on experimental infection with *Salmonella* Haddar in chickens. *Veterinary Microbiology*, 60: 259-269. 1998.

Figuroa-Gonzales I, Quijano G, Ramirez G, Cruz-Guerrero A. Probiotics and prebiotics - perspectives and challenges. *Journal of Science Food and Agriculture*, 91: 1341-1348. 2011.

Freitas Neto OC, Penha Filho RAC, Barrow P and Berchieri Junior A. Sources of human non-typhoid salmonellosis: a review. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 12: 1-11. 2010.

Fukata T, Sasai K, Miyamoto T and Baba E. Inhibitory effects of competitive exclusion and fructooligosaccharide, singly and in combination on *Salmonella* colonization of chicks. *Journal of Food Protection*, 62: 229-233. 1999.

Gaggia F, Mattarelli P and Biavati B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141: S15-S28. 2010.

Higgins SE, Torres-Rodriguez A, Vicente JL, Sartor CD, Pixley CM, Nava GM, Tellez G, Barton JT and Hargis BM. Evaluation of intervention strategies for idiopathic diarrhea in commercial turkey brooding houses. *Journal of Applied Poultry Research*, 14: 345-348. 2005.

Koenen ME, Boonstra-Blom AG and Jeurissen SHM. Immunological differences between layer- and broiler-type chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 89: 47-56. 2002.

Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM and Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5: 607- 625. 1999.

Nabizadeh A. The effect of inulin on broiler chicken intestinal microflora, gut morphology, and performance. *Journal of Animal Feed Sciences*, 21: 725-734. 2012.

Parmentier HK, de Vries Reilingh G, Freke P, Koopmanschap RE and Lammers A. Immunological and physiological differences between layer- and broiler- chickens after concurrent intratracheal administration of lipopolysaccharide and human serum albumin. *International Journal of Poultry Science*, 9: 574-583. 2010.

Ribeiro AR, Kellermann A, Santos LR, Bessa MC and Nascimento VP. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 296-299. 2007.

Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SL, Jones JL and Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States - Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17: 16-22. 2011.

Schrezenmeir J and de Vrese M. Probiotics, prebiotics and synbiotics - approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 361S-4S. 2001.

Uyttendaele MR, Debevere JM, Lips RM and Neyts KD. Prevalence of *Salmonella* in poultry carcasses and their products in Belgium. *International Journal of Food Microbiology*, 40: 1-8. 1998.

Thomas EW, Nilsson LN, Forero M, Sokurenko EV and Vogel V. Shear-dependent 'stick-and-roll' adhesion of type 1 fimbriated *Escherichia coli*. *Molecular Biology*, 53(5): 1545-1557. 2004.

Van Duijkeren E, Wannet WJ, Houwers DJ and Van Pelt W. Antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens

in Netherlands from 1984 to 2001. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 3574-3578. 2003.

Van Immerseel F, De Zutter L, Houf K, Pasmans F, Haesebrouck F and Ducatelle R. Strategies to control *Salmonella* in the broiler production chain. *World's Poultry Science Journal*, 65: 367-392. 2009.

Velge P, Cloeckert A and Barrow P. Emergence of *Salmonella* Epidemics: The problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Veterinary Research*, 36: 267-288. 2005.

Wolfenden AD, Vicente JL, Higgins JP, Andreatti Filho RL, Higgins SE, Hargis BM and Tellez G. Effect of organic acids and probiotics on *Salmonella* Enteritidis infection in broiler chickens. *International of Poultry Science*, 6: 403-405. 2007.

Zancan FT, Berchieri Junior A, Fernandes SA and Gama NMSQ. *Salmonella* spp. investigation in transport boxes of day-old birds. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31: 230-232. 2000.

Table 1 - Basal composition and nutrient content per 100 kilogram of broiler diets

Ingredient	Quantity (kg)
Ground maize	66.6
Soybean meal	29.7
Di calcium phosphate	1.69
Lime stone powder	1.07
Sodium chloride	0.45
Methionine	0.09
Polimix ¹	0.40

¹Polimix provided the following: vitamin A, 10000000 IU; vitamin D3, 2000000 IU; vitamin E, 8000 mg; vitamin B1, 1200 mg; vitamin B2, 4500 mg; vitamin B6, 1300 mg; vitamin B12, 8000 mcg; folic acid, 300 mg; biotin, 52 mg; niacin, 30000 mg; calcium pantothenate, 11000 mg; Co, 6000 mg; Cu, 100 mg; I, 1000 mg; Fe, 50000 mg; Mn, 60000 mg; Zn, 40000 mg; Se, 200 mg; antioxidant, 1300 mg per kilogram of the polimix product.

Table 2 - Composition of the feed additives

Group	Composition	Concentration (additive g/kg feed)
1) Control	-----	-----
2) Probiotic	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> at the same quantitative proportion inulin, fructooligosaccharide,	0.85
3) Prebiotic	mannanoligosaccharide and oligosaccharide at the same quantitative proportion	0.15
4) Synbiotic	85% of the probiotic + 15% of the prebiotic additive	1.0

Table 3 - The presence *Salmonella* Enteritidis in cloacal swabs analyzed at 7, 14 and 21 days post-infection (dpi) from laying hens (experiment 1) and broilers (experiment 2) fed rations with either prebiotic, synbiotic or probiotic additives

Experiments	Treatments				
	Dpi	Control	Prebiotic	Synbiotic	Probiotic
1	7	4/6	1/6	3/6	1/6
	14	3/6	0/6	1/6	1/6
	21	0/6	0/6	0/6	0/6
	P/T	7/18 ^a	1/18 ^b	4/18 ^a	2/18 ^a
2	7	5/6	5/6	6/6	6/6
	14	0/6	2/6	3/6	4/6
	21	4/6	0/6	0/6	0/6
	P/T	9/18 ^a	7/18 ^a	9/18 ^a	10/18 ^a

P/T: number of SE-positive birds (P) out of a total of 18 observations (T).

*Common superscript letters do not differ significantly at $P < 0.05$ according to Chi-Square test.

Table 4 - Experiment 1 cecal results from laying hens giving the viable number (\log_{10}) of SE Nal^r Spec^r bacteria in the cecal contents analyzed at 7, 14 and 21 days post-infection

Treatment	Log ₁₀ viable number of SE Nal ^r Spec ^r per gram of cecal contents		
	7 dpi	14 dpi	21 dpi
Control	*1.59 ^{a**} (N-7.87)	0.67 ^b (N-2.70)	0.20 ^a (N-2.00)
Prebiotic	0.60 ^b (N-2.00)	0.28 ^b (N-2.78)	N ^a (N-N)
Synbiotic	0.80 ^{ab} (N-8.00)	1.40 ^a (N-2.00)	0.2 ^a (N-2.00)
Probiotic	1.66 ^{ab} (N-2.60)	N ^b (N-N)	0.2 ^a (N-2.00)

N: $\log_{10} < 2.0$.

Values in parentheses represent the range of viable \log_{10} counts of SE Nal^r Spec^r.

*The median count per gram from 10 birds is provided.

**Values within groups that do not share common superscript letters differ significantly at $P < 0.05$ according to the Tukey test.

Table 5 - Experiment 2 cecal results from broilers giving the viable number (\log_{10}) of SE Nal^r Spec^r bacteria in the cecal contents analyzed at 5, 7, 14 and 21 days post-infection

Treatment	Log ₁₀ viable number of Nal ^r Spec ^r per gram of cecal content			
	5 dpi	7 dpi	14 dpi	21 dpi
Control	6.20 ^a (4.48-7.63)	6.32 ^a (5.04-7.30)	1.01 ^a (N-6.08)	N ^a (N-N)
Prebiotic	1.16 ^b (N-6.95)	3.72 ^a (N-7.40)	0.51 ^a (N-3.06)	N ^a (N-N)
Synbiotic	4.30 ^a (N-7.36)	5.72 ^a (4.18-7.52)	2.00 ^a (N-2.00)	N ^a (N-N)
Probiotic	5.35 ^a (N-7.34)	4.70 ^a (N-7.66)	0.51 ^a (N-3.07)	N ^a (N-N)

N: $\log_{10} < 2.0$.

Values in parentheses represent the range of viable \log_{10} counts of SE Nal^r Spec^r.

*The median count per gram from 6 birds is provided.

**Values within groups that do not share common superscript letters differ significantly at $P < 0.05$ according to the Tukey test.

5 ARTIGO B

Efeito de aditivos alimentares sobre a morfologia intestinal e sistema imune de frangos de corte desafiados por *Salmonella* Enteritidis

Letícia Sayuri Murate¹, Fernanda Gonzales Paião², Thalísie do Carmo Drape³, Alexandre Tadashi Morey⁴, Emerson José Venâncio⁵, Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense⁶, Sueli Fumie Yamada Ogatta⁷, Lucy Megumi Yamauchi Lion⁸, Angelo Berchieri Junior⁹, Massami Shimokomaki¹⁰

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de prebiótico, probiótico e simbiótico em relação a alterações morfológicas do intestino e sobre o sistema imune de frangos de corte. Frangos de corte com 1 dia de vida foram inoculados com *Salmonella* Enteritidis resistente ao ácido nalidíxio e espectomicina (SE Nal^r Spec^r) estas aves foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos de 36 aves cada, com seis repetições. Foram utilizados quatro tratamentos: controle (sem adição de aditivo), probiótico (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium longum*), prebiótico (inulina, frutooligossacarídeo, mananaoligossacarídeo e oligossacarídeo) e simbiótico (85% de probiótico e 15% de prebiótico). Os animais foram eutanasiados aos 2, 5, 7, 14, 21 e 28 dias após a infecção. Amostras de sangue foram colhidas para quantificação de imunoglobulinas (Ig) A (IgA), G (IgG) e M (IgM). Amostras de intestino foram colhidas para análises histológica, morfometria e da expressão dos genes interferon- γ (IFN- γ), sintetase do óxido nítrico (iNOS), interleucina 10 (IL-10), interleucina 4 (IL-4) e interleucina 1 β (IL-1 β). Dentro dos fatores analisados no score morfológico do intestino delgado e grosso as maiores alterações observadas foram dilatação

¹ Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

² Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Londrina, Paraná, Brasil.

³ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

⁴ Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

⁵ Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

⁶ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

⁷ Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

⁸ Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

⁹ Departamento de Patologia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

¹⁰ Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Londrina, Paraná, Brasil.

linfática e edema na lâmina própria, ambos variaram entre presença localizada a difusa e os tratamentos que tiveram melhor efeito foram o prebiótico e o probiótico. Em relação a altura de vilosidades os tratamentos com simbiótico e probiótico foram os que apresentaram aumento significativo das vilosidades. O tratamento probiótico foi o que mais influenciou sobre a dosagem de imunoglobulinas seguida do simbiótico e prebiótico. A expressão relativa de todos os genes foram influenciados pela adição dos aditivos alimentares. A ingestão de prebiótico, simbiótico e probiótico induziu efeitos tanto na morfologia intestinal quanto no sistema imune das aves mas isto não ocorreu durante todo o experimento.

Palavras-chave: Bactéria patogênica. Prebiótico. Probiótico. Simbiótico.

1 Introdução

Dentre os microrganismos presentes na carne de frangos e que causam doenças em humanos, se destacam as bactérias do gênero *Salmonella* (SILVA; DUARTE, 2002). Os sorovares *Typhimurium* e *Enteritides de Salmonella enterica* subsp. *enterica* são bactérias causadoras do paratifo aviário que podem afetar qualquer espécie de vertebrados inclusive as aves (RAMPLING et al., 1989; SUZUKI, 1994) e o homem (MAZUREK et al., 2004). As aves podem ser portadoras assintomáticas, principalmente devido à colonização entérica, aumentando a disseminação da bactéria (RANTALA, 1973).

Os antibióticos foram os primeiros antimicrobianos utilizados na alimentação de aves com o objetivo de reverter um quadro de desequilíbrio da microbiota, de modo a alterações intestinais e também promover uma melhor performance dos animais. O aumento da frequência de bactérias patogênicas em humanos devido ao consumo de produtos de origem animal, assim como a emergência de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos levaram a questionar o uso indiscriminado desses produtos em rações animais. Este problema fez com que a União Europeia banisse o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento. Nos Estados Unidos existe grande pressão do mercado consumidor para que a indústria avícola produza aves sem uso de antibióticos (HUYGHEBAERT; DUCATELLE; VAN IMMENSEEL, 2010). Dentre as diferentes alternativas que vêm sendo estudadas, os probióticos, prebióticos e simbióticos aparecem como as mais promissoras (KIRKPINAR et al., 2004; MAIORKA et al., 2001; PATTERSON; BURKHOLDER, 2003).

O trato intestinal das aves desempenha importante função como barreira física à entrada de patógenos e também do sistema imune por meio da produção de imunoglobulinas e citocinas. As aves possuem capacidade de se recuperar das lesões intestinais causadas por *Salmonella* Enteritidis com o decorrer da idade (OKAMOTO et al., 2009). Dentre as imunoglobulinas podem estar a IgA, IgG e IgM, sendo a IgA a maior responsável pela defesa de mucosas (BRANDTZAEG, 1995). A citocina pró-inflamatória IL-1 β é um indicativo de uma resposta inflamatória precoce (WITHANAGE et al., 2004). A ativação de macrófagos por citocinas, tais como, IFN- γ é essencial durante o início da infecção por *Salmonella*, pois está envolvida na indução de mecanismos microbicidas dos macrófagos (GULIG et al., 1997). Dentro de mecanismos microbicidas, encontra-se o aumento da expressão de iNOS, o qual ativará efeitos citotóxicos dos macrófagos (KORHONEN et al., 2005). Já as interleucinas IL-4 e IL-10, não possuem efeito protetor contra *Salmonella* e estão relacionadas com a diminuição da resposta inflamatória contra a bactéria (ECKMAN; KAGNOFF, 2001).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de prebiótico, probiótico e simbiótico em relação a alterações morfológicas do intestino e sobre o sistema imune de frangos de corte.

2 Material e Métodos

2.1 Bactéria e Inoculo

Foi utilizado um mutante espontâneo de *Salmonella* Enteritidis resistente ao ácido nalidíxico e à espectomicina (SE Nal^r Spec^r), mantido no laboratório de Ornitopatologia da FCAV, campus de Jaboticabal. Culturas foram preparadas em meio Luria-Bertani e incubadas em shaker (100 rev/min) por 37°C "overnight". A cultura foi diluída decimalmente em solução salina tamponada (PBS), pH 7,4. A contagem do número de células viáveis de SE Nal^r Spec^r foi realizada por plaqueamento de alíquotas das diluições decimais em série em ágar verde brilhante contendo ácido nalidíxico (25 μ g/mL) e spectomicina (100 ug/mL) e incubado a 37 ° C por 24 h. Esta cultura continha aproximadamente 10⁹ unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL).

2.2 Procedimento Experimental

Foram utilizados 144 frangos de corte, provenientes de incubatório comercial, com um dia de vida. As aves receberam no primeiro dia de vida, 0,1 mL da cultura de SE contendo 10^9 UFC/mL, inoculado diretamente no papo por gavagem. A seguir as aves foram distribuídas aleatoriamente em grupos e colocadas em gaiolas em uma sala com ambiente controlado (27 ± 2 ° C com um ciclo de 12 h claro/escuro). Foram utilizados quatro tratamentos conforme a Tabela 1. As dosagens dos aditivos foram realizadas conforme instruções do fabricante. As aves tinham acesso a água e ração tratadas desde o momento do alojamento. Foram sacrificadas 6 aves/tratamento/tempo. Após 2, 5, 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção por SE, as aves foram abatidas por meio de deslocamento cervical para colheita de soro e fragmentos de intestino.

No momento da chegada, as aves foram testadas para presença de *Salmonella* (*Salmonella*-free), de acordo com a metodologia de Zancan et al. (2000), que consiste na checagem das caixas de transporte.

O presente estudo foi realizado sob aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, campus de Jaboticabal (Proc. n 014143/12).

Tabela 1 - Tratamentos e dosagem dos aditivos

Tratamento	Composição	Dosagem (aditivo g/kg ração)
Controle	-----	-----
Probiótico	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>	0,85
Prebiótico	inulina, frutooligossacarídeo, mananaoligossacarídeo e oligossacarídeo	0,15
Simbiótico	85% de probiótico e 15% of prebiótico	1,0

Fonte: Do próprio autor.

2.3 Análises Histológicas

Na necropsia foram colhidos fragmentos de aproximadamente 5cm do duodeno (porção distal da alça duodenal), jejuno (a partir do divertículo de Merckel), íleo (porção entre cecos) e ceco. As amostras foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10%, processadas de acordo com a rotina histológica e emblocadas em parafina. Cortes de 5 µm de espessura foram corados pelo método de hematoxilina-eosina. Em todos os fragmentos determinou-se o escore morfológico de acordo com critérios histológicos anteriormente descritos por Bracarense et al. (2012), com adaptações nas análises de lesões das vilosidades. O escore máximo de 22 pontos indica integridade total do intestino delgado (Apêndice 1) e para intestino grosso o escore máximo totalizou 13 pontos (Apêndice 2).

A altura das vilosidades dos fragmentos de intestino delgado foi mensurada (base da vilosidade até o topo da mesma) aleatoriamente em 10 vilosidades/corte com objetiva de 4x utilizando programa de imagem (Motic Image Plus).

2.4 Obtenção de Soro e Dosagem de Imunoglobulinas

Para obtenção do soro foi colhido 1mL de sangue por ave. Este foi deixado em repouso a temperatura ambiente durante 1h, para formação de coágulo. Centrifugou-se o sangue a 2000 g durante 5 min e então retirou-se o soro. As amostras de soro foram diluídas 1:10 em PBS-glicerol (PBS 1x pH=7,2 e glicerol 40%) e armazenadas a -20°C até o momento das análises.

Para a quantificação de imunoglobulinas foi utilizado o método imunoenzimático de ELISA. Utilizou-se kits comerciais: IgM (Chicken IgM ELISA Quantification Set, Bethyl Laboratories), para IgG (Chicken IgG ELISA Quantification Set, Bethyl Laboratories) e para IgA (Chicken IgA ELISA Quantification Set, Bethyl Laboratories) e seguiram-se as instruções dos mesmo. Para a quantificação de imunoglobulinas IgG, IgA e IgM os soros foram diluídos na proporção de 1:62500, 1:4000 e 1:4000, respectivamente. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 450 nm. Para construção da curva padrão foi utilizado o programa Curve Expert 1.4 e os valores expressos em mg de imunoglobulina/mL soro.

2.5 Expressão Relativa de Citocinas e Gene iNOS

Logo após a colheita, as tonsilas cecais foram preservadas em nitrogênio líquido. Para extração do RNA foi utilizado a metodologia descrita conforme instrução do fabricante do reagente TRIzol[®] Reagent (Invitrogen). A concentração do RNA foi mensurada por espectrofotometria pelo aparelho Synergy[™] HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek) em comprimento de onda de 260 e 280 nanômetros (nm). Foram utilizadas somente amostras de RNA com razão 260/280 entre 1.8 e 2.

A transcrição reversa do RNA total (5 µg) foi realizada utilizando Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer (Invitrogen) e a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Todas as amostras de cDNA foram diluídas 1:10 e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores previamente descritos na literatura os quais foram: GAPDH e IL1β (HONG et al., 2012), IFN-γ (BRISBIN et al., 2008), IL4, IL10 e iNOS (ABDUL-CAREEM et al., 2006). A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, número de acesso no National Center for Biotechnology Information (NCBI) e as temperaturas de hibridação constam na Tabela 2.

Tabela 2 - Sequência e temperatura de hibridação dos oligonucleotídeos GAPDH, IFN-γ, iNOS, IL10, IL4 e IL1β utilizados para análise de expressão relativa de genes

RNAm alvo	Sequência oligonucleotídeos iniciadores		Acesso n°	Temperatura hibridação (°C)
	Forward	Reverse		
GAPDH	5'-TGCTGCCCAAGAACATCATCC-3'	5'-ACGGCAGGTCAGGTCAACAA-3'	K01458.1	65
IFN-γ	5'-CTGAAGAAGTGGACAGAGAG-3'	5'-CACCAGCTTCTGTAAGATGC-3'	FJ788637.1	56
iNOS	5'-GGCAGCAGCGTCTCTATGACTTG-3'	5'-GACTTTAGGCTGCCAGGTTG-3'	NM_204961.1	66
IL10	5'-AGCAGATCAAGGAGACGTTTC-3'	5'-ATCAGCAGGTACTCCTCGAT-3'	NM_001004414.2	61
IL4	5'-TGTGCTTACAGCTCTCAGTG-3'	5'-ACGCATGTTGAGGAAGAGAC-3'	FJ907790.1	59
IL1β	5'-TGGGCATCAAGGGCTACA-3'	5'-TCGGGTTGGTTGGTGATC-3'	HQ329098.1	58

Fonte: Do próprio autor

Para conferência da pureza da extração de RNA e da síntese de cDNA foi realizado o método de reação em cadeia da polimerase (PCR) com o kit Taq DNA Polymerase, recombinant (Invitrogen) e devidas instruções do fabricante.

A expressão relativa de citocinas e gene iNOS realizada através da reação de PCR quantitativa. Todas as reações foram padronizadas para o aparelho

LightCycler® Nano Instrument (Roche Diagnostics) e o kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) com um volume final de 20 µL/reação. Foram utilizadas diferentes concentrações de cada par de oligonucleotídeo iniciador, e para IL4 e IL1β foi necessário a adição de MgCl₂ 50 mM conforme Tabela 3.

As condições ótimas dos parâmetros das reações variaram de acordo com o gene e incluem uma fase de incubação da UDG (uracil DNA glicosilase) a 50°C/2min, fase inicial de denaturação 95°C/2min, 40 ciclos de amplificação sendo que para cada gene foram utilizados diferentes ciclos e temperaturas de fusão dos oligonucleotídeos iniciadores (temperatura de melting) (Tabela 4).

Tabela 3 - Volume e concentração dos componentes utilizados na reação de PCR quantitativa em tempo real para os genes GAPDH, iNOS, IFN-γ, IL10, IL4 e IL-1β (µL)

Componente (µL)	Gene					
	GAPDH	iNOS	IFN-γ	IL10	IL4	IL1-β
Sybr Green	10	10	10	10	10	10
MgCl ₂ 50mM	---	---	---	---	1.2	0.8
Forward primer 200 pMol	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2
Reverse primer 200 pMol	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2
cDNA (1:10)	5	5	5	5	5	5
H ₂ O DEPC	4.8	4.8	4.6	4.8	3.4	3.8
Volume Final	20	20	20	20	20	20

Fonte: Do próprio autor.

Tabela 4 - Parâmetros utilizados na fase de amplificação (40 ciclos) e temperatura de melting dos genes GAPDH, iNOS, IFN-γ, IL10, IL4 e IL1β.

Gene	Amplificação (40 ciclos)			
GAPDH	95°C/15s	65°C/30s	72°C/30s	80°C/3s*
iNOS	95°C/15s	66°C/30s	72°C/30s	79°C/3s*
IFN-γ	95°C/15s	56°C/30s	72°C/30s	83°C/3s*
IL10	95°C/15s	61°C/30s	72°C/30s	81°C/3s*
IL4	95°C/10s	59°C/15s	72°C/30s	83°C/3s*
IL1β	95°C/15s	58°C/30s	72°C/30s	78°C/3s*

* temperatura de melting.

Fonte: Do próprio autor.

2.6 Análise Estatística

Escore morfológico, altura da vilosidade e quantificação de imunoglobulinas foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan. As diferenças estatísticas foram colocadas ao nível de probabilidade de $P < 0,05$. Para os dados de PCR quantitativa em tempo real foi utilizado o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de Livak e Schmittgen (2001). Resumidamente, o nível relativo de cada mRNA normalizado com gene GAPDH foi calculado utilizando a seguinte equação: $\text{fold change} = \frac{2^{Ct_{\text{target}}(\text{control}) - Ct_{\text{target}}(\text{treatment})}}{2^{Ct_{\text{GAPDH}}(\text{control}) - Ct_{\text{GAPDH}}(\text{treatment})}}$.

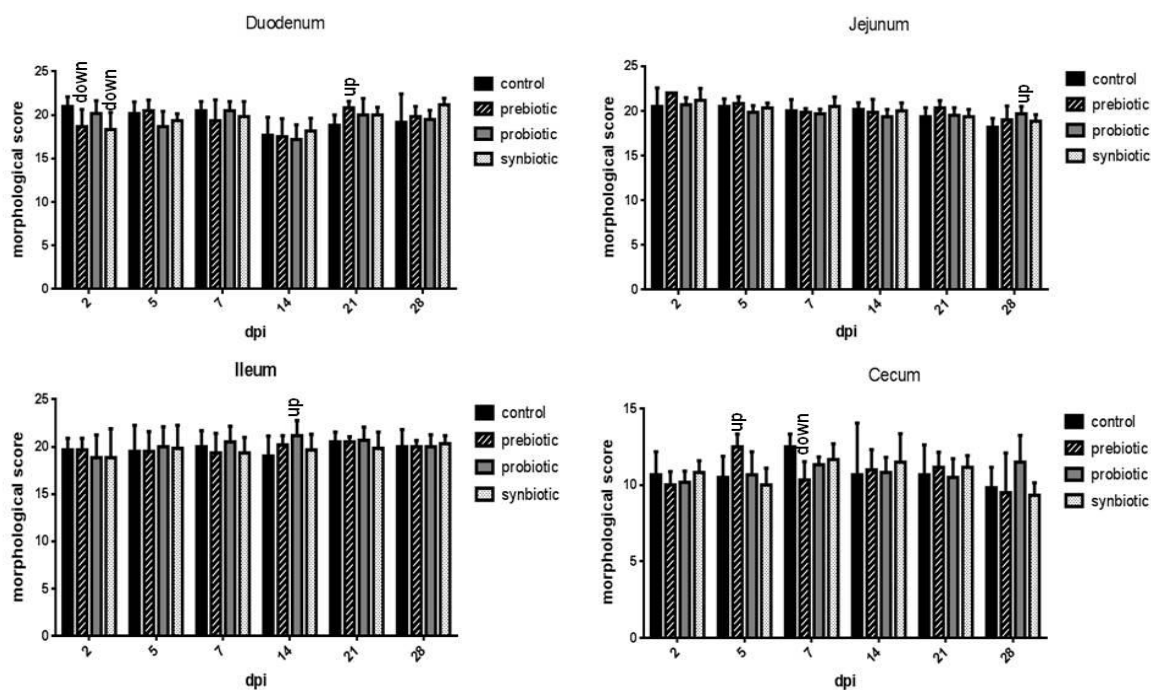
3 Resultados e Discussão

3.1 Análises Histológicas

Dentre os fatores analisados no escore morfológico do intestino delgado e grosso os principais achados histológicos foram dilatação linfática e edema na lâmina própria, ambos variaram entre presença localizada a difusa. Em relação ao escore morfológico intestinal constatou-se aumento significativo no duodeno, jejuno, íleo e ceco nos animais que receberam ração com prebiótico e probiótico (Figura 1). No entanto, também observou-se diminuição significativa no escore morfológico do duodeno e ceco nos grupos tratados com prebiótico e simbiótico (Figura 1).

Os aditivos testados tiveram pouca ação na preservação do epitélio intestinal na primeira semana pós-infecção por SE. Neste experimento, as aves iniciaram a alimentação com os aditivos logo após a inoculação por SE, não havendo um período para a ação do prebiótico, probiótico e simbiótico na microbiota intestinal antes do desafio por SE. No trabalho de Higgins et al. (2010), observou-se em aves desafiadas por SE, melhor efeito de um probiótico administrado 24h antes do que 24h após o desafio.

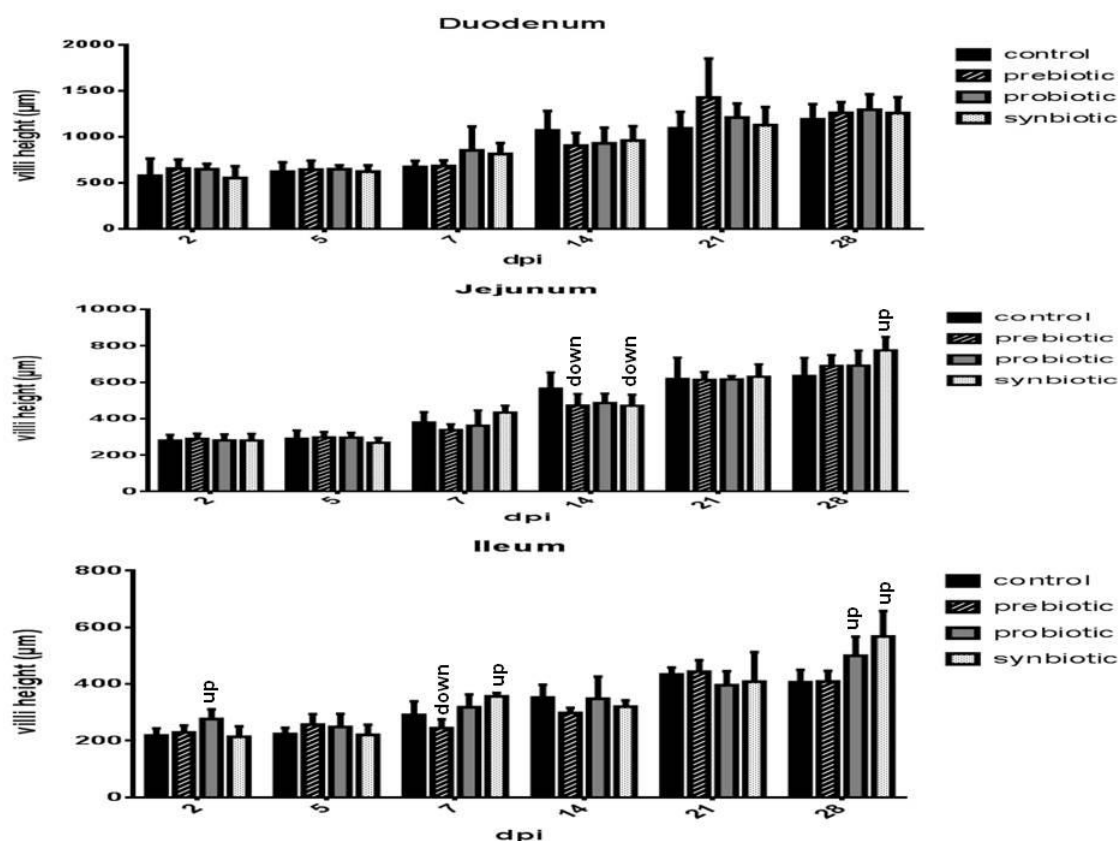
Figura 1 - Efeito do tratamento com prebiótico, probiótico e simbiótico sobre a morfologia intestinal de aves desafiadas com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis aos 2, 5, 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção (dpi) na região do duodeno, jejuno, íleo e ceco. Up= aumento significativo ao $P < 0,05$ e down= diminuição significativa ao $P < 0,05$, analisando-se com o tratamento controle



Fonte: Do próprio autor.

Todos os grupos experimentais apresentaram médias crescentes da medida de altura de vilosidade no decorrer do experimento, devido ao desenvolvimento das aves. A altura das vilosidades na região do duodeno não foi influenciada por nenhum dos tratamentos (Figura 2). O simbiótico foi o que apresentou melhor efeito visto que aumentou a altura das vilosidades em três diferentes momentos e em duas partes do intestino delgado: aos 28 dpi no jejuno, 7 e 28 dpi no íleo (Figura 2). Em seguida, foi o probiótico que aumentou a altura das vilosidades aos 2 e 28 dpi na região do íleo (Figura 2). Porém, o prebiótico diminuiu a altura das vilosidades aos 14dpi no jejuno e aos 7 dpi no íleo, e o probiótico aos 14 dpi no jejuno (Figura 2). Estes resultados foram contrários aos de Okamoto et al. (2009) que não observaram mudanças na altura de vilosidades em aves tratadas com probiótico e desafiadas com SE. As aves são portadoras assintomáticas de *Salmonella* (RANTALA, 1973), portanto as alterações intestinais são discretas o que minimiza as diferenças entre os grupos.

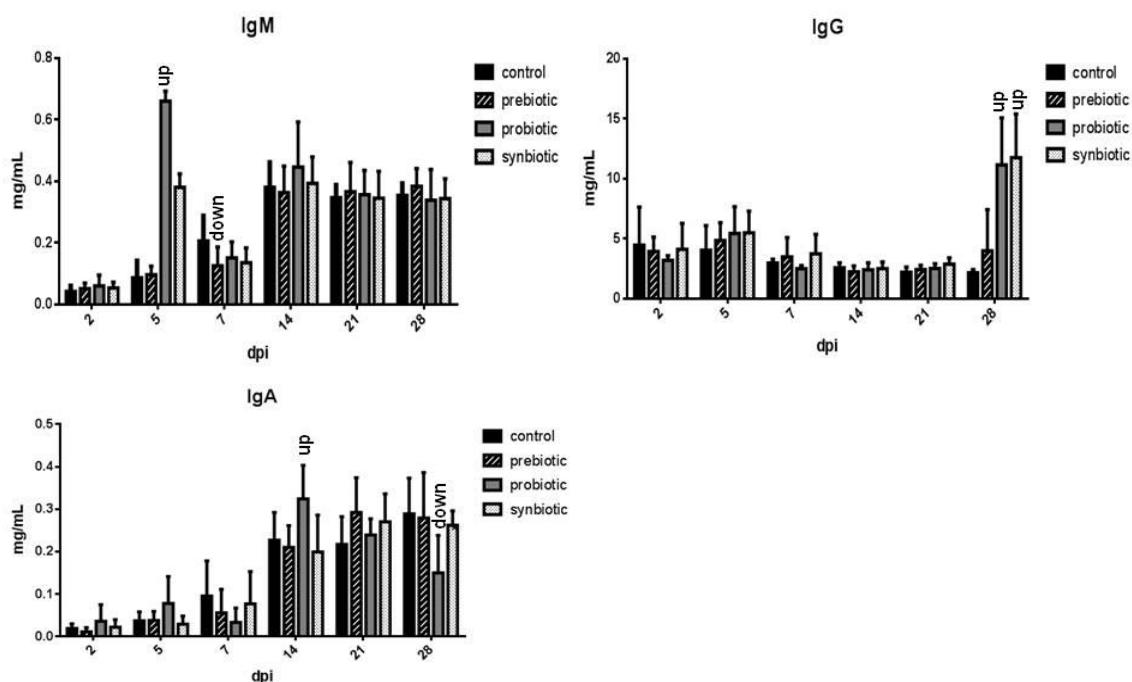
Figura 2 - Efeito do tratamento com prebiótico, probiótico e simbiótico sobre a altura das vilosidades de aves desafiadas com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis aos 2, 5, 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção (dpi) na região do duodeno, jejuno e íleo. Up= aumento significativo ao $P < 0,05$ e down= diminuição significativa ao $P < 0,05$, analisando-se com o tratamento controle.



Fonte: Do próprio autor.

Na primeira semana pós-infecção por SE observou-se influência dos tratamentos probiótico e prebiótico na concentração de IgM sérico, sendo aumento significativo aos 5dpi e diminuição significativa aos 7 dpi, respectivamente (Figura 3). Em relação a IgG houve um aumento significativo aos 28 dpi, utilizando-se o tratamento probiótico e simbiótico (Figura 3). As concentrações de IgA sofreram alterações significativas apenas com o tratamento probiótico, sendo aumento significativo aos 14 dpi e diminuição significativa aos 28 dpi (Figura 3). A resposta humoral mediada por imunoglobulinas têm papel importante na eliminação intestinal das salmonelas, como *Salmonella* Enteritidis. No entanto, no presente estudo, as imunoglobulinas não sofreram influência dos aditivos testados durante todo o período do experimento para realizar uma eliminação total de SE.

Figura 3 - Efeito do tratamento com prebiótico, probiótico e simbiótico sobre a concentração de imunoglobulinas séricas das classes IgM, IgG e IgA de aves desafiadas com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis aos 2, 5, 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção (dpi). Up= aumento significativo ao $P < 0,05$ e down= diminuição significativa ao $P < 0,05$, analisando-se com o tratamento controle

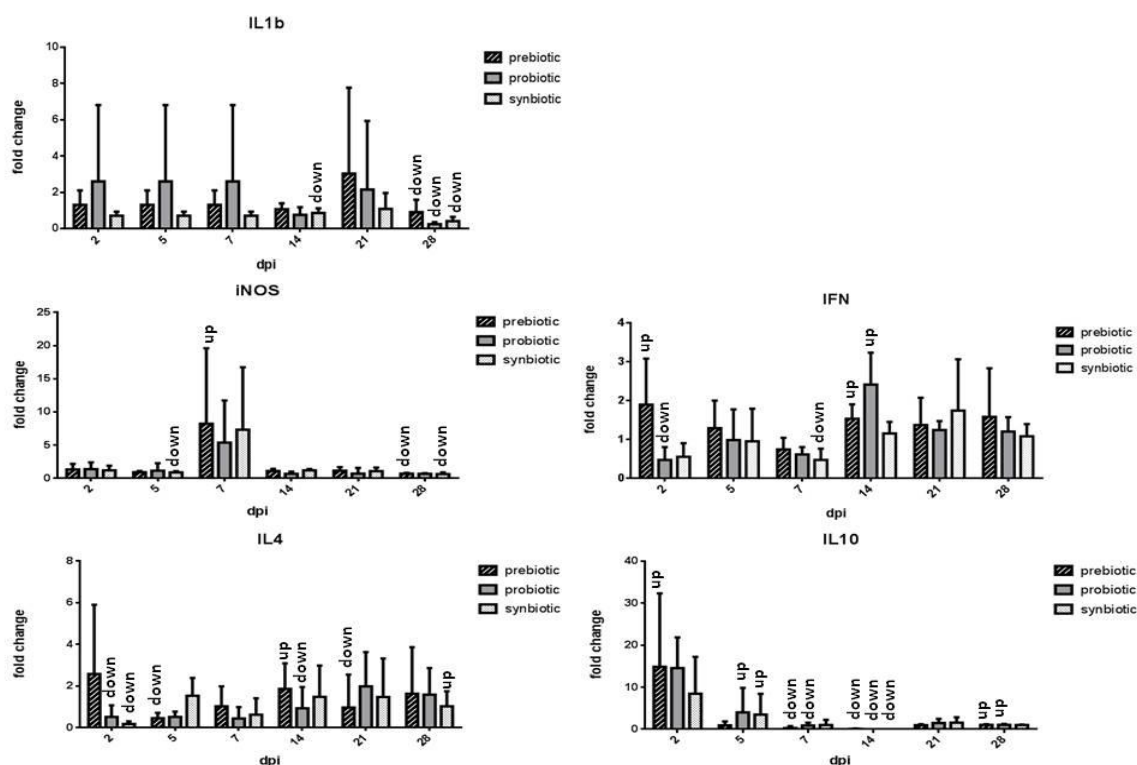


Fonte: Do próprio autor.

A expressão de citocina pró-inflamatória IL1 β diminuiu significativamente com todos os aditivos testados. O tratamento simbiótico diminuiu a expressão de IL1 β aos 14 e 28 dpi, enquanto que, os tratamentos prebiótico e simbiótico diminuíram apenas aos 28 dpi (Figura 4). Os genes iNOS e IFN- γ estão relacionados com a resposta imune do tipo Th1 (células T auxiliares do tipo 1) e aumentaram significativamente principalmente aos 7 dpi com o tratamento prebiótico e aos 14 dpi com o tratamento prebiótico e simbiótico, respectivamente (Figura 4). Os genes IL4 e IL10 fazem parte de resposta imune Th2 (células T auxiliares do tipo 2) e foram influenciados significativamente por todos os tratamentos, tanto para aumento quanto diminuição (Figura 4). Os genes da resposta Th2 possuem efeito antagônico aos da Th1 e mesmo com o aumento significativo dos genes IL4 e IL10 em alguns momentos do experimento com os aditivos, ainda pode-se observar aumento da expressão de genes Th1. Os genes relacionados com a resposta Th1

estão diretamente relacionados com a resposta antimicrobiana do hospedeiro contra *Salmonella* (GIACOMONADATO et al., 2003), o que pode ser observado com o tratamento prebiótico e probiótico aos 2, 5 e 14 dpi.

Figura 4 - Efeito do tratamento com prebiótico, probiótico e simbiótico sobre a expressão dos genes IL1 β , iNOS, IFN- γ , IL4 e IL10 da toncila cecal de aves desafiadas com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis aos 2, 5, 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção (dpi). Up= aumento significativo ao P<0,05 e down= diminuição significativa ao P<0,05, analisando-se com o tratamento controle.



Fonte: Do próprio autor.

Os grupos prebiótico e probiótico tiveram melhor ação na preservação do epitélio intestinal. Todos os aditivos testados contribuíram para o aumento da altura das vilosidades. E também como imunomoduladores, tanto na dosagem de imunoglobulinas séricas e expressão dos genes da toncila cecal.

Referências

ABDUL-CAREEM, M. F.; HUNTER, B. D.; PARVIZI, P.; HAGHIGHI, H. R.; THANTHRIGE-DON, N.; SHARIF, S. Cytokine gene expression patterns associated with immunization against Marek's disease in chickens. **Vaccine**, Amsterdam, v. 25, n. 3, p. 424-432, 2006.

BRACARENSE, A. P. F. R. L.; LUCIOLI, J.; GRENIER, B.; MOLL, W. D.; SCHATZMAYR, G.; OSWALD, I. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 107, n. 12, p. 1776-1786, 2012.

BRANDTZAEG, P. Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 103, n. 1, p. 1-19, 1995.

BRISBIN, J. T.; ZHOU, H.; GONG, J.; SABOUR, P.; AKBARIA, M. R.; HAGHIGHI, H. R.; YU, H.; CLARK, A.; SARSON, A. J.; SHARIF, S. Gene expression profiling of chicken lymphoid cells after treatment with *Lactobacillus acidophilus* cellular components. **Developmental and Comparative Immunology**, Elmsford, v. 32, n. 5, p. 563-574, 2008.

ECKMANN, L.; KAGNOFF, W. F. Cytokine in the host defense against *Salmonella*. **Microbes Infectious**, Paris, v. 3, p. 1191-1200, 2001.

GIACOMONADATO, M. N.; GOREN, N. B.; SORDELLI, D. O.; VACCARO, M. I.; GRASSO, D. H.; ROPOLO, A. J.; CERQUETTI, M. C. Involvement of intestinal inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the early stages of murine salmonellosis. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 223, n. 2, p. 231-238, 2003.

GULIG, P. A.; DOYLE, T. J.; CLARE-SALZER, M. J.; MAIESE, R. L.; MATSUI, H. Systemic infection of mice by wild-type but not *Spy-Salmonella typhimurium* is enhanced by neutralization of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. **Infectious Immunology**, Washington, v. 65, p. 5191-5191, 1997.

HIGGINS, J. P.; HIGGINS, S. E.; WOLFENDEN, A. D.; HENDERSON, S. N.; TORRES-RODRIGUEZ, A.; VICENTE, J. L.; HARGIS, B. M.; TELLEZ, G. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture treatment timing on *Salmonella* Enteritidis in neonatal broilers. **Poultry Science**, Champaign, v. 89, p. 243-247, 2010.

HONG, Y. H.; SONG, W.; LEE, S. H.; LILLEHOJ, H. S. Differential gene expression profiles of β -defensins in the crop, intestine, and spleen using a necrotic enteritis model in 2 lines commercial broiler chicken lines. **Poultry Science**, Champaign, v. 91, p. 1081-1088, 2012.

HUYGHEBAERT, G.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. **The Veterinary Journal**, London, v. 187, n. 2, p. 182-188, 2010.

KIRKPINAR, F.; AÇIKGÖZ, Z.; BOZKURT, M.; AYHAN, V. Effects of inclusion of poultry by-product meal and enzyme-prebiotic supplementation in grower diets on performance and feed digestibility of broilers. **British Poultry Science**, London, v. 45, n. 2, p. 273-279, 2004.

KORHONEN, R.; LAHTI, A.; KANKAANRANTA, H.; MOILANEN, E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. **Current Drug Targets - Inflammation & Allergy**, Germany, v. 4, n. 4, p. 471-479, 2005.

- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta C(T)) method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- MAIORKA, A.; SANTNI, E.; SUGETA, S. M.; ALMEIDA, J. G.; MACARI, M. Utilization of prebiotics, probiotics or symbiotics in broiler chicken diets. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 3, n. 1, 2001.
- MAZUREK, J.; SALEHI, E.; PROPES, D.; HOLT, D.; BANNERMAN, T.; NICHOLSON, L. M.; BUNDESEN, M.; DUFFY, R.; MOOLENAAR, R. L. A multistate outbreak of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection linked to raw milk consumption. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, p. 2165-2170, 2004.
- OKAMOTO, A. S.; ANDREATTI FILHO, R. L.; LIMA, E. T.; NOUJAIM, J. C. Histopatologia da mucosa intestinal de pintos tratados com *Lactobacillus spp.* e desafiados com *Salmonella enterica*, subespécie *enterica*, sorotipo Enteritidis. **Ciência Animal Brasileira**, Goiania, v. 10, p. 568-573, 2009.
- PATTERSON, J. A.; BURKHOLDER, K. M. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. **Poultry Science**, Champaign, v. 82, p. 627-631, 2003.
- RAMPLING, A.; UPSON, R.; WARD, R. L.; ANDRESON, J. R.; PETERS, E.; ROWE, B. *Salmonella* Enteritides fage type 4 infection of broiler chickens: a hazard to public health. **The Lancet**, London, p. 436-438, 1989.
- RANTALA, M. Cultivation of bacterial flora able to prevent the colonization of *Salmonella infantis* in the intestines of broiler chickens and its use. **Acta Pathologica Microbiologica Section B**, Copenhagen, v. 82, n. 1, p. 75-80, 1973.
- SILVA, E. M.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 4, n. 2, p. 85-100, 2002.
- SUZUKI, S. Pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis in poultry. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 21, p. 89-105, 1994.
- WITHANAGE, G. S.; KAISER, P.; WIGLEY, P.; POWERS, C.; MASTROENI, P.; BROOKS, H.; BARROW, P.; SMITH, A.; MASKELL, D.; MCCONNELL, L. Rapid expression of chemokines and proinflammatory cytokines in newly hatched chickens infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Infectious Immunology**, Washington, v. 72, n. 4, p. 2152-2159, 2004.
- ZANCAN, F. T.; BERCHIERI, A.; FERANDES, S. A.; GAMA, N. M. S. *Salmonella spp.* investigation in transport boxes of day-old birds. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 230-232, 2000.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Nas análises microbiológicas realizadas em frangos de corte e poedeiras. Os tratamentos probiótico e simbiótico não influenciaram na infecção por *Salmonella* Enteritidis. Somente o tratamento prebiótico contribuiu com efeito protetor durante a primeira semana pós-infecção;

- Os aditivos testados tiveram pouca ação na preservação do epitélio intestinal na primeira semana pós-infecção por SE. Em relação ao escore morfológico intestinal constatou-se aumento significativo no duodeno, jejuno, íleo e ceco nos animais que receberam ração com prebiótico e probiótico. No entanto, também observou-se diminuição significativa no escore morfológico do duodeno e ceco nos grupos tratados com prebiótico e simbiótico;

- Todos os grupos experimentais apresentaram médias crescentes da medida de altura de vilosidade no decorrer do experimento, devido ao desenvolvimento das aves. A altura das vilosidades na região do duodeno não foi influenciada por nenhum dos tratamentos. O simbiótico foi o que apresentou melhor efeito visto que aumentou a altura das vilosidades em três diferentes momentos e em duas partes do intestino delgado. Em seguida, foi o probiótico que aumentou a altura das vilosidades. E o prebiótico foi o tratamento que menos influenciou positivamente as altura das vilosidades;

- Todos os tratamentos tiveram efeito imunomodulador, tanto na dosagem de imunoglobulinas sérias e expressão dos genes da toncila cecal.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and molecular immunobiology**. 5. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005.
- ARISTIDES, L. G. A.; PAIÃO, F. G.; MURATE, L. S.; OBA, A.; SHIMOKIMAKI, M. The effects of biotic additives on growth performance and meat qualities in broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, Pakistan, v. 11, n. 9, p. 599-604, 2012.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL – ABPA. **A avicultura brasileira**. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/a_avicultura_brasileira/historia_da_avicultura_no_brasil>. Acesso em: 12 mar. 2014.
- BABU, U. S.; RAYBOURNE, R. B. Impact of dietary components on chicken immune system and *Salmonella* infection. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, London, v. 6, n. 1, p. 121-135, 2008.
- BERCHIERI JUNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Enfermidades bacterianas. In: _____. **Doença das aves**. 2. ed. Campinas: FACTA- Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009. p. 435-553.
- CALLAWAY, T. R.; ANDERSON, R. C.; EDRINGTON, E. S.; GENOVESE, K. J.; HARVEY, R. B.; POOLE, T. R.; NISBET, D. J. Recent pre-harvest supplementation strategies to reduce carriage and shedding of zoonotic enteric bacterial pathogens in food animals. **Animal Health Research Reviews**, Wallingford, v. 5, n. 1, p. 35-74, 2004.
- CUNNINGHAM-RUNDLES, R. S. The effect of aging on mucosal host defense. **Journal of Nutrition, Health and Aging**, Paris, v. 8, n. 1, p. 20-25, 2004.
- DESMIDT, M.; DUCATELLE, R.; MAST, J.; GOODDEERIS, B. M.; KASPERS, B.; HAESBROUCK, F. Role of the humoral immune system in *Salmonella enteritidis* phage type four infection in chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 63, n. 4, p. 355-367, 1998.
- DONALSON, L. M.; KIM, W. K.; CHALOVA, V. I.; HERRERA, P.; WOODWARDS, C. L.; MCREYNOLDS, J. L.; KUBENA, L. F.; NISBET, D. J.; RICKE, S. C. In vitro anaerobic incubation of *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* and laying hen cecal bacteria in poultry feedsubstrates and a fructooligosaccharide prebiotic. **Anaerobe**, London, v. 13, n. 5, p. 208–214, 2007.
- FARNELL, M. B.; EL HALAWANI, M.; YOU, S.; MCELROY, A. P.; HARGIS, B. M.; CALDWELL, D. J. *In vivo* biologic effects of recombinant-turkey interferon-gamma in neonatal leghorn chicks: protection against *Salmonella enteritidis* organ invasion. **Avian Diseases**, Ithaca, v. 45, n. 2, p. 473-478, 2001.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Salmonella and Campylobacter in chicken meat**: meeting report. 2009. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44211/1/9789241547901_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 27 maio 2014.

FORSHELL, L. P.; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, Paris, v. 25, n. 2, p. 541-554, 2006.

FORTES, T. P.; FAGUNDES, M. Q.; VASCONCELLOS, F. A.; TIMM, C. D.; SILVA, E. F. Ilhas de patogenicidade de *Salmonella enterica*: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 71, n. 2, p. 219-227, 2012.

FUKUTA, T.; SASAI, K. Inhibitory effects of competitive exclusion and fructooligosaccharide singly and in combination, on *Salmonella* colonization of chicks. **Journal of Food Protection**, United States, v. 62, n. 3, p. 229-233, 1999.

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

GIBSON, G. R.; ROBEFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, United States, v. 125, n. 6, p. 1401- 1412, 1995.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A. **Kuby immunologia**. 4. ed. Rio de Janeiro:Revinter, 2002.

GUARD-PETTER, J. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 3, n. 7, p. 421-430, 2001.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHINLLINGER, V. Introduction to pre-and probiotics. **Food Research International**, Barking, v. 35, n. 2, p. 109-116, 2002.

HUMPHREY, T. *Salmonella*, stress responses and food safety. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, n. 6, p. 504-509, 2004.

HUYGHEBAERT, G.; DUCATELLE, R.; VAN IMMENSEEL, F. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. **The Veterinary Journal**, London, v. 187, n. 2, p. 182-188, 2011.

KABIR, S. M. L.; RAHMAN, M. M.; RAHMAN, M. B.; HOSAIN, M. Z.; AKAND, M. S. I.; DAS, S. K. Viability of probiotics in balancing intestinal flora and effecting histological changes of crop and caecal tissues of broilers. **Biotechnology**, New York, v. 4, n. 4, p. 325-330, 2005.

KOGUT, M. H.; TELLEZ, G. I.; HARGIS, B. M.; CORRIER, D. E.; DELOACH, J. R. The effect of 5-fluorouracil treatment of chicks: a cell depletion model for the study of avian polymorphonuclear leukocytes and natural host defenses. **Poultry Science**, Champaign, v. 72, p. 1873-1880, 1993.

MASTROENI, P.; VILLAREAL-RAMOS, B.; DEMARCO DE HORMAECHE, D.; HORMAECHE, C. E. Delayed (footpad) hypersensitivity and Arthus reactivity using protein-rich antigens and LPS in mice immunized with live attenuated *aroA* *Salmonella* vaccines. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 14, n. 5, p. 369-379, 1993.

- NAYEBPOR, M.; FARHOMAND, P.; HASHEMI, A. Effects of different levels of direct fed microbial (Primalac) on growth performance and humoral immune response in broiler chickens. **Journal of Animal Veterinary Advances**, Pakistan, v. 6, n. 22, p. 1308-1313, 2007.
- PANG, F. H.; XIE, Q. M.; LING, H. H. The investigation of immunomodulators tested for the results on the control of a coccidial infection. **Journal of Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 8, p. 1-3, 2000.
- PASCUAL, M.; HUGAS, M. A.; BADIOLA, J. I.; MONFORT, J. M.; GARRIGA, M. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 11, p. 4981-4986, 1999.
- QUEVEDO, A. Um problema veterinário. **Revista Avicultura Industrial**, São Paulo, n. 1142, 2006.
- RANTALA, M. Cultivation of bacterial flora able to prevent the colonization of *Salmonella infantis* in the intestines of broiler chickens and its use. **Acta Pathologica Microbiologica Section B**, Copenhagen, v. 82, n. 1, p. 75-80, 1973.
- SCOTT, T. R. Our current understanding of humoral immunity of poultry. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, n. 4, p. 574-579, 2004.
- SILVA, E. M.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 4, n. 2, p. 85-100, 2002.
- TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO, A. G. M.; ZANATTA, G. F. Prevalência de *Salmonella* Enteritidis em carcaças de frango industrialmente processadas. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 107, p. 52-55, 2003.
- VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; DE SMET, I.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Dynamics of immune cell infiltration in the caecal lamina propria of chickens after neonatal infection with a *Salmonella enteritidis* strain. **Developmental and Comparative Immunology**, Elmsford, v. 26, n. 4, p. 355-364, 2002.
- VELGE, P.; CLOECKAERT, A.; BARROW, P. Emergence of *Salmonella* epidemics: the problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. **Veterinary Research**, Paris, v. 36, n. 3, p. 267-288, 2005.
- WITTE, W. Selective pressure by antibiotic use in livestock. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 16, p. S19-S24, 2000.
- WRAY, C.; DAVIES, R. H. **Guidelines on detection and monitoring of Salmonella infected poultry flocks with particular reference to Salmonella Enteritidis**. Austria: World Health Organization, 1994.
- ZULKIFLI, I.; ABDULLAH, N.; AZRIN, N. M.; HO, Y. W. Growth performance and immune response of two commercial broiler strains fed diets containing *Lactobacillus* cultures and oxytetracycline under heat stress conditions. **Brazilian Poultry Science**, London, v. 41, n. 5, p. 593-597, 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Critérios para determinação do escore histológico do intestino delgado

Alteração	Grau da alteração	Escore
Desnudamento apical	Ausência	2
	Presença localizada	1
	Presença difusa	0
Dilatação linfática	Ausência	2
	Presença localizada (5-6)	1
	Presença difusa (>15)	0
Debris celulares	Ausência	2
	Presença localizada (5-6)	1
	Presença difusa (>15)	0
Degeneração	Ausência	2
	Presença localizada (5-6)	1
	Presença difusa (>15)	0
Atrofia vilosidades	Ausência	2
	Presença localizada (5-6)	1
	Presença difusa (>15)	0
Fusão vilosidades	Ausência	2
	Presença localizada (>3)	1
	Presença difusa (>15)	0
Edema	Ausência	2
	Presença localizada (5-6)	1
	Presença difusa (>15)	0
Microvilosidades	Presença difusa	2
	Presença localizada	1
	Ausente	0
Células epiteliais	Cilíndricas	3
	Cúbicas	2
	Achatadas	1
	Ausente	0
Número de Vilosidades	>25	3
	15-25	2
	<15	1
	Ausente	0
Total máximo do escore		22

APÊNDICE 2

Critérios para determinação do escore histológico do intestino grosso

Alteração	Grau da alteração	Escore
Desnudamento apical	Ausência	2
	Presença localizada	1
	Presença difusa	0
Dilatação linfática	Ausência	2
	Presença localizada (5-6)	1
	Presença difusa (>15)	0
Debris celulares	Ausência	2
	Presença localizada (5-6)	1
	Presença difusa (>15)	0
Degeneração	Ausência	2
	Presença localizada (5-6)	1
	Presença difusa (>15)	0
Edema	Ausência	2
	Presença localizada (5-6)	1
	Presença difusa (>15)	0
Células epiteliais	Cilíndricas	3
	Cúbicas	2
	Achatadas	1
	Ausente	0
Total máximo do escore		13