

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

PROBIÓTICO ADMINISTRADO EM EMBRIÕES E PINTOS DE FRANGOS DE
CORTE NA REDUÇÃO DA COLONIZAÇÃO POR *Salmonella* Heidelberg E
INTEGRIDADE ENTÉRICA

BRUNA BOARO MARTINS

Tese apresentada ao Programa
de Pós-graduação em
Zootecnia como parte dos
requisitos para obtenção do
título de Doutor em Zootecnia.

Botucatu - SP
Novembro – 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

PROBIÓTICO ADMINISTRADO EM EMBRIÕES E PINTOS DE FRANGOS DE
CORTE NA REDUÇÃO DA COLONIZAÇÃO POR *Salmonella* Heidelberg E
INTEGRIDADE ENTÉRICA

BRUNA BOARO MARTINS
Mestre em Zootecnia

Orientador: Prof. Dr. Antônio Celso Pezzato

Tese apresentada ao Programa
de Pós-graduação em
Zootecnia como parte dos
requisitos para obtenção do
título de Doutor em Zootecnia.

Botucatu - SP
Novembro – 2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

M381p Martins, Bruna Boaro, 1989-
Probiótico administrado em embriões e pintos de frangos de corte na redução da colonização por *Salmonella Heidelberg* e integridade entérica / Bruna Boaro Martins. - Botucatu : [s.n.], 2018
101 f.: il., grafs., tabs.

Tese(Doutorado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2018
Orientador: Antônio Celso Pezzato
Inclui bibliografia

1. Frango de corte. 2. Ave - Crescimento. 3. Probióticos. 4. Prevenção de infecções. I. Pezzato, Antônio Celso II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

Elaborada por Maria Lúcia Martins Frederico - CRB-8:5255

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

BIOGRAFIA DO AUTOR

Bruna Boaro Martins – nascida em 05 de fevereiro de 1989, na cidade de Botucatu – SP, filha de Augusto Pedro Martins e Márcia Regina Fernandes Boaro.

Em março de 2008 iniciou o curso de graduação em Zootecnia na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Botucatu – SP, em agosto de 2010 passou a ser bolsista de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, fato que se estendeu até o mês de julho de 2011. O título de Bacharel em Zootecnia foi obtido em dezembro de 2012.

Ingressou, em março de 2013, no curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Botucatu - SP, sendo bolsista da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP durante todo o período. O título de Mestre em Zootecnia foi recebido em abril de 2015.

Em agosto de 2015 iniciou o curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, - Câmpus de Botucatu – SP, com bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq durante todo o período. A defesa de doutorado foi realizada em novembro de 2018.

Em novembro de 2017, ingressou no curso de pós-graduação intitulado MBA em Gestão de Negócios na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo com término previsto para julho de 2019.

Dedico

Sobretudo a Deus,

Por zelar por mim durante essa caminhada, agradeço o amparo dispendido nos momentos de dificuldades e por iluminar meu caminho de tal forma que pude ter passos firmes em busca dos meus objetivos.

À minha mãe,

Márcia Regina Fernandes Boaro, minha maior incentivadora sem a qual nada disso faria sentido. Obrigada por confiar e acreditar em mim e acima de tudo por me encorajar a seguir tantas vezes que me encontrei em dificuldade. Amiga, companheira, mestre e exemplo de vida, essa conquista é fruto do seu amor e dedicação por mim.

Agradeço

Em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Ducatti (*in memoriam*), por me acolher prontamente para o ingresso no doutorado. Obrigada por confiar em mim antes mesmo de me conhecer, pelos ensinamentos e experiências trocadas que foram essenciais para me encorajar seguir até o fim.

Ao Prof. Dr. Antônio Celso Pezzato, obrigada pela disposição em prontamente me ajudar e acima de tudo, pela confiança no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, Câmpus de Botucatu, pela oportunidade de realizar este curso e aprimorar meus conhecimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, Câmpus de Botucatu, pelos ensinamentos e experiências trocadas durante o curso de doutorado.

Ao prof. Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho e prof. Dr. Adriano Sakai Okamoto do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Câmpus de Botucatu, pela concessão do uso das instalações do infectório, bem como pelas amostras de *Salmonella* Heidelberg cedidas e pelos esclarecimentos de tantas dúvidas.

À prof. Dra. Maria Márcia Pereira Sartori, pela ajuda nas análises estatísticas.

À empresa BioCamp, pela oportunidade de trabalhar em parceria, só levo bons frutos que contribuíram de forma ímpar para o meu crescimento profissional. Obrigada Ivan Lee e Paulo Martins pela confiança em meu trabalho e pelas experiências trocadas.

Aos amigos, Luiz Gustavo Bicas Barbosa e Bárbara Cristina da Silva Fernandes obrigada pela ajuda durante todo o desenvolvimento desse trabalho, foi de extrema importância.

Ao meu anjo da guarda, pela fidelidade de estar sempre ao meu lado me guiando.

Ao meu amado companheiro Guilherme Amelio Milian, meu especial obrigada, por estar ao meu lado incondicionalmente. Agradeço por tantas vezes se tornar um economista zootecnista e me ajudar no desenvolvimento desse trabalho. Seu companheirismo e afeto foram essenciais.

À todos que aqui não foram citados nominalmente, mas que de alguma forma contribuíram com o desenvolvimento desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Muito obrigada!

PROBIÓTICO ADMINISTRADO EM EMBRIÕES E PINTOS DE FRANGOS DE
CORTE NA REDUÇÃO DA COLONIZAÇÃO POR *Salmonella* Heidelberg E
INTEGRIDADE ENTÉRICA

RESUMO – Objetivou-se avaliar o efeito de probiótico administrado *in ovo* ou spray sobre a histomorfometria, contagem de células caliciformes (CC), avaliação ultraestrutural da mucosa entérica e quanto à capacidade de redução de *Salmonella* Heidelberg (SH) em órgãos e no conteúdo cecal de frangos de corte desafiados experimentalmente com SH. Para histomorfometria, CC, avaliação ultraestrutural da mucosa entérica foram utilizados 297 frangos de corte Cobb®, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (2x2)+2, com 9 repetições. Para as análises microbiológicas, foram utilizados 162 frangos de corte Cobb®, distribuídos em DIC com 3 tratamentos (T3, T4 e T5), com 9 repetições de 6 aves cada. T1: aves tratadas *in ovo* com probiótico; T2: aves tratadas por spray com probiótico; T3: aves tratadas *in ovo* com probiótico e desafiadas com SH; T4: aves tratadas por spray com probiótico e desafiadas com SH; T5: aves não tratadas com probiótico e desafiadas com SH; T6: aves não tratadas com probiótico e não desafiadas com SH. No 2º dia de vida, as aves infectadas foram anilhadas e alojadas junto às aves dos tratamentos T3, T4 e T5. Para contagem de SH em órgãos e no conteúdo cecal aos 3, 5, 7, 14 e 21 dias pós-desafio e para análise histomorfométrica, CC e avaliação ultraestrutural nos 5, 9, 16 e 23 dias de vida das aves, 5 aves de cada tratamento mais 1 ave anilhada, dos tratamentos T3, T4 e T5 foram eutanasiadas. Os dados microbiológicos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis ranks, enquanto que os dados de histomorfometria e CC foram submetidos à análise de variância. Aos 21 dias pós-desafio para o conteúdo cecal, foi possível observar que aves do T4 apresentaram menor contaminação quando comparado com as aves do T3 e T5. Para os parâmetros histomorfométrico e CC, o probiótico apresentou ligeira melhora nas medidas em todas as idades e segmentos estudados. A integridade da mucosa ileal mostrou-se mais preservada, e a colonização com agente trófico foi mais intensa na mucosa cecal das aves do T2 e T4. O probiótico destaca-se como importante alternativa ao uso de antibióticos para controle de SH em frangos e corte, pois houve redução da contaminação no conteúdo cecal, melhora a integridade da mucosa entérica de frangos de corte, e mostra maior eficácia em estabelecer microbiota protetora capaz de preservar a ultraestrutura intestinal quando submetido a desafio com SH, sendo que a via de aplicação spray apresenta maior potencial de atuação.

PALAVRA-CHAVE: agente trófico, exclusão competitiva, *in ovo*, microbiológico, saúde intestinal

PROBIOTIC ADMINISTERED IN EMBRYOS AND CHICK OF BROILERS IN THE REDUCTION OF COLONIZATION BY *Salmonella* Heidelberg AND ENTERIC INTEGRITY

ABSTRACT – The aim of this study was to evaluate the effect of probiotic administered *in ovo* or spray on histomorphometry, goblet cell count (CC), ultrastructural evaluation of the enteric mucosa and the ability to reduce *Salmonella* Heidelberg (SH) in organs and cecal content in broilers challenged experimentally with SH. For the histomorphometry, CC, ultrastructural evaluation of the enteric mucosa, 297 Cobb® broilers were used, distributed in a completely randomized design in a factorial (2x2) +2, with 9 replicates. For the microbiological analyzes, 162 Cobb® broilers were used, distributed in completely randomized design with 3 treatments (T3, T4 and T5), with 9 replicates of 6 birds each. T1: birds treated *in ovo* with probiotic; T2: birds treated with probiotic by spray; T3: birds treated *in ovo* with probiotic and challenged with SH; T4: birds treated with probiotic by spray and challenged with SH; T5: birds not treated with probiotic and challenged with SH; T6: birds not treated with probiotic and not challenged with SH. On the 2nd day of life, the infected birds were ringed and housed with birds from T3, T4 and T5 treatments. For SH count in organs and cecal content at 3, 5, 7, 14 and 21 days post challenge and for histomorphometric analysis, CC and ultrastructural evaluation at 5, 9, 16 and 23 days of life of the birds, 5 birds of each treatment plus one ringed bird, T3, T4 and T5 treatments were euthanized. The microbiological data were submitted to the Kruskal-Wallis ranks test, while the histomorphometric and CC data were submitted to analysis of variance. At 21 days post challenge for cecal content, it was possible to observe that T4 birds presented lower contamination when compared to the birds of T3 and T5. For the histomorphometric and CC parameters, the probiotic had a slight improvement in measurements in all ages and segments studied. The integrity of the ileal mucosa was more preserved, and the colonization with trophic agent was more intense in the cecal mucosa of the birds of T2 and T4. The probiotic is an important alternative to use of antibiotics for control SH in broilers, because there was a reduction in contamination in the cecal content, it improves the integrity of enteric mucosa of broilers, and it shows a greater efficacy in establishing a protective microbiota of preserving the intestinal ultrastructure when challenged with SH, with the spray application route showing greater potential for action.

KEYWORDS: trophic agent, competitive exclusion, *in ovo*, microbiological, intestinal health

Sumário

CAPÍTULO 1	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	2
INTRODUÇÃO	2
REVISÃO DE LITERATURA.....	4
Desenvolvimento do trato gastrointestinal	4
Importância da alimentação precoce.....	6
Probiótico.....	7
<i>Salmonella</i> spp.	12
<i>Salmonella</i> Heidelberg	13
OBJETIVOS	14
Objetivos gerais	14
Objetivos específicos	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
 CAPÍTULO 2 - PROBIÓTICO NA REDUÇÃO DA INFECÇÃO EM FRANGOS DE	
CORTE DESAFIADOS COM <i>Salmonella</i> Heidelberg	24
RESUMO	25
ABSTRACT	26
INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS	29
Delineamento experimental.....	29
Probiótico.....	29
Tratamento <i>in ovo</i>	29
Tratamento por spray.....	30
Desafio com <i>Salmonella</i> Heidelberg	30
Avaliação da ausência prévia de <i>Salmonella</i> spp. nas aves e na ração.....	33
Avaliação da proteção das aves contra a infecção por <i>Salmonella</i> Heidelberg (SH)	33

Avaliação da infecção sistêmica	33
Amostras de órgãos	34
Amostras de conteúdo cecal	34
Avaliação da excreção fecal de <i>Salmonella</i> Heidelberg	35
Análise estatística	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
Avaliação da proteção das aves contra a infecção por <i>Salmonella</i> Heidelberg (SH)	36
CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

CAPÍTULO 3 - INTEGRIDADE ENTÉRICA DE FRANGOS DE CORTE TRATADOS COM PROBIÓTICO POR DIFERENTES VIAS E DESAFIADOS COM *Salmonella* Heidelberg.....

RESUMO	49
ABSTRACT	50
INTRODUÇÃO	51
MATERIAL E MÉTODOS	53
Delineamento experimental.....	53
Probiótico.....	54
Tratamento <i>in ovo</i>	54
Tratamento por spray.....	54
Desafio com <i>Salmonella</i> Heidelberg	54
Histomorfometria entérica e contagem do número de células caliciformes na mucosa intestinal.....	57
Avaliação ultraestrutural da integridade entérica.....	58
Análise Estatística.....	58
RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
Histomorfometria entérica e contagem do número de células caliciformes na mucosa intestinal.....	59
Avaliação ultraestrutural da integridade entérica.....	72
CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

CAPÍTULO 4 – IMPLICAÇÕES

Lista de Tabelas

Capítulo 2 - PROBIÓTICO NA REDUÇÃO DA INFECÇÃO EM FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM <i>Salmonella</i> Heidelberg	24
Tabela 1 – Composição centesimal e nutricional calculada da ração basal no período de 1 a 23 dias de idade	32
Tabela 2 – Análise microbiológica quanlitativa em órgãos, conteúdo cecal e suabe de cloaca de frangos de corte tratados com probiótico e contaminados com <i>Salmonella</i> Heidelberg	37
Tabela 3 – Análise microbiológica quantitativa ($\log_{10}$ UFC/g) e qualitativa para presença de <i>Salmonella</i> Heidelberg em aves que receberem desafio com a bactéria diretamente via intraesofágica	38
Capítulo 3 - INTEGRIDADE ENTÉRICA DE FRANGOS DE CORTE TRATADOS COM PROBIÓTICO POR DIFERENTES VIAS E DESAFIADOS COM <i>Salmonella</i> Heidelberg	48
Tabela 1 – Composição centesimal e nutricional calculada da ração basal no período de 1 a 23 dias de idade	56
Tabela 2 – Médias de altura de vilo, profundidade de cripta e largura de vilo (μm) da mucosa do duodeno de frangos de corte aos 5 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com <i>Salmonella</i> Heidelberg	62
Tabela 3 – Médias de altura de vilo, profundidade de cripta e largura de vilo (μm) da mucosa do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 5 e 9 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com <i>Salmonella</i> Heidelberg	63
Tabela 4 – Médias de profundidade de cripta (μm) da mucosa do duodeno e íleo de frangos de corte aos 16 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com <i>Salmonella</i> Heidelberg	64

Tabela 5 – Médias de altura de vilo, profundidade de cripta e largura de vilo (μm) da mucosa do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 16 e 23 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com *Salmonella* Heidelberg 65

Tabela 6 – Contagem do número de células caliciformes na mucosa do duodeno e jejuno de frangos de corte aos 5 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com *Salmonella* Heidelberg 69

Tabela 7 – Contagem do número de células caliciformes na mucosa do íleo de frangos de corte aos 5 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com *Salmonella* Heidelberg 69

Tabela 8 – Contagem do número de células caliciformes na mucosa do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 9 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com *Salmonella* Heidelberg 70

Tabela 9 – Contagem do número de células caliciformes na mucosa do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 16 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com *Salmonella* Heidelberg 70

Tabela 10 – Contagem do número de células caliciformes na mucosa do duodeno de frangos de corte aos 23 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com *Salmonella* Heidelberg 71

Tabela 11 – Contagem do número de células caliciformes na mucosa do jejuno e íleo de frangos de corte aos 23 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com *Salmonella* Heidelberg 71

Lista de Figuras

Capítulo 2 - PROBIÓTICO NA REDUÇÃO DA INFECÇÃO EM FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM *Salmonella* Heidelberg 24

Figura 1 - Análise Microbiológica em fígado de frangos de corte tratados com probiótico e desafiados experimentalmente com *Salmonella* Heidelberg 42

Figura 2 - Análise Microbiológica em baço de frangos de corte tratados com probiótico e desafiados experimentalmente com *Salmonella* Heidelberg 42

Figura 3 - Análise Microbiológica do conteúdo cecal de frangos de corte tratados com probiótico e desafiados experimentalmente com *Salmonella* Heidelberg ... 43

Figura 4 - Análise Microbiológica do suabe de cloaca de frangos de corte tratados com probióticos e desafiados experimentalmente com *Salmonella* Heidelberg 43

Capítulo 3 - INTEGRIDADE ENTÉRICA DE FRANGOS DE CORTE TRATADOS COM PROBIÓTICO POR DIFERENTES VIAS E DESAFIADOS COM *Salmonella* Heidelberg 48

Figura 1 - Fotomicrografia da mucosa ileal de frangos de corte aos 5 dias de idade. Tratamentos: Ctr N: controle negativo – sem probiótico e sem desafio com *Salmonella* Heidelberg; T1: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T2: probiótico pulverizado via spray no nascimento. 400X, 800X e 1500X 74

Figura 2 - Fotomicrografia da mucosa ileal de frangos de corte aos 9 dias de idade. Tratamentos: Ctr N: controle negativo – sem probiótico e sem desafio com *Salmonella* Heidelberg; T1: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T2: probiótico pulverizado via spray no nascimento. 400X, 800X e 1500X 75

Figura 3 - Fotomicrografia da mucosa ileal de frangos de corte aos 16 dias de idade. Tratamentos: Ctr N: controle negativo – sem probiótico e sem desafio com *Salmonella* Heidelberg; T1: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T2: probiótico pulverizado via spray no nascimento. 400X, 800X e 1500X 76

Figura 4 - Fotomicrografia da mucosa ileal de frangos de corte aos 23 dias de idade. Tratamentos: Ctr N: controle negativo – sem probiótico e sem desafio com *Salmonella* Heidelberg; T1: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T2: probiótico pulverizado via spray no nascimento. 400X, 800X e 1500X 77

Figura 5 - Fotomicrografia da mucosa ileal de frangos de corte aos 5 dias de idade. Tratamentos: Ctr I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. 400X, 800X e 1500X 78

Figura 6 - Fotomicrografia da mucosa ileal de frangos de corte aos 9 dias de idade. Tratamentos: Ctr I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. 400X, 800X e 1500X 79

Figura 7 - Fotomicrografia da mucosa ileal de frangos de corte aos 16 dias de idade. Tratamentos: Ctr I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. 400X, 800X e 1500X 80

Figura 8 - Fotomicrografia da mucosa ileal de frangos de corte aos 23 dias de idade. Tratamentos: Ctr I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. 400X, 800X e 1500X 81

Figura 9 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 5 dias de idade. Tratamentos: Ctr N: controle negativo – sem probiótico e sem desafio com *Salmonella* Heidelberg; T1: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T2: probiótico pulverizado via spray no nascimento. 400X, 1500X e 5000X 84

Figura 10 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 9 dias de idade. Tratamentos: Ctr N: controle negativo – sem probiótico e sem desafio com *Salmonella* Heidelberg; T1: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T2: probiótico pulverizado via spray no nascimento. 400X, 1500X e 5000X 85

Figura 11 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 16 dias de idade. Tratamentos: Ctr N: controle negativo – sem probiótico e sem desafio com *Salmonella* Heidelberg; T1: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T2: probiótico pulverizado via spray no nascimento. 400X, 1500X e 5000X 86

Figura 12 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 23 dias de idade. Tratamentos: Ctr N: controle negativo – sem probiótico e sem desafio com *Salmonella* Heidelberg; T1: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T2: probiótico pulverizado via spray no nascimento. 400X, 1500X e 5000X 87

Figura 13 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 5 dias de idade. Tratamentos: Ctr I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. 400X, 1500X e 5000X 88

Figura 14 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 9 dias de idade. Tratamentos: Ctr I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. 400X, 1500X e 5000X 89

Figura 15 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 16 dias de idade. Tratamentos: Ctr I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. 400X, 1500X e 5000X 90

Figura 16 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 23 dias de idade. Tratamentos: Ctr I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. 400X, 1500X e 5000X 91

Figura 17- Fotomicrografia aos 5, 9, 16 e 23 dias de idade da mucosa ileal à esquerda e cecal à direita de frangos de corte que receberam desafio com *Salmonella* Heidelberg via intraesofágica. Tratamentos: Ctr I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. Íleo: 400X, 800X e 1500X e ceco: 400X, 1500X e 5000X..... 92

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

INTRODUÇÃO

Entre os setores do agronegócio brasileiro, a avicultura é o que apresenta melhores perspectivas de mercado, com produção de 13,05 milhões de toneladas de carne de frango em 2017, inferior apenas à produção dos Estados Unidos. Contudo, o Brasil manteve-se como o maior exportador mundial, com 4.320 milhões de toneladas (ABPA, 2018).

Frente a esse panorama a maximização da produtividade é um dos principais objetivos do setor avícola, o qual é estimulado constantemente por novas tecnologias e pelo melhoramento genético das aves. Além disso, a biosseguridade dos plantéis pode ser utilizada como elemento para potencializar a produtividade e manter o país produzindo e exportando com sanidade e qualidade (Mendes, 2015).

Desta forma, o *status* sanitário é um dos fatores determinantes para o incremento dos negócios e para manter a alta produtividade. A fim de reduzir a incidência de enfermidades que podem levar a contaminação da carne de frango por patógenos como a *Salmonella* spp., capazes de gerar doenças pelo consumo de alimentos contaminados. Além de que, influências culturais e religiosas dos diferentes mercados importadores da carne de frango brasileira, assim como nichos de mercado interno, estabelecem critérios distintos em relação à produção e consumo de produtos avícolas (Clavijo & Flórez, 2018).

Assim, alguns países impõem diversas exigências para importar produtos cárneos. A União Europeia (UE), por exemplo, desde 2006, adotou medidas para assegurar a saúde do consumidor e certificar que os alimentos de origem animal comercializados sejam seguros para o consumo. Dessa forma, não é permitido o uso de qualquer antimicrobiano promotor de crescimento na produção animal, sendo permitido o uso de antibióticos e quimioterápicos somente com finalidade terapêutica (EMA, 2017).

Desde então, diversas alternativas naturais aos antimicrobianos têm sido estudadas a fim de melhorar o desempenho animal, diminuir a contaminação das aves e carcaças por bactérias patogênicas, sem efeito residual nocivo para o consumidor final. Assim, enzimas, extratos de plantas, óleos, ácidos orgânicos, prebióticos, probióticos e suas associações tornaram-se aliados à nova tendência de mercado (EMA, 2017).

O desafio do setor avícola é maximizar a saúde intestinal dos plantéis, sendo que o termo saúde intestinal relaciona-se ao desenvolvimento e integridade da

mucosa entérica, além da relação com a composição da microbiota intestinal e da atuação do sistema imune (Oliveira et al., 2012).

A incubação artificial de frangos de corte leva ao atraso da colonização do intestino por microorganismos desejáveis devido à falta de contato com aves adultas. A colonização inicial da microbiota intestinal não é apenas importante para evitar que bactérias patogênicas se colonizem por exclusão competitiva, mas também é importante para estimular o desenvolvimento e a maturação do sistema imunológico (Oliveira et al., 2014).

Os probióticos se destacam como uma alternativa para manter a saúde do hospedeiro por meio do equilíbrio da microbiota intestinal, uma vez que desempenham papel na modulação benéfica da microbiota intestinal, na melhora da resposta imune, na integridade intestinal e, conseqüentemente, no desempenho (Kuritza et al., 2014).

REVISÃO DE LITERATURA

Desenvolvimento do trato gastrointestinal

Nas aves o desenvolvimento do trato gastrointestinal se inicia nas primeiras 24 horas de vida do embrião. Ao quinto dia de vida embrionária, ocorre a diferenciação da boca, assim como a formação do proventrículo e da moela. No sexto dia de vida tem início a formação do bico. Ao décimo quarto dia de vida embrionária ocorre à introdução do intestino na cavidade abdominal e no décimo sétimo dia ocorre à abertura do divertículo de Meckel e no intestino, inicia-se o mecanismo fisiológico da absorção do saco vitelínico (Maiorka & Rocha, 2009).

No período de incubação, a taxa de crescimento do intestino delgado é maior que os demais órgãos. Durante os três últimos dias de incubação, até o momento da eclosão o peso do intestino delgado do embrião passa de 1,4% para 3,4% do peso corporal do mesmo (Uni et al., 2003 a,b).

Logo após a eclosão, na mucosa do intestino delgado, ocorre uma série de processos altamente complexos, todos eles baseados na divisão, diferenciação, movimento e morte celular (Cesário, 2013). O trato gastrointestinal sofre um processo de maturação na fase pós-eclosão, à semelhança do que ocorre com os sistemas termorregulador e imunológico. Sendo o pinto submetido à dieta sólida na fase pós-eclosão, há necessidade de um bom entendimento dos processos de desenvolvimento morfofuncional durante as duas primeiras semanas de vida da ave, período este que representa 30% do tempo de vida do frango de corte (Boaro, 2009).

A estrutura dos órgãos tubulares do sistema digestório das aves segue, como nos mamíferos, um modelo estrutural básico, constituído por quatro túnicas ou camadas concêntricas, com características histológicas e funcionais distintas, denominadas da luz tubular para periferia do órgão de: mucosa, a qual se apresenta constituída por um epitélio estratificado pavimentoso, por uma lâmina própria, constituída de tecido conjuntivo frouxo e uma muscular da mucosa constituída de tecido muscular liso, a qual tem por função controlar os movimentos da mucosa intestinal que são independentes dos da túnica muscular; submucosa, muscular e serosa (Boaro, 2009).

A mucosa intestinal possui muitas dobras microscópicas denominadas vilosidades ou vilos (Boleli et al., 2002). O número e tamanho dos vilos dependem do número de células que o compõem. Assim, quanto maior o número de células, maior o tamanho do vilos, e pôr consequência, maior a área de absorção de nutrientes. Dessa forma, a absorção somente se efetivará quando houver integridade funcional das

células dos vilos, tanto na membrana luminal quanto na membrana basolateral. Outro fator muito relevante para absorção dos nutrientes na membrana luminal é a quantidade de microvilos existentes nos enterócitos (Boaro, 2009).

A túnica mucosa apresenta-se constituída por três tipos celulares estruturais, com estrutura, ultraestrutura e funções distintas; sendo elas os enterócitos, células caliciformes e células enteroendócrinas (Boleli et al., 2002).

Os enterócitos, também chamados de célula de absorção, são responsáveis pela digestão final do alimento e pelo transporte dos nutrientes a partir do lúmen e/ou para o lúmen. Assim, os enterócitos realizam parte da digestão que ocorre na superfície das vilosidades, em ação conjunta as enzimas de membrana. A absorção de moléculas pelo epitélio intestinal segue, portanto, dois caminhos distintos: a transcelular realizada pelos enterócitos, na qual as moléculas presentes no lúmen entram nos enterócitos através da superfície apical e os deixam através da superfície basolateral em direção ao sangue; e a paracelular, realizada pelo espaço intercelular os quais dependem diretamente dos espaços juncionais existente entre os enterócitos (Boleli et al., 2002).

A máxima capacidade de digestão e absorção ocorre quando o animal apresenta grande área luminal, com altas vilosidades e enterócitos maduros, sendo fundamental para o seu desenvolvimento (Cera et al., 1988; Boleli et al., 2002). As células caliciformes presentes nas vilosidades e criptas, também possuem importante papel na manutenção e desenvolvimento do epitélio intestinal, estas são secretoras de glicoproteínas (mucinas) componente principal do muco gastrointestinal, são altamente polarizadas, possuem curto tempo de vida (7 dias), e sua membrana apical abre-se para o lúmen intestinal (Quigley, 2001; Van Dijk et al., 2002).

O muco possui função de proteger o epitélio durante a digestão, contra ação de enzimas digestivas e efeitos abrasivos da digesta, além de possuir poder lubrificante sobre alimentos sólidos. Outro papel importante do muco é na proteção contra infecções, atua como barreira protetora impedindo o contato de microorganismos com as células epiteliais. Portanto, as células caliciformes aumentam a produção de muco em caso de jejum ou alterações na dieta, pois estas situações podem ocasionar redução na camada de muco e propiciar ação de bactérias e protozoários patogênicos que causam destruição da mucosa (Forstner et al., 1995).

No intestino delgado, ceco e cólon/reto o muco contém uma rica população de bactérias e protozoários, as quais se ligam às glicoproteínas e não sofrem aderência à mucosa. Os componentes da mucina funcionam como falsos receptores para os microorganismos, fazendo com que os mesmos sejam envoltos pela camada de muco e não expressando sua capacidade patogênica (Furlan, 2010).

As células enteroendócrinas, também denominadas de células argentafins, são produtoras de hormônios peptídicos como gastrina, colecistoquinina, secretina, polipeptídeo inibidor gástrico e monoaminas biogênicas que são substâncias que participam na regulação da digestão, absorção e utilização de nutrientes (Solcia et al., 1978).

Importância da alimentação precoce

O trato gastrointestinal, como a principal interface entre o organismo e seu ambiente nutricional, desempenha papel crítico no desenvolvimento da ave recém-eclodida (Noy & Sklan, 1995). O desenvolvimento intestinal pode limitar o crescimento das aves na primeira semana de vida. Fatores tais como atraso no fornecimento da alimentação ou a presença de contaminantes na dieta podem retardar o desenvolvimento do trato gastrointestinal na ave jovem e, deste modo, ter um efeito negativo sobre o desempenho e eficiência produtiva (Dibner et al., 1996).

O acesso precoce do embrião a nutrientes pode melhorar o desenvolvimento do trato gastrointestinal, do sistema muscular e imune, a eclodibilidade e o desempenho do frango de corte além da maior absorção da gema residual (Uni & Ferket, 2004; Careghi et al., 2005; Foley et al., 2011),

Quando todas as reservas da gema forem usadas pós-eclosão, o pinto depende da disponibilidade de nutrientes exógenos para digestão e absorção por meio do trato gastrointestinal para crescimento continuado e desenvolvimento. É fundamental que o desenvolvimento do trato gastrointestinal seja mantido e finalizado dentro dos primeiros dias pós-eclosão a fim de expressar o seu máximo potencial genético (Uni et al., 2003b). Existe uma relação direta entre ganho de peso intestinal e atividade enzimática secretora (Sell et al., 1991; Noy & Sklan, 1999). Isso fornece suporte para a necessidade de pintos ganharem acesso a alimentos externos o mais rápido possível para continuar o crescimento e desenvolvimento do trato gastrointestinal (Roto et al., 2016).

Com base nesta premissa, o conceito da suplementação de nutrientes na fase pré-eclosão, ou nutrição *in ovo*, foi estabelecido. A metodologia de alimentação *in ovo* tem como finalidade suplementar nutrientes ou outras substâncias ao embrião antes do processo de eclosão. Esta técnica consiste na introdução de uma agulha através da casca e suas membranas até atingir o líquido amniótico, disponibilizando a substância inoculada ao embrião (Rocha & Maiorka, 2013).

O objetivo principal da administração de nutrientes *in ovo* é desenvolver a capacidade funcional de digestão e absorção de nutrientes (Ferket, 2012). A inoculação de nutrientes no fluído amniótico permite o contato das substâncias injetadas com as células do trato gastrointestinal, podendo antecipar o processo digestivo e absorptivo do neonato e melhorar seu estado nutricional (Rocha & Maiorka, 2013).

Os 3 pilares cruciais para o desenvolvimento ideal do frango de corte consistem em fornecimento de alimento completo, hidratação e colonização intestinal adequada. A nutrição e colonização do trato gastrointestinal do neonato ainda no incubatório também se destaca como ferramenta possível antes de sua chegada às granjas, para o desenvolvimento precoce dos sistemas gastrointestinal e imune com o objetivo de obter ganhos substanciais no desempenho produtivo e sanitário das aves durante todo o ciclo de produção (Scottá et al., 2014).

A pulverização de nutrientes via spray logo após o nascimento e seleção também se destaca como via alternativa para suplementação de nutrientes, sendo que esta fase compreende as primeiras 24 horas de vida da ave. O que se pretende com essa técnica é que a ave tenha contato com agentes tróficos para atender os requerimentos durante o período pós-eclosão, processamento de incubatório, transporte e primeiras horas de alojamento (Scottá et al., 2014).

Probiótico

Entre os aditivos alternativos que exercem papel de agente trófico os probióticos destacam-se como alternativa viável para ser utilizada ainda no incubatório, seja com uso da técnica de inoculação *in ovo* ou pela pulverização via spray ao nascimento.

Os probióticos são cultura única ou mista de microorganismos vivos capazes de afetar benéficamente seu hospedeiro de forma a melhorar o equilíbrio microbiano intestinal (Fuller, 1989). Em 2002, a FAO/WHO definiu probióticos como microorganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefício à saúde do hospedeiro.

Um bom probiótico caracteriza-se por apresentar: efeitos benéficos na saúde do hospedeiro, atóxico e não patogênico, estar presente como células viáveis, ser capaz de sobreviver e metabolizar no epitélio intestinal, enfrentar condições adversas, como a produção de sais biliares, sucos gástricos, pancreáticos e entéricos, possuir

capacidade antagônica às bactérias prejudiciais e atividade de modulação imunológica (Fuller, 1989; JOINT WHO/FAO/OIE, 2003).

Outras características desses microorganismos é que auxiliam na metabolização de carboidratos, proteínas, lipídeos e sais minerais, sintetizam vitaminas do complexo B, vitamina A, C, K e o ácido fólico, digerem as fibras e a celulose o que leva a liberação de ácidos graxos voláteis, os quais podem suprir de 5 a 10% da energia necessária (Lancini, 1994).

Entre as bactérias mais comumente utilizadas para o preparo do probiótico estão: *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Bifidobacterium* spp., *Bacillus subtilis* e *Bacillus toyoi* (Kabir, 2009).

A persistência e a manutenção desses microorganismos no trato gastrointestinal se fazem de duas formas principais: (i) fixadas ou em íntima associação com o epitélio intestinal (muco), se multiplicando mais rapidamente do que sua eliminação pelo peristaltismo intestinal. A microbiota aderida por meio de sistema chave-fechadura ao muco é formada por bactérias extremamente adaptadas que são capazes de formar uma barreira física protetora natural do trato gastrointestinal. É o caso típico de algumas espécies de *Lactobacillus* spp. e *Enterococcus* spp. (Pedroso et al., 2016).

Outros (ii) se encontram dispersos no lúmen intestinal, pela sua incapacidade de aderir ao epitélio intestinal. Neste caso, sua permanência se dá pela agregação a outras bactérias, que por sua vez estão aderidas à mucosa entérica. Nesse contexto, é possível entender a ação de vários probióticos, como *Enterococcus* spp. e *Bacillus* spp., que por não possuírem fímbrias, não se aderem ao epitélio, mas hidrolisam compostos que servirão de nutrientes para bactérias colonizadoras benéficas, principalmente os *Lactobacillus* spp. além de produzirem bacteriocinas que podem evitar a proliferação de bactérias indesejáveis como *Salmonella* spp. e *Clostridium* spp. (Park et al., 2016).

Os mecanismos de ação descritos para explicar o funcionamento dos probióticos são: (a) competição por sítios de ligação, (b) produção de substâncias antibacterianas, (c) competição por nutrientes e (d) estímulo ao sistema imunológico (Jin et al., 1998, Lee et al., 2010).

a) Competição por sítios de ligação. Os microorganismos probióticos viáveis quando adicionados à dieta passam a predominar aderindo-se ao epitélio intestinal (sítio de ligação), de modo a formar uma barreira física que dificulta a adesão de

bactérias patogênicas. Assim, as bactérias patogênicas seriam excluídas por competição (Wu et al., 2011).

Esse processo de aderência é feito por polissacarídeos que são moléculas de açúcares ramificadas, e que se estendem da parede externa da bactéria e forma uma estrutura chamada de glicocálix ou fímbria, que envolve a célula ou colônia de bactérias (Macari et al., 2014).

Tendo em vista que os enterócitos presentes no intestino delgado também possuem glicocálix, pode-se concluir que a colonização por bactérias nos diferentes segmentos do trato gastrointestinal está na dependência da aderência do glicocálix da bactéria com o glicocálix do enterócito. Sendo que esse elo, em muitos casos, pode ser uma proteína chamada lectina, que se liga especificamente a um polissacarídeo com estrutura molecular peculiar. Assim, é provável que esse mecanismo regule todo o processo de colonização das bactérias no trato gastrointestinal das aves (Macari et al., 2014).

b) Produção de substâncias antibacterianas. Bactérias probióticas produzem compostos orgânicos que matam ou inibem o crescimento de outras bactérias. Podem agir de forma isolada ou em conjunto como outras substâncias, como exemplo, ácidos orgânicos - ácidos graxos voláteis de cadeia curta (propiónico, acético, butírico, láctico) e peróxido de hidrogênio, que têm ação antibacteriana, especialmente em relação às bactérias patogênicas (Flemming & Freitas, 2005).

Alguns microorganismos probióticos produzem bacteriocinas, que são compostos protéicos com ação inibitória ou destrutiva contra uma espécie ou mesmo uma cepa específica de uma bactéria. Algumas bactérias do trato gastrintestinal produzem bacteriocinas como uma vantagem competitiva, sendo parte importante no processo de exclusão competitiva realizada pelas bactérias. As bacteriocinas são descritas como antibióticos próprios das bactérias, com ação local e inibição do crescimento de patógenos intestinais. O principal modo de ação das bacteriocinas é sobre peptídeos responsáveis pela permeabilidade da membrana das bactérias (Silva et al., 2006).

Além disso, as bactérias probióticas produtoras de ácidos orgânicos como láctico e propiónico possuem efeito químico, pois esses ácidos levam a redução do pH do ambiente intestinal, com consequente inibição de bactérias patogênicas, principalmente em relação ao *Campylobacter* spp., *Clostridium* spp. e *Salmonella* spp. (Busanello et al., 2012).

Outras espécies probióticas, podem produzir substâncias com capacidade de neutralizar enterotoxinas produzidas por bactérias patogênicas. Algumas bactérias secretam enzimas como a β -glucoronidase e hidrolases de sais biliares que liberam

compostos como ácidos biliares com ação inibitória sobre as outras bactérias (Loddi, 2001).

c) Competição por nutrientes. Essa competição ocorre no lúmen intestinal e é entre bactérias intestinais por nutrientes específicos. A escassez de nutrientes disponíveis na luz intestinal que possam ser metabolizados pelas bactérias patogênicas é um fator limitante de manutenção das mesmas neste ambiente (Silva & Alves Filho, 2000).

Os probióticos se nutrem de ingredientes que foram parcialmente degradados pelas enzimas digestivas ou que foram intencionalmente adicionados à dieta como os prebióticos (Macari et al., 2014).

Além disso, os probióticos também são capazes de influenciar na permeabilidade do epitélio intestinal, proporcionando maior eficiência na digestão e absorção de nutrientes. Além de protegerem o epitélio intestinal, evitam que os patógenos utilizem aminoácidos, minerais e carboidratos para fermentação e produção de toxinas, contribuindo para a eficiência alimentar e o desempenho dos animais (Higgins et al., 2010).

d) Estímulo do sistema imune. O trato gastrointestinal das aves é o órgão de maior responsabilidade no desenvolvimento da imunidade geral inespecífica sendo considerados como aqueles caminhos natos ou inerentes pelos quais as aves resistem às doenças, já que muitos patógenos não podem penetrar ou ficam presos nas secreções pela densa microbiota presente no intestino. Este sistema protetor quase sempre não é considerado quando se planeja um programa de sanidade avícola (Morgulis, 2008).

Mais atualmente, um novo mecanismo de comunicação através da produção e difusão de pequenas moléculas químicas ou sinalizadoras entre bactérias vem sendo estudado o *quorum sensing*. Este sistema de linguagem permite a coordenação do comportamento bacteriano em relação ao meio ambiente, regulando a expressão de genes especializados, em resposta à densidade populacional, além da intervenção em diversos processos fisiológicos como a diferenciação celular e fluxo de nutrientes, a bioluminescência, indução de fatores de virulência em patógenos, biossíntese de antibióticos e a formação de biofilmes (Bai & Rai, 2011).

Estudo com alguns *Lactobacillus* spp. demonstraram que estes possuem mecanismo de comunicação denominado de *quorum sensing* que produzem, liberam e reconhecem substâncias sinalizadoras, resultando em resposta coletiva as quais regulam atividades fisiológicas para sobreviver e prosperar. Os autores observaram que os *Lactobacillus* spp. sobreviveram à interação com a *Salmonella* spp. e a inibição foi aumentada após a interação (Moraes et al., 2017).

Os *Lactobacillus* spp. apresentam antagonismo à *Salmonella* spp. (Lima et al., 2009). Com isso, pode-se reduzir a ocorrência de infecção alimentar e a utilização de drogas no controle da doença nas aves, consequentemente os gastos e perdas econômicas para os produtores também são reduzidos (Moraes et al., 2017).

Na produção avícola cada vez mais os probióticos são aplicados como alternativa para reduzir a infecção por *Salmonella* spp. Estudos com a utilização de bactérias probióticas como, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus* e *Bifidobacterium bifidum*, na dieta de frangos de corte aumentaram a expressão de células caliciformes, CD4+ e CD8+ na mucosa intestinal das aves e reduziram o isolamento de *Salmonella* spp. no ceco após o desafio microbiológico (Lourenço et al., 2013).

Segundo Lorençon et al. (2007), para boa eficiência, os probióticos devem ser utilizados já nos primeiros dias de vida dos pintos, para que ocorra a exclusão competitiva, principalmente beneficiando um bom equilíbrio entre os microorganismos benéficos e para se obter melhores resultados.

Adicionalmente, a administração no incubatório é importante, pois as aves recebem bactérias benéficas logo após o nascimento, as quais colonizam precocemente o trato gastrointestinal, diminuem os desafios por patógenos e incrementam o desempenho produtivo (Flemming & Freitas, 2005). Para que ocorra a modulação da microbiota intestinal, Bertechini & Hossain (1993) recomendaram que os probióticos sejam fornecidos precocemente às aves, pois as primeiras bactérias a chegarem ao trato gastrointestinal tenderão a colonizá-lo.

A inclusão de *Bacillus subtilis* na dieta de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Heidelberg no primeiro dia de vida reduziu a presença da bactéria no conteúdo cecal e suabe de arrasto aos 42 dias (Knap et al., 2011).

Estudo realizado por Teague et al. (2017), com o objetivo de avaliar a inoculação de probiótico *in ovo* e seu efeito sobre a composição da microbiota entérica, análise morfométrica e controle de infecção por *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte, observou que o probiótico foi capaz de reduzir as bactérias gram negativas presentes no trato gastrointestinal, além de aumentar a superfície das vilosidades de íleo bem como reduzir significativamente a incidência de *Salmonella* Enteritidis.

Szabó et al. (2009) utilizaram *Enterococcus faecium* como cepa probiótica contra desafio de *Salmonella* Typhimurium e constataram que o probiótico não protegeu da infecção por *Salmonella* spp. se comparado ao grupo controle, sendo que o grupo tratado eliminou maiores quantidades de *Salmonella* spp.

Com o uso de probiótico constituído por 11 cepas de *Lactobacillus*, Wolfenden et al. (2007) demonstraram a eficiência do uso spray deste produto após o nascimento das aves no incubatório. Esta forma da aplicação diminui as variáveis que podem ocorrer quando administrado através da água de bebida (temperatura da água, medicamentos antimicrobianos e desinfetantes).

A eficácia ou ineficácia de um produto probiótico pode ser relacionada com a sua composição microbiana e viabilidade, método de administração e frequência, a idade das aves, higiene das instalações, composição alimentar, bem como fatores ambientais de estresse (Song et al., 2014).

***Salmonella* spp.**

A *Salmonella* pertencente à família *Enterobacteriaceae* e caracteriza-se por ser um bacilo Gram negativo, anaeróbio facultativo, não formador de esporos e se comporta como patógeno intracelular facultativo (OIE, 2012).

Subdividem-se em duas espécies levando em consideração diferenças bioquímicas: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica* sendo que a última divide-se em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. A doença causada por *Salmonella* é genericamente chamada de salmonelose e pode acarretar grandes perdas econômicas para os criadores (Back, 2010).

Atualmente no mundo o gênero *Salmonella* está entre as bactérias mais estudadas, sendo que os estudos visam encontrar ferramentas para o controle da bactéria na cadeia avícola bem como elucidar as respostas imunológicas e realizar a caracterização bacteriológica. No entanto, muitas pesquisas ainda devem ser desenvolvidas com o objetivo de obter efetivo controle da bactéria no setor da avicultura (Barrow et al., 2012).

A *Salmonella* é frequentemente relatada em aves e seus subprodutos, e é reconhecida como importante patógeno, pois persiste assintomaticamente nas aves, podendo ser potencializada por falhas na aplicação das ferramentas de análise de perigos e pontos críticos de controle e de boas práticas. Além disso, sua prevalência é diferenciada nas diversas regiões do país e sua epidemiologia e controle são bastante complexas (Santos et al., 2013).

A *Salmonella* quando coloniza o trato gastrointestinal dos frangos pode persistir até o momento de abate, contaminando o produto final. A contaminação das carcaças também pode acontecer pela presença do microorganismo no ambiente de criação das aves e, conseqüentemente, pela contaminação das carcaças durante o abate,

mesmo quando os abatedouros são dotados de boas práticas de higienização e processamento (Colla et al., 2012).

Estudo realizado por Thompson & Applegate (2006) preconizaram que a *Salmonella* localiza-se preferencialmente aderida a porção do intestino grosso, o ceco, porém pela proximidade anatômica do último segmento do intestino delgado, o íleo, as mesmas podem colonizá-lo. Pelo uso da técnica da imunohistoquímica realizada por Desmidt et al. (1998) foi detectada a presença de *Salmonella* spp. nas criptas da mucosa cecal sendo que a aderência ocorre por meio de receptores específicos presentes nos enterócitos maduros.

A colonização da *Salmonella* spp. danifica a integridade intestinal, de forma que afeta a estrutura das vilosidades e criptas intestinais. A capacidade de sobrevivência no interior dos macrófagos facilita sua disseminação sistêmica, e pode atingir órgãos como fígado e baço (Chapell et al., 2009).

A gravidade da infecção sofre variação de acordo com o sorovar infectante, suscetibilidade do hospedeiro e idade das aves, sendo aves jovens mais vulneráveis à infecção, enquanto aves adultas podem tornar-se portadoras sem a manifestação de sinais clínicos (Barrow et al., 2000).

De acordo com o Ministério da Saúde e Secretaria de Vigilância em Saúde (2018) o perfil epidemiológico do Brasil entre os anos de 2007 a 2017 mostrou que entre os microorganismos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, as bactérias são responsáveis por 95,9% dos casos, com prevalência de, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

***Salmonella* Heidelberg**

A *Salmonella* Heidelberg (SH) é um sorovar pertencente à subespécie *enterica* e encontra-se dentre os sorovar mais frequentes de *Salmonella*. Atualmente nota-se aumento na frequência de isolamento no campo que se estende por toda cadeia produtiva e em produtos à base de ovos, carnes e derivados (Kottwitz et al., 2010).

Assim novas alternativas e medidas de biosseguridade mais rigorosas estão sendo adotadas dado que a *Salmonella* Heidelberg é um agente de infecção alimentar em humanos (Menconi et al., 2011). Sabe-se que infecções por *Salmonella* Heidelberg são mais invasivas do que os demais sorovar, consequentemente, podem causar maiores complicações como inflamações, infecções extra intestinais com possibilidade de levar a óbito (Colla et al., 2012).

Salmonella Heidelberg é citada como o terceiro isolado mais frequente na avicultura do Canadá e o quarto em doenças transmitidas por alimentos nos Estados Unidos (Chittick et al., 2006).

A *Salmonella* Heidelberg tem obtido importância na América do Norte, sendo encontrada em carne de aves em outros países. Esta também tem sido isolada e reportada em produtos avícolas no Brasil desde 1962 (Hofer et al., 1997).

OBJETIVOS

Objetivos gerais

Avaliar o efeito de um probiótico comercial administrado *in ovo* ou spray, quanto à ação na integridade entérica e capacidade de redução de *Salmonella* Heidelberg em frangos de corte.

Objetivos específicos

- Verificar o efeito de um probiótico comercial administrado *in ovo* ou spray, na redução de *Salmonella* Heidelberg por meio da quantificação da bactéria no conteúdo cecal, órgãos (fígado e baço) e suabe de cloaca em frangos de corte;

- Verificar o efeito de um probiótico comercial administrado *in ovo* ou spray sobre a histomorfometria, população celular e ultraestrutura da mucosa entérica em aves não contaminadas e em aves desafiadas experimentalmente com *Salmonella* Heidelberg.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal – Relatório Anual 2018. Disponível em: https://www.dropbox.com/s/4yxz1x4qmonkg0f/4653a_final_abpa_relatorio_anual_2018_web_paginas.pdf?dl=0. Acesso em 10 agosto de 2018.
- Back, A. Salmonelose. In: Manual de Doenças das Aves. 2 ed. Cascavel. Editora Integração, p.174-195, 2010.
- Bai, J.; Rai, R. Bacterial quorum sensing and food industry. *Comp Rev Food Science Food Safety*, v.10, p.184-194, 2011.
- Barrow, P.A. et al. The paratyphoid salmonellae. *Revue Scientifique et Technique*. v.19, n.2, p.351-375, 2000.
- Barrow, P.A.; Jones, M.A.; Smith, A.L.; Wigley, P. The long view: *Salmonella* – the last forty years. **Avian Pathol**, v. 41, n.5, p. 413-420, 2012.
- Bertequini, A.G.; Hossain, S.M. Utilização de um tipo de probiótico como promotor de crescimento em rações de frangos de corte. In: Conferência apinco de ciência e tecnologia avícola, 1993, Santos. **Anais...** Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p.1, 1993.
- Boaro, B.M. Morfofisiologia do trato intestinal. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2009, Porto Alegre. **Anais...** Facta: Campinas, 2009. p. 262-274.
- Boleli, I. C.; Maiorka, A.; Macari, M. Estrutura funcional do trato digestório. In: Macari, M.; Furlan, R. L.; Gonzales, E. Fisiologia Aviária aplicada a frangos de corte. 2ª ed. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, p.75-95, 2002.
- Busanello, M.; Pozza, M.S.S.; Barros, P.C.; Chambo, A.P.S.; Eckstein, I.I. Probióticos, seus modos de ação e a produção animal. *Scientia Agraria Paranaensis*, v.11, n.4, p.14-24, 2012.
- Careghi, C.; Tona, K.; Onagbesan, O.; Buyse, J.; Decuyper, E.; Bruggeman, V. The effects of the spread of hatch and interaction with delayed feed access after hatch

on broiler performance until seven days of age. **Poultry Science**, v.84, p.1314–1320, 2005.

Cera, K.R.; Mahan, D.C.; Cross, R.F.; Reinhart, G.A.; Whitmoyer, R.E. Effect of age, weaning and posweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine. **Journal of animal science**, v.66, n. 2, p. 574-584, 1988.

Cesario, M.D. Desenvolvimento embrionário pré e pós-postura – períodos críticos. In: Macari, M.; Gonzalez, E.; Patrício, I.S.; Naas, I.A.; Martins, P.C. Manejo da incubação. 3ª Ed. Campinas: FACTA, p.48-62, 2013.

Chapell, L. et al. The immunology of avian systemic salmonellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.128, p.53-59, 2009.

Chittick, P.; Sulka, A.; Tauxe, R.V.; Fry, A.M. A summary of national reports of foodborne outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections in the United States: clues for disease prevention. **Journal of Food Protection**, v.69, p.1150–1153, 2006.

Clavijo, V.; Flórez, M.J.V. The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review, **Poultry Science**, v.97, p.1006–1021, 2018.

Colla, F.L.; Rodrigues, L.B.; Borsoi, A.; Dickel, E.L.; Nascimento, V.P.; Santos, L.R. Isolamento de *Salmonella* Heidelberg em diferentes pontos da tecnologia de abate de frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.79, n.4, p.603-606, 2012.

Desmidt, M.; Ducatelle, R.; Mast, J.; Goddeeris, M.; Kaspers, B.; Haesebrouck, F. Role of the humoral immune system in *Salmonella* Enteritidis phage type four infection in chickens. **Vet Immunol**, Amsterdam, v.63, n.4, p. 355-367, 1998.

Dibner, J.J.; Kitchell, M.L.; Atwell, C.A.; Ivey, J. The effect of dietary ingredients and age on the microscopic structure of the gastrointestinal tract in poultry. **Journal of Applied Poultry Research**, v.5, p.70-77, 1996.

EMA (European Medicines Agency) and EFSA (European Food Safety Authority). EMA and EFSA Joint Scientific Opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting

impacts on food safety (RONAFA). [EMA/CVMP/570771/2015]. **European Food Safety Authority Journal**, v.15, n.1, pp. 245, 2017.

FAO/WHO (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2017.

Ferket, P.R. Embryo epigenetic response to breeder management and nutrition. World's Poultry Congress. Salvador Proceedings; Salvador, Brazil, 2012.

Flemming, J.S.; Freitas, R.J.S. Avaliação do efeito de prebióticos (MOS), probióticos (*Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*) e promotor de crescimento na alimentação de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.2, p.41-47, 2005.

Foley, S.L.; Nayak, R.; Hanning, I.B.; Johnson, T.J.; Han, J.; Ricke, S.C. Population dynamics of *Salmonella* enteric serotypes in commercial egg and poultry production. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.13, p.4273-4279, 2011.

Forstner, J.F.; Oliver, M.G.; Sylvester, F.A. Production, structure and biologic relevance of gastrointestinal mucins. In: Guerrant R.L. (Ed.), *Infections of Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York. p.71-88, 1995.

Fuller, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.6, p.365-378, 1989.

Furlan R.L. Aspectos fisiológicos da utilização de probióticos e prebióticos visando a saúde intestinal. Memórias Asociacion de Médicos Veterinarios Especialistas en Avicultura del Ecuador. AMEVEA-E, Quito. p. 25, 2010.

Higgins, J.P. et al. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture treatment timing on *Salmonella* Enteritidis in neonatal broilers. **Poultry Science**, v.89, p.243-247, 2010.

Hofer, E.; Silva Filho, S.J.; Reis, E.M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.2, p. 55-62, 1997.

Jin, L.Z. et al. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. **Poultry Science**, v.77 p.1259-1265, 1998.

JOINT WHO/FAO/OIE. Food and Agricultural Organization/World Health Organization Background document for the Joint WHO/FAO/OIE expert. In: Workshop on nonhuman antimicrobials usage and antimicrobials resistance scientific assessment. Geneva, Switzerland, December v.1, n.5, p.117, 2003.

Kabir, S.M.L. The Role of Probiotics in the Poultry Industry. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, p. 3531-3546. 2009.

Knap, I. Kehlet, A.B.; Bennedsen, M.; Mathis, G.F.; Hofacre, C.L.; Lumpkins, B.S.; Jensen, M.M.; Raun, M.; Lay, A. *Bacillus subtilis* (DSM17299) significantly reduces *Salmonella* in broilers. **Poultry Science**, v.90, p. 1690-1694, 2011.

Kottwitz, L.B.M.; Oliveira, T.C.R.M.; Alcocer, I.; Farah, S.M.S.S.; Abrahão, W.S.M.; Rodrigues, D.P. Avaliação epidemiológica dos surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no estado do Paraná. **Acta Scenarium Health Sciences**, v.32,n.1,p.9-15, 2010.

Kuritz, L.N.; Westphal, P.; Santin, E. Probióticos na avicultura. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.8, p.1457-1465, 2014.

Lancini, J.B. Fatores exógenos na função gastrointestinal. In: Fisiologia da Digestão e Absorção das Aves. Fundação Apinco, p. 99-126, 1994.

Lee, K. et al. Direct-fed antimicrobials and their impact on the intestinal microflora and immune system of chickens. **Journal of Poultry Science**, v.47, p.106-114, 2010.

Lima, E.T.; Andreatti Filho, R.L.; Gonçalves, G.A.M.; Rocha, T.S.; Menconi, A.M.; Okamoto, A.S. Perfil de sensibilidade de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis isolada de aves, frente a drogas e substâncias antimicrobianas produzidas por *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus salivarius*. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.1, p.180-189, 2009.

- Loddi, M.M. Probióticos e prebióticos na nutrição de aves. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, n.23, p.1-8, 2001.
- Lorençon, L., Nunes, R. V. N., Pozza, P. C., Pozza, M. S. S., Appelt, M. D., Silva, W. M. S. Utilização de promotores de crescimento para frangos de corte em rações fareladas e peletizadas. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v.29, p.151-158, 2007.
- Lourenço, M.C.; Kuritza, L.N.; Westphal, P.; Miglino, L.B.; Pickler, L.; Kraieski, A.L.; Santin, E. Uso de probiótico sobre a ativação de células T e controle de *Salmonella* Minnesota em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.1, p.11-14, 2013.
- Macari, M.; Lunedo, R.; Pedroso, A.A. Microbiota intestinal de aves. In: Macari, M.; Mendes, A.A., Menten, J.F; Naas, I.A. Produção de frangos de corte. 2ª Ed. Campinas: FACTA, p.300-319, 2014.
- Maiorka, A.; Rocha, C. Dietas iniciais, desenvolvimento do trato gastrointestinal e impacto sobre o desempenho de frango de corte. **V Intestinal Health Food Safety Seminar**, 2009.
- Menconi, A.; Wolfenden, A.D.; Shivaramaiah, S.; Terraes, J.C.; Urbano, T.; Kuttel, J.; Kremer, C.; Hargis, B.M.; Tellez, G. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture for the treatment of *Salmonella* enterica serovar Heidelberg in neonatal broiler chickens and turkey poults. **Poultry Science**, v.90, n.3, p.561-565, 2011.
- Mendes, A.A. sanidade avícola: o segredo do sucesso da avicultura brasileira. Audiência pública na câmara dos deputados. Brasília, 2015.
- Ministério da Saúde. Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. 2018. Disponível em: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>. Acessado em: 20 de agosto. 2018.
- Moraes, A.C.I.; Bastos, I.H.; Altarugio, R.; Nagayoshi, B.A.; Gross, L.S.; Okamoto, A.S.; Andreatti Filho, R.L. Avaliação da atividade inibitória de *Lactobacillus* spp.

sobre Salmonella Heidelberg. **Revista Ciência, Tecnologia & Ambiente**, v.6, n.1, p.43-49, 2017.

Morgulis, M.S. Imunologia Aplicada. In: Macari, M.; Furlan, R.L.; Gonzales, E. Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. Jaboticabal: FUNEP/UNESP. p.231, 2008.

Noy Y, Sklan D. Energy utilization in newly hatched chicks. **Poultry Science**, v.78, p.1750–1756, 1999.

Noy, Y.; Sklan, D. Digestion and absorption in the young chick. **Poultry Science**, v.74, n.2, p.366- 373, 1995.

Oliveira, J.E.; Van der Hoeven-Hangoor, E.; Van der Linde, I.B.; Montijn, R.C.; Van der Vossen, J.M. *In Ovo* Inoculation of Chicken Embryos with Probiotic Bacteria and Its Effect on Posthatch Salmonella Susceptibility. **Poultry Science**, v.93, p.818-829, 2014.

Oliveira, M.D.; Zavarize, K.C.; Gomes, N.A.; Rocha, F.R.T.; Martins, J.M.S.; Litz, F.H.; Castilhano, H. Aditivos alternativos na alimentação de aves. **PUBVET**, Londrina, v.6, n.27, ed. 214, 2012.

Organização mundial da saúde animal - OIE. **Bioseguridad y resistencia a los antimicrobianos**. 2012. Disponível em: <http://www.oie.int/es/para-losperiodistas/comunicados-de-prensa>. Acesso em: 11 set. 2017.

Park, Y. H., Hamidon, F., Rajangan, C., Soh, K. P., Gan, C. Y., Lim, T. S., ... Liong, M. T. Application of Probiotics for the Production of Safe and High-quality Poultry Meat. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v.36, n.5, p.567–576, 2016.

Pedroso, A.A.; Batal, A B.; Lee, M.D. Effect of in ovo administration of na adult-derived microbiota on establishment of the intestinal microbiome in chickens. **American Journal of Veterinary Research**, v.77, n.5, p.514-526, 2016.

Quigley, J. 2001. Calf Note #34-Intestinal mucin. In: Calf Notes.com. Disponível em <http://www.calfnotes.com/pdf/CN034.pdf>

- Rocha, C.; Maiorka, A. Nutrição “in ovo”. In: Macari, M.; Gonzalez, E.; Patrício, I.S.; Naas, I.A.; Martins, P.C. Manejo da incubação. 3ª Ed. Campinas: FACTA, p.223-239, 2013.
- Roto, S.M.; Kwon, Y.M.; Ricke, S.C. Applications of *in ovo* technique for the optimal development of the gastrointestinal tract and the potential influence on the establishment of its microbiome in poultry. **Frontiers in Veterinary Science**, v.3, p63, 2016.
- Santos, R.J.; Meza, S.K.L.; Martini, K.C.; Nunes, R.V. A importância do controle da *Salmonella* na cadeia produtiva de frango de corte. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.12, n.3, p.167-174, 2013.
- Scottá, B.A.; Campos, P.F.; Gomide, A.P.C.; Barroca, C.C.; Formigoni, A.S.; Zerlotini, M.F. Nutrição pré e pós-eclosão em aves. **PUBVET**, Londrina, v. 8, n. 8, Ed. 257, Art. 1702, 2014.
- Sell, J.L.; Angel, C.R.; Piquer, F.J.; Mallarino, E.G.; Al-Batshan, H.A. Development patterns of selected characteristics of the gastrointestinal tract of young turkeys. **Poultry Science**, v.70, p.1200–1205, 1991.
- Silva, C.A.; Hoshi, E.H.; Pacheco, G.D.; Briganó, M.V. Avaliação de probiótico (*Pediococcus acidilactici* e *Bacillus subtilis*) após o desmame e efeitos no desempenho de leitões. *Semana: Ciências Agrárias*, Londrina, v.27, n.1, p 133-140, 2006.
- Silva, E.N.; Alves Filho, R.L. Probióticos e prebióticos na avicultura. II simpósio de sanidade avícola, Santa Maria, RS. 2000.
- Solcia, E.; Polak, J.M.; Pearse, A.G.E.; Forssman, W.G.; Larsson, L.I.; Sundler, F.; Lechago, J.; Grimelius, L.; Fijita, T.; et al. Classification of gastroenteropancreatic endocrine cells. In: Bloom, S.R. (ed.). Gut hormones. Edinburgh, Churchill-Livingstone, p.40-48, 1978.

- Song, J.; Xiao, K. Ke, Y.L.; Jiao, L.F.; Hu, C.H.; Diao, Q.Y.; Shi, B.; Zou, X.T. Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. **Poultry Science**, v.93, n.3, p.581–588, 2014.
- Szabó, I.; Wieler, L.H.; Tedin, K.; Scharek-Tedin, L.; Taras, D.; Hensel, A.; Appel, b.; Nöckler, K. Influence of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 infection in a porcine animal infection model. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.9, p.2621-2628, 2009.
- Teague, K.D.; Graham, L.E.; Dunn, J.R.; Cheng, H.H.; Anthony, N.; Latorre, J.D.; Menconi, A.; Wolfenden, R.E.; Wolfenden, A.D.; Mahaffey, B.D.; Baxter, M.; Hernandez-Velasco, X.; Merino-Guzman, R.; Bielke, L.R.; Hargis, B.M.; Tellez, G. In ovo evaluation of FloraMax®-B11 on Marek's disease HVT vaccine protective efficacy, hatchability, microbiota composition, morphometric analysis, and *Salmonella* enteritidis infection in broiler chickens. **Poultry Science**, v.96, p.2074–2082, 2017.
- Thompson, K.L.; Applegate, T.J. Feed withdrawal alters small-intestinal morphology and mucus of Broiler. **Poultry Science**, v.85, p.1535–1540, 2006.
- Uni, Z.; Ferket, P.R. Methods for early nutrition and their potential. **World Poultry Science Journal**, v.60, p.103–113, 2004.
- Uni, Z.; Smirnov, A.; Sklan, D. Pre- and posthatch development of goblet cells in the broiler small intestine: effect of delayed access to feed. **Poultry Science**, v.82, p.320–327, 2003a.
- Uni, Z.; Tako, E.; Gal-Garber, O.; Sklan, D. Morphological, Molecular, and Functional Changes in the Chicken Small Intestine of the Late-Term Embryo. **Poultry Science**, v.82, p.1747–1754, 2003b.
- Van Dijk, J.; Huisman, J.; Koninkx, J. Structural and functional aspects of a healthy gastrointestinal tract. In: Structural and functional aspects of a healthy gastrointestinal tract. In: Nutrition and Health of the Gastrointestinal Tract. Ed. M. Blok, H. 2002.

Wolfenden, A.D.; Vicente, J.L.; Bielke, L.R.; Pixley, C.M.; Higgins, S.E.; Donoghue, D.J.; Hargis, B.M.; Tellez, G. Evaluation of spray application of a Lactobacillus-based probiotic on Salmonella Enteritidis colonization in broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, v.6, n.7, p.493-496, 2007.

Wu, B.Q.; Zhang, T.; Guo, L.Q.; Lin, J.F. Effects of Bacillus subtilis KD1 on broiler intestinal flora. **Poultry Science**, v.90, n.11, p.2493-2499, 2011.

CAPÍTULO 2

PROBIÓTICO NA REDUÇÃO DA INFECÇÃO EM FRANGOS DE CORTE
DESAFIADOS COM *Salmonella* Heidelberg

RESUMO - O experimento foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de probiótico administrado *in ovo* ou spray, quanto à capacidade de redução de *Salmonella* Heidelberg (SH) em órgãos e no conteúdo cecal de frangos de corte desafiados experimentalmente com SH. Foram utilizados 162 frangos de corte de um dia de idade, machos da linhagem Cobb®, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com 3 tratamentos, e 9 repetições de 6 aves cada. Sendo os tratamentos: Controle infecção: aves não tratadas com probiótico e desafiadas por contato com SH no 2º dia de vida; *In ovo*: aves tratadas *in ovo* com probiótico no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com SH no 2º dia de vida; Spray: aves tratadas por spray com probiótico no 1º dia de vida e desafiadas por contato com SH no 2º dia de vida. Um grupo de aves não tratadas foi desafiado no 1º dia de vida com cultura de SH, contendo $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, as aves receberam 0,5 mL da cultura bacteriana via intraesofágica. No 2º dia de vida, as aves infectadas foram anilhadas e alojadas junto às aves tratadas na proporção de 1 ave infectada para cada 5 aves livres de infecção. Aos 3, 5, 7, 14 e 21 dias pós-desafio, 5 aves mais 1 ave anilhada de cada tratamento, foram eutanasiadas para contagem de SH em órgãos e no conteúdo cecal. Os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ranks ao nível de 5% de significância. Aos 21 dias pós-desafio para análise de conteúdo cecal e aos 13 dias pós-desafio para o suabe de cloaca, foi possível observar que aves que receberam tratamento com probiótico via Spray apresentaram menor contaminação quando comparado com as aves que receberam tratamento com probiótico *In ovo* e Controle Infecção. O probiótico destaca-se como importante alternativa ao uso de antibióticos para controle de SH em frangos e corte, pois houve redução da contaminação no conteúdo cecal e em suabe de cloaca, sendo que a administração via Spray mostrou-se mais efetiva. Assim o probiótico pode ser considerado agente trófico eficaz e que atende as novas tendências de mercado.

PALAVRA-CHAVE: agente trófico, exclusão competitiva, *in ovo*, microbiológico, saúde intestinal

PROBIOTIC IN REDUCTION OF INFECTION IN BROILERS CHALLENGED WITH
Salmonella Heidelberg

ABSTRACT – A trial was conducted to evaluate the effect of probiotic administered *in ovo* or spray on the ability to reduce *Salmonella* Heidelberg (SH) in organs and cecal content in broilers challenged experimentally with SH. Were used 162 one-day-old, males, Cobb® chicks distributed in a completely randomized design with 3 treatments and 9 replicates of 6 birds each. The treatments were: Control Infection: birds not treated with probiotic and challenged by contact with SH on the 2nd day of life; *In ovo*: birds treated *in ovo* with probiotic on the 18th day of incubation and challenged by contact with SH on the 2nd day of life; Spray: birds treated by spray with the probiotic in the 1st day of life and challenged by contact with SH on the 2nd day of life; A group of untreated birds was challenged on the 1st day of life with SH culture containing 1.0×10^8 CFU/mL, the birds received 0.5 mL of the bacterial culture via intraesophageal. On the 2nd day of life, the infected birds were ringed and housed with birds from different treatments, in the ratio of 1 infected bird to 5 infected birds. At 3, 5, 7, 14 and 21 days after challenge, 5 birds plus 1 ringed bird of each treatment were euthanized for SH counts in organs and cecal contents. Data were submitted to Kruskal-Wallis ranks non-parametric test at the 5% level of significance. At 21 days post challenge for the analysis of cecal content and at 13 days post challenge for cloacal suabe, it was possible to observe that the birds that received treatment with probiotic via Spray presented lower contamination when compared to the birds that received treatment with probiotic *In ovo* and Control Infection. The probiotic is an important alternative to use of antibiotics to control SH in broilers, because there was a reduction in contamination in cecal content and in cloacal suabe, being that administration via Spray was more effective. Therefore the probiotic can be considered effective trophic agent and that satisfies the new market tendencies.

KEYWORDS: competitive exclusion, *in ovo*, intestinal health, microbiological, trophic agent

INTRODUÇÃO

Conduzido pela avicultura o Brasil é um dos líderes mundiais em produção de proteína animal. Sendo que alguns diferenciais na produção são os custos competitivos e, principalmente, o status sanitário ao longo dos anos (Lima, 2018).

A Salmonelose é reconhecida como uma das zoonoses mais complexas, tendo sido declarada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Organização de Agricultura Alimentar (FAO) como a zoonose mais comum e importante na saúde pública desde 1950. Sua epidemiologia e controle são complexos, em face às diferenças nos hábitos alimentares, na elaboração de alimentos, criação de animais, padrões de higiene e saneamento. Seu controle é permanente, tendo em vista a emergência de novos sorovares e reemergência de outros, tanto nos países em crescimento quanto nos industrializados (Rodrigues, 2018).

A *Salmonella* Heidelberg tem sido detectada em aves comerciais como um dos mais prevalentes sorovar de salmonela paratífóide. Esta bactéria tem causado graves toxinfecções em seres humanos devido ao consumo de ovos e produtos cárneos provenientes de aves infectadas (Cury, 2013).

A carne de frango é o alimento de maior enfoque na aplicação de programas de prevenção e controle aplicados por governos em todo o mundo visando à redução de casos de salmoneloses em humanos (Mead et al., 2010). No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), baseado na vigilância, controle e erradicação das principais doenças aviárias importantes para a saúde animal e humana. A adoção de práticas de controle sanitário e desenvolvimento técnico e científico tem objetivado reduzir a presença de patógenos na carne de frango e nas criações com intuito de fornecer produtos de excelente qualidade para o mercado nacional e internacional (Ferreira et al., 2013).

Na avicultura, a principal forma de controle de enfermidades bacterianas é o uso de antimicrobianos, além de muitas vezes serem como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho. Nos três primeiros casos, objetiva-se tratar ou prevenir uma doença bacteriana; os promotores de crescimento visam melhorar a eficiência de ganho de peso e a conversão alimentar. O mecanismo de ação de promotores de crescimento não é totalmente conhecido; acredita-se que possa estar relacionado: (i) à inibição de patógenos do trato gastrointestinal; (ii) promoção de microbiota benéfica; (iii) aumento da produção de vitaminas e outros fatores de crescimento no intestino; e (iv) otimização da absorção de nutrientes no intestino por tornar a mucosa mais delgada (Lekshmi et al., 2017). O uso de antimicrobianos como promotores de

crescimento é o mais controverso, pois emprega doses sub-terapêuticas, que, por sua vez, propiciariam a seleção de populações bacterianas resistentes aos antimicrobianos (Allen, 2014).

A preocupação com o aumento de resistência a antimicrobianos é mundial e abrange a medicina humana e animal. É consenso que a solução do problema apenas é possível com uma abordagem de Saúde Única que une humano-animal-ambiente (OIE, 2013). O plano de ação global para combater a resistência a antimicrobianos prevê como metas: melhorar o conhecimento sobre a resistência a antimicrobianos; aumentar o monitoramento de resistência a antimicrobianos; reduzir a incidência de infecções; otimizar o uso de antimicrobianos; e ampliar os investimentos em novos antimicrobianos, ferramentas de diagnóstico, vacinas e intervenções alternativas (WHO, 2015).

Desta forma, nas últimas décadas muitos estudos relataram que o uso de probióticos tais como *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp., indicaram melhora no desempenho, na microbiota intestinal modulando a resposta imune, digestibilidade, e redução de Salmoneloses (Zhang & Kim, 2014; Oliveira et al., 2014; Khobondo et al., 2015b). Além disso, os probióticos apresentam-se como alternativa ao uso de antimicrobianos e/ou melhoradores de desempenho visando à produção de alimentos mais saudáveis e isentos de resíduos, além da possibilidade de redução do surgimento de cepas bacterianas resistentes a antibióticos (Khobondo et al., 2015a).

A microbiota do trato alimentar pode influenciar o crescimento e o estado de saúde dos frangos de corte. Sua composição depende do consumo de alimentos que contenham agentes tróficos que induzam o desenvolvimento de microbiota benéfica (Madej et al., 2015).

Na moderna produção avícola por meio da incubação artificial, o contato do pinto com a galinha foi excluído. Assim, o primeiro contato com microrganismos pode incluir patógenos que colonizarão o trato digestório ainda imaturo. Logo, se for realizada colonização intestinal intencional ainda no período embrionário com microbiota benéfica, aumenta-se a possibilidade de colonização por exclusão competitiva, que pode melhorar o desempenho zootécnico e o desenvolvimento intestinal, bem como estimular o desenvolvimento e maturação do sistema imune e controle de patógenos (Pruszyńska-Oszmalek et al., 2015; Madej et al., 2015).

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de probiótico, administrado via *in ovo* ou spray, quanto à capacidade de redução de *Salmonella* Heidelberg (SH) no conteúdo cecal e em órgãos de frangos de corte desafiados experimentalmente.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

O estudo foi realizado com frangos de corte provenientes de incubatório comercial no Estado de São Paulo, utilizaram-se ovos oriundos de matrizes Cobb® com 35 a 45 semanas.

As aves foram transportadas a partir do incubatório e alojadas em gaiolas experimentais no Infectório do Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista - FMVZ/UNESP, Câmpus de Botucatu-SP.

Foram alojados 162 frangos de corte, machos de um dia de idade distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com 3 tratamentos, e 9 repetições de 6 aves cada (na proporção de 1 ave infectada para cada 5 aves livres de infecção). Sendo os tratamentos: Controle infecção: aves não tratadas com probiótico e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; *In ovo*: aves tratadas *in ovo* com probiótico no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; Spray: aves tratadas por spray com probiótico no 1º dia de vida e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida.

Probiótico

O probiótico utilizado foi um produto comercial que possui em sua composição 21 cepas com os seguintes níveis de garantia: uma cepa de *Bacillus subtilis* ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL), seis cepas de *Enterococcus faecium* ($6,0 \times 10^8$ UFC/mL), uma cepa de *Lactobacillus acidophilus* ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL), uma cepa de *Lactobacillus delbrueckii* ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL), três cepas de *Lactobacillus plantarum* ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL), cinco cepas de *Lactobacillus reuteri* ($5,0 \times 10^8$ UFC/mL), uma cepa de *Lactobacillus salivarius* ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL) e três cepas de *Pediococcus acidilactici* ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL).

Tratamento *in ovo*

No 18º dia de incubação, no momento da transferência da incubadora para o nascedouro, os embriões receberam *in ovo* no fluido amniótico por meio de injetora comercial, 0,05mL/ovo de solução contendo probiótico e vacina contra a doença de

Marek em diluente próprio, perfazendo a proporção de 1 frasco de 50mL do probiótico para cada 10.000 ovos de acordo com a recomendação do fabricante.

Tratamento por spray

Foi aplicado no primeiro dia de vida, ainda no incubatório, o probiótico por meio de pulverização de gota grossa (100 a 150µm) com auxílio de pulverizador comercial.

O preparo da solução de probiótico para aplicação por spray utilizou água livre de cloro. O frasco de probiótico de 50mL foi diluído em 2100mL de água para aspersão de 21mL por caixa de pinto de acordo com a recomendação do fabricante. A solução foi agitada antes da aplicação e a cada 30 minutos após o preparo. Os pintos permaneceram em caixas no local por 30 minutos após a aplicação.

Desafio com *Salmonella* Heidelberg

Um grupo de aves não tratadas foi desafiado no primeiro dia de vida com cultura de *Salmonella* Heidelberg, contendo $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, para isso foram administrados 0,5mL da cultura bacteriana via intraesofágica.

Foi utilizada uma cepa de *Salmonella* Heidelberg resistente a 100µg/mL de ácido nalidíxico (Nal) e 100µg/mL de rifampicina (Rif) (SHNal^rRif^r). A cepa foi cultivada em 10mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e incubada a 37°C por 18 horas em agitação (150rpm). A contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizada por meio de diluição decimal seriada em solução salina fosfatada tamponada (PBS) e o plaqueamento foi realizado em ágar verde brilhante (AVB) contendo ácido nalidíxico (100µg/mL) e rifampicina (100µg/mL) (AVB Nal/Rif).

No segundo dia de vida, as aves desafiadas foram anilhadas e alojadas junto às aves dos tratamentos Controle negativo, *In ovo* e Spray na proporção de 1 ave infectada para cada 5 aves livres de infecção, visando a contaminação por contato.

Objetivou-se assim, reproduzir umas das formas de contaminação da *Salmonella* Heidelberg nas criações comerciais, uma vez que quando a *Samonella* Heidelberg atinge uma ave, é facilmente disseminada por meio das fezes da ave contaminada, permanecendo no meio ambiente viável por período indeterminado, podendo contaminar todo o plantel.

Durante todo o período experimental de 23 dias, as aves receberam água e ração *ad libitum* sem acréscimo de antimicrobianos ou aditivos melhoradores de desempenho zootécnico.

A ração experimental (Tabela 1) foi produzida na Fábrica de Rações Experimentais da FMVZ/UNESP, seguindo as recomendações de composição e exigências nutricionais das Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos de Rostagno et al. (2011). O programa de luz seguiu as orientações do manual da linhagem Cobb®.

O experimento foi desenvolvido de acordo com os princípios éticos na experimentação animal (protocolo 0002/2017 – CEUA), determinados pela Comissão de Ética no Uso de Animais - FMVZ/UNESP, Câmpus Botucatu.

Tabela 1 – Composição centesimal e nutricional calculada da ração basal no período de 1 a 23 dias de idade.

Ingredientes	1 a 23 dias
Milho moído	58,62
Óleo de soja	2,60
Farelo de soja (45%)	34,20
Sal refinado	0,46
Calcário calcítico	1,70
Fosfato bicálcico	0,40
Cloreto de colina (60%)	0,06
DL - Metionina	0,30
L - Lisina HCl	0,27
L-Treonina	0,09
Suplemento vitamínico ¹	0,80
Suplemento mineral ²	0,50
TOTAL (kg)	100,00
Composição nutricional calculada	
Nutrientes	Valores
Proteína bruta (%)	20,84
Energia metabolizável aparente (kcal/kg)	3005
Sódio (Na) (%)	0,20
Cálcio (%)	0,85
Fósforo disponível (%)	0,40
Lisina digestível (%)	1,20
Metionina digestível (%)	0,47
Metionina+Cistina digestível (%)	0,87
Triptofano digestível (%)	0,20
Treonina digestível (%)	0,78

¹Suplemento vitamínico: PX VIT FC 0,8 kg/ton (DSM[®]) níveis de garantia por kg de ração: Vit. A, 7.200 UI; Vit. D3, 2.000 UI; Vit. E, 16 UI; Vit. K3, 2 mg; Vit. B1, 1,6 mg; Vit. B2, 4,8 mg; Ácido Pantotênico, 0,0096 g; Vit. B6, 2,4004 mg; Vit. B12, 12 µg; Ácido Nicotínico 0,0280 g; Ácido Fólico, 1,2000 mg; Biotina, 0,0800 mg; Selênio 0,2000 mg. ²Suplemento mineral: PX MINERAL FC 0,5 kg/ton (DSM[®]) níveis de garantia por kg de ração: Ferro 0,0500 g; Cobre 0,0100 mg; Manganês 0,0650 g; Zinco 0,0650 g; Iodo 1 mg.

Avaliação da ausência prévia de *Salmonella* spp. nas aves e na ração

No dia do alojamento das aves o mecônio presente no fundo das caixas de transporte foi coletado para pesquisa de *Salmonella* spp. Uma gaze de algodão estéril embebida em água peptonada tamponada a 0,1%, foi arrastada sobre o mecônio presente no interior da caixa de transporte das aves. A gaze foi incubada em 100mL de Caldo Selenito contendo Novobiocina (0,04g/L) (SN), o qual foi incubado por 24 horas a 37°C. Após a incubação, com auxílio de alça bacteriológica, alíquotas de SN foram estriadas em ágar verde brilhante (AVB) e ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD). As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e avaliadas quanto à presença de colônias sugestivas de *Salmonella* spp. (Brasil, 2003).

Toda a ração utilizada ao longo do experimento foi submetida à análise microbiológica com pesquisa de *Salmonella* spp. Amostras de 25g da ração foram adicionadas a 225mL de água peptonada tamponada 1%, homogeneizadas e incubadas a 41°C (± 2) por um período de 24 horas. Após esse período, cada amostra foi transferida para dois tubos de ensaio, um contendo 10mL de caldo Selenito-cistina e outro contendo 10mL de caldo Rappaport-Vassiliadis, ambos os meios adicionados de 0,1mL de novobiocina 4%, os quais foram incubados à 37°C e à 42°C, respectivamente, durante 24 horas.

Após este período realizou-se plaqueamento em dois diferentes meios de cultura: XLT-4 e MacConkey sendo incubados a 37°C por 24 horas. As colônias suspeitas foram submetidas a uma triagem através de testes bioquímicos. As colônias que apresentaram perfil bioquímico do gênero *Salmonella* spp. foram inoculadas na série bioquímica complementar. Nas amostras compatíveis, realizou-se a sorotipificação utilizando-se antisoros específicos (Brasil, 2003).

Avaliação da proteção das aves contra a infecção por *Salmonella* Heidelberg (SH)

Avaliação da infecção sistêmica

Aos 3, 5, 7, 14 e 21 dias pós-desafio, cinco aves mais uma ave anilhada de cada tratamento (Controle negativo, *In ovo* e Spray) foram eutanasiadas por deslocamento cervical para a contagem de *Salmonella* Heidelberg resistente a 100µg/mL de ácido nalidíxico (Nal) e 100µg/mL de rifampicina (Rif) (SHNal^rRif^r) em órgãos e no conteúdo cecal. As amostras de fígado, baço e conteúdo cecal foram

colhidas assepticamente nesta ordem, com auxílio de pinças e tesouras estéreis e individuais para cada órgão.

Amostras de órgãos

Os fragmentos de órgãos foram colocados em tubos previamente pesados. O tubo com a amostra foi novamente pesado, e o órgão diluído em solução salina (PBS pH 7,4) na proporção de 1:10 (m:v). Os órgãos foram macerados em graal com auxílio do pistilo. As amostras foram então diluídas decimalmente em solução salina (PBS) até a diluição de 10^{-3} sendo que a primeira diluição corresponde à amostra em solução salina (PBS). De cada diluição foi retirado 0,1mL o qual foi despejado sobre uma placa de ágar verde brilhante (AVB) contendo ácido nalidíxico (100µg/mL) e rifampicina (100µg/mL) (AVB Nal/Rif).

A leitura foi realizada após 24 horas de incubação a 37°C, obtendo-se a contagem expressa em número de unidades formadoras de colônia (UFC) por grama. Estes valores foram transformados em $\log_{10}$ para análise e interpretação dos resultados. Após as coletas e contagens, foram selecionadas de 3 a 5 colônias de cada amostra para a realização de teste bioquímico e sorologia com anti-soro somático polivalente O (Poli O).

Na ausência de crescimento de *Salmonella* Heidelberg resistente a 100µg/mL de ácido nalidíxico (Nal) e 100µg/mL de rifampicina (Rif) (SHNal^rRif^r), aos tubos contendo os órgãos em solução salina (PBS) foi acrescido Caldo Selenito preparado em concentração dupla acrescido de Novobiocina (0,08g/L) (SN). Acrescentando-se volume de Selenito igual ao volume de solução salina (PBS) anteriormente adicionada.

A seguir, os tubos foram incubados por 24 horas a 37°C, sem agitação e seu conteúdo foi semeado em ágar verde brilhante contendo ácido nalidíxico (100µg/mL) e rifampicina (100µg/mL) (AVB Nal/Rif), e incubado por 24 horas a 37°C (Brasil, 2003).

Amostras de conteúdo cecal

As amostras de conteúdo cecal foram colocadas em tubos previamente pesados. O tubo com a amostra foi novamente pesado, e o conteúdo cecal diluído em solução salina (PBS pH 7,4) na proporção de 1:10 (m:v) e homogeneizado com auxílio de vortex. As amostras foram diluídas decimalmente em solução salina (PBS) até a diluição de 10^{-6} sendo que a primeira diluição é o conteúdo cecal em solução salina (PBS). De cada diluição foi retirado 0,1mL e despejado em ágar verde brilhante

contendo ácido nalidíxico (100µg/mL) e rifampicina (100µg/mL) (AVB Nal/Rif). As placas foram incubadas, e a leitura foi feita após 24 horas de incubação a 37°C, obtendo-se a contagem expressa em número de unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g). Estes valores foram transformados em $\log_{10}$ para análise e interpretação dos resultados. Após as coletas e contagens, foram selecionadas de 3 a 5 colônias de cada amostra para a realização de teste bioquímico e sorologia com Poli O.

Na ausência de crescimento de *Salmonella* Heidelberg resistente a 100µg/mL de ácido nalidíxico (Nal) e 100µg/mL de rifampicina (Rif) (SHNal^rRif^r), aos tubos contendo a amostra em solução salina (PBS) foi acrescido Caldo Selenito preparado em concentração dupla acrescido de Novobiocina (0,08g/L) (SN). Acrescentando-se volume de Selenito igual ao volume de solução salina (PBS) anteriormente adicionada. Os tubos foram incubados por 24 horas a 37°C, sem agitação. O conteúdo foi semeado em ágar verde brilhante (AVB) contendo ácido nalidíxico (100µg/mL) e rifampicina (100µg/mL) (AVB Nal/Rif) e foi incubado por 24 horas a 37°C (Brasil, 2003).

Avaliação da excreção fecal de *Salmonella* Heidelberg

Foram realizados suabes de cloaca de cinco aves mais uma ave anilhada de cada tratamento (Controle negativo, *In ovo* e Spray) duas vezes por semana. Os suabes foram imersos em 2mL de caldo Selenito contendo Novobiocina (0,04g/L) (SN) preparado em concentração simples, homogeneizados em vortex e diretamente plaqueados em ágar verde brilhante (AVB) contendo ácido nalidíxico (100µg/mL) e rifampicina (100µg/mL) (AVB Nal/Rif).

Os tubos e as placas foram incubados por 24 horas a 37°C. Na ausência de crescimento nas placas, a amostra correspondente foi novamente semeada em placas contendo ágar verde brilhante (AVB) contendo ácido nalidíxico (100µg/mL) e rifampicina (100µg/mL) (AVB Nal/Rif), as quais foram incubadas por 24 horas a 37°C (Brasil, 2003).

Análise estatística

Os resultados da análise microbiológica foram submetidos a teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ranks ao nível de 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da proteção das aves contra a infecção por *Salmonella* Heidelberg (SH)

Todas as amostras de ração e fundo de caixas submetidas à análise microbiológica para o isolamento de *Salmonella* spp., ao longo do experimento foram negativas.

Para as análises microbiológicas realizadas aos 3, 5, 7, 14 e 21 dias pós-desafio com *Salmonella* Heidelberg os resultados foram transformados em logaritmo $\log_{10}$ UFC/g. Assim, no baço os resultados foram inferior a contagem mínima necessária (≤ 2) em todas as amostras, resposta esperada uma vez que as aves não tiveram contato direto com a *Salmonella* Heidelberg. No fígado apenas 1 ave do tratamento Controle Infecção aos 14 dias pós-desafio apresentou contagem igual a $2,26 \log_{10}$ UFC/g.

No conteúdo cecal, o tratamento Controle Infecção apresentou também apenas 1 ave aos 3 dias pós-desafio com valor de $2,18 \log_{10}$ UFC/g, 3 aves aos 5 dias pós-desafio, sendo o maior valor igual a $2,48 \log_{10}$ UFC/g, aos 7 dias pós-desafio 2 aves apresentaram valor acima da contagem mínima necessária, sendo o maior valor de $3,8 \log_{10}$ UFC/g e aos 14 dias pós-desafio apenas 1 ave apresentou contagem igual a $3,2 \log_{10}$ UFC/g.

No tratamento *In ovo*, aos 7 dias pós-desafio 3 aves apresentaram contagem superior a mínima necessária, sendo o maior valor igual a $3,04 \log_{10}$ UFC/g. Enquanto o tratamento Spray apresentou apenas 1 ave aos 5 dias pós-desafio com contagem igual a $2,00 \log_{10}$ UFC/g e aos 7 dias pós-desafio novamente 1 ave com contagem igual a $3,4 \log_{10}$ UFC/g.

Devido a esses resultados, para confirmação da presença de *Salmonella* Heidelberg nas amostras foi realizado análise qualitativa por meio de teste bioquímico e sorologia. Desta forma, foi possível determinar o número e a porcentagem de aves contaminadas com *Salmonella* Heidelberg nos diferentes dias pós-desafio (Tabela 2).

Para as aves que receberam desafio com *Salmonella* Heidelberg diretamente via intraesofágica, o número de unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) nos órgãos também foi inferior a contagem mínima necessária (≤ 2) em todas as aves. Sendo que pela análise qualitativa foram detectadas aves positivas no fígado no tratamento Controle Infecção 5 e 7 dias pós-desafio, no tratamento *In ovo* apenas aos 14 dias pós-desafio e no tratamento Spray aos 3, 5, e 7 dias pós-desafio.

Para o baço foram constatadas aves positivas aos 7 dias pós-desafio nos tratamentos com probiótico independente da via de aplicação e aos 14 dias pós-desafio para o tratamento *In ovo*.

Já no conteúdo cecal, todas as aves foram positivas nos diferentes períodos pós-desafio estudados assim, foi possível obter contagem igual a $4,15 \log_{10}\text{UFC/g}$ no tratamento Controle Infecção aos 7 dias pós-desafio, no tratamento *In ovo* também foram observados valores acima do limite mínimo aos 3 e 7 dia pós-desafio com valores iguais a $3,74 \log_{10}\text{UFC/g}$ e $2,48 \log_{10}\text{UFC/g}$ respectivamente. No tratamento Spray nos mesmos períodos do tratamento *In ovo* os valores encontrados foram de $4,38 \log_{10}\text{UFC/g}$ e $3,99 \log_{10}\text{UFC/g}$ respectivamente (Tabela 3).

Tabela 2 – Análise microbiológica quantitativa em órgãos, conteúdo cecal e suabe de cloaca de frangos de corte tratados com probiótico e contaminados com *Salmonella* Heidelberg.

Dia Pós-desafio	Controle Infecção		<i>In ovo</i>		Spray	
	Positiva/Total	%	Positiva/Total	%	Positiva/Total	%
Fígado						
3	2 de 5	40%	1 de 5	20%	2 de 5	40%
5	5 de 5	100%	3 de 5	60%	4 de 5	80%
7	2 de 5	40%	2 de 5	40%	0 de 5	0%
14	2 de 5	40%	1 de 5	20%	0 de 5	0%
21	0 de 5	0%	0 de 5	0%	0 de 5	0%
Baço						
3	0 de 5	0%	0 de 5	0%	0 de 5	0%
5	0 de 5	0%	1 de 5	20%	1 de 5	20%
7	3 de 5	60%	2 de 5	40%	5 de 5	100%
14	2 de 5	40%	0 de 5	0%	1 de 5	20%
21	0 de 5	0%	0 de 5	0%	0 de 5	0%
Conteúdo Cecal						
3	2 de 5	40%	2 de 5	40%	4 de 5	80%
5	5 de 5	100%	4 de 5	80%	2 de 5	40%
7	5 de 5	100%	5 de 5	100%	5 de 5	100%
14	5 de 5	100%	4 de 5	80%	5 de 5	100%
21	5 de 5	100%	4 de 5	80%	1 de 5	20%
Suabe de cloaca						
3	2 de 5	40%	3 de 5	60%	4 de 5	80%
6	5 de 5	100%	5 de 5	100%	5 de 5	100%
10	5 de 5	100%	3 de 5	60%	3 de 5	60%
13	5 de 5	100%	4 de 5	80%	1 de 5	20%
17	1 de 5	20%	0 de 5	0%	1 de 5	20%
20	1 de 5	20%	0 de 5	0%	0 de 5	0%

Tabela 3 – Análise microbiológica quantitativa ($\log_{10}$ UFC/g) e qualitativa para presença de *Salmonella* Heidelberg em aves que receberam desafio com a bactéria diretamente via intraesofágica.

Dias pós-desafio	Controle Infec.	<i>In ovo</i>	Spray	Controle Infec.	<i>In ovo</i>	Spray	Controle Infec.	<i>In ovo</i>	Spray
	Fígado			Baço			Conteúdo cecal		
3	-	-	+	-	-	-	+	3,74	4,38
5	+	-	+	-	-	-	+	+	+
7	+	-	+	-	+	+	4,15	2,48	3,99
14	-	+	-	-	+	-	+	+	+
21	-	-	-	-	-	-	+	+	+

(+) : aves positivas para *Salmonella* Heidelberg; (-) : aves negativas para *Salmonella* Heidelberg.

Para as análises microbiológicas qualitativas realizadas em órgãos (fígado e baço) de frangos de corte aos 3, 5, 7, 14 e 21 dias pós-desafio com *Salmonella* Heidelberg, não foi possível observar diferença entre os tratamentos (Figuras 1 e 2).

Embora não tenha apresentado diferença entre os tratamentos, foi possível verificar por meio da Figura 1 que desde os 3 dias pós-desafio as aves já apresentavam contaminação no fígado, sendo que as aves do tratamento *In ovo* mostravam 20% menos contaminação que as aves dos demais tratamentos.

Aos 5 dias pós-desafio foi o momento que ocorreu o pico de contaminação, desta forma as aves do tratamento *In ovo* passaram para 60% de contaminação, seguido do tratamento Spray com 80% das aves contaminadas e o tratamento Controle Infecção com 100% das aves contaminadas. Esses resultados divergem dos encontrados por Andreatti Filho et al. (2006) quando inocularam microbiota ou probiótico *in ovo* e não verificaram crescimento de *Salmonella* spp. no fígado das aves submetidas ao tratamento com *Lactobacillus salivarius* 5 dias pós-desafio.

Já aos 7 dias pós-desafio notou-se queda acentuada da contaminação. Aves do tratamento Spray foram as que melhor responderam apresentando-se sem contaminação e assim permaneceram até os 21 dias pós-desafio. Os tratamentos Controle Infecção e *In ovo* apresentaram 40% de aves contaminadas.

Nos 14 dias pós-desafio, o tratamento Controle Infecção permaneceu com 40% de contaminação e o tratamento *In ovo* reduziu a contaminação para 20% das aves.

No último momento estudado, aos 21 dias pós-desafio foi possível verificar que todas as aves haviam zerado a contaminação no fígado.

No baço conforme podemos observar na Figura 2 não houve diferença entre os tratamentos em nenhum dos momentos estudados. No entanto, é importante destacar

a presença de contaminação. Assim, aos 3 dias pós-desafio as aves de todos os tratamentos apresentavam-se sem contaminação.

Aos 5 dias pós-desafio, o tratamento Controle Infecção permaneceu sem contaminação enquanto que as aves tratadas com probiótico independente da via de aplicação apresentaram-se 20% contaminadas.

Aos 7 dias pós-desafio, foi quando ocorreu o pico de contaminação para o baço, nesse momento o tratamento Spray apresentou a maior contaminação com 100% das aves contaminadas, seguido do tratamento Controle Infecção com 60% das aves contaminadas e por último o tratamento *In ovo* com a menor contaminação de 40% das aves. Os resultados do tratamento com probiótico administrado via Spray são contrários aos encontrados por Silva et al. (2017), que avaliaram a evolução do probiótico e de produto de exclusão competitiva inoculado *in ovo* de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Heidelberg e observaram que as aves do grupo de exclusão competitiva tendiam a mostrar menor contaminação no *pool* de fígado e baço aos 7 dias de vida.

No período subsequente, aos 14 dias pós-desafio como aos 7 dias pós-desafio para o fígado houve queda acentuada da contaminação. Assim, o tratamento *In ovo* se apresentou sem contaminação, já o tratamento Spray reduziu de 100% para apenas 20% de aves contaminadas e o tratamento Controle Infecção apresentou-se com o dobro (40%) de contaminação em relação ao tratamento Spray. Esses resultados assemelham-se aos encontrados por Silva et al. (2017) que verificaram menor contaminação no *pool* de fígado e baço a partir dos 14 dias de vida em aves tratadas com probiótico. Por fim, aos 21 dias pós-desafio todos os tratamentos apresentaram-se sem contaminação.

Para os resultados do conteúdo cecal (Figura 3), embora não tenha havido diferença entre os tratamentos aos 3 dias pós-desafio experimental com *Salmonella* Heidelberg, as aves submetidas ao tratamento Spray foram as que apresentaram a maior porcentagem de contaminação com 80% das aves contaminadas, enquanto que o tratamento Controle Infecção e *In ovo* apresentavam-se 50% menos contaminados ou seja, 40% das aves estavam contaminadas.

No período subsequente (5 dias pós-desafio) houve redução de 50% da contaminação no tratamento Spray assim, apenas 40% das aves passaram a apresentar contaminação. Já os demais tratamentos apresentaram aumento da contaminação sendo que, o Controle Infecção passou para 100% e assim manteve-se nos demais períodos avaliados (7, 14 e 21 dias pós-desafio). O tratamento *In ovo* cresceu para 80% de contaminação.

Os tratamentos com probiótico também elevaram a contaminação a 100% aos 7 dias pós-desafio sendo que, a via de aplicação Spray permaneceu assim até os 14 dias pós-desafio ao passo que a via de aplicação *In ovo* voltou a 80% de contaminação.

Foi possível observar aos 21 dias pós-desafio, que as aves submetidas ao tratamento Spray, apresentaram a menor contaminação (20%) diferindo dos tratamentos Controle Infecção e *In ovo* que exibiram 100% e 80% de contaminação respectivamente.

Assim, podemos inferir que frente a esses resultados, o tratamento com probiótico administrado via Spray mostrou-se mais eficiente na redução da contaminação por *Salmonella* Heidelberg quando comparado aos outros tratamentos.

Embora o tratamento Controle Infecção e *In ovo* não tenham apresentado diferença, o tratamento *In ovo* mostrou-se 20% menos contaminado ressaltando o potencial do probiótico na redução da colonização de *Salmonella* Heidelberg.

Para a análise de suabe de cloaca (Figura 4) é possível notar que aos 3 dias pós-desafio todos os tratamentos já apresentavam contaminação, sendo o tratamento Controle Infecção com a menor contaminação (40%) seguido do tratamento *In ovo* e Spray com 60% e 80% de aves infectadas respectivamente.

Aos 6 dias pós-desafio ocorreu o pico de contaminação e todos os tratamentos apresentaram 100% de aves contaminadas. O tratamento Controle Infecção assim permaneceu até os 17 dias pós-desafio quando caiu a contaminação para 20% das aves e manteve-se até o último dia de análise que foi 20 dias pós-desafio.

Já as aves tratadas, independente da via de aplicação do probiótico reduziram a contaminação para 60% das aves aos 10 dias pós-desafio. Aos 13 dias pós-desafio foi possível constatar diferença entre os tratamentos, as aves do tratamento Spray apresentaram as menores contaminações (20%) quando comparadas com as aves do tratamento *In ovo* e Controle Infecção que estavam com 80% e 100% de contaminação respectivamente. Resultados esses que evidenciam mais uma vez a eficácia do tratamento com probiótico, além de apontar que a via de aplicação Spray foi mais eficaz.

No momento seguinte, 17 dias pós-desafio, o tratamento Spray manteve a contaminação em 20% enquanto que o tratamento *In ovo* não apresentou mais contaminação e assim permaneceram até os 20 dias pós-desafio quando as aves do tratamento Spray também se apresentaram sem contaminação.

Os resultados obtidos aos 20 dias pós-desafio, com as análises microbiológicas de suabe de cloaca de frangos de corte desafiados experimentalmente com *Salmonella* Heidelberg, mostram panorama positivo ao uso de probiótico, ao mesmo

tempo em que remete para cenário favorável para sanidade dos plantéis, redução de contaminação de carcaças bem como melhoria na qualidade da carne o que diminui riscos para a saúde pública.

Esses resultados assemelham-se aos encontrados por Matté et al. (2014), que avaliaram probiótico com 11 cepas de *Lactobacillus*, e observaram diminuição de 85% no número de *Salmonella* Heidelberg no conteúdo cecal das aves aos 14 dias de idade, e por Teague et al. (2017), que avaliaram a evolução da inoculação de probiótico comercial *in ovo* e verificaram redução significativa da contaminação por *Salmonella* Enteritidis aos 7 dias pós-desafio.

De acordo com os resultados obtidos no presente experimento, Knap et al. (2011) também notaram que o uso do probiótico *Bacillus subtilis* suplementado na ração em aves controle e aves desafiadas com *Salmonella* Heidelberg reduziu significativamente a contagem de *Salmonella* Heidelberg em suabes (58%) no alojamento, aos 7 e 42 dias de idade. Da mesma forma, estudo realizado para confirmar e determinar o efeito da administração do probiótico *Bacillus subtilis* na ração observaram redução na contagem de *Salmonella* spp. no intestino grosso, íleo, ceco e fezes (Jeong & Kim, 2014).

Estudos realizados por Menconi et al. (2011), constataram que probiótico a base de *Lactobacillus* spp. na água de bebida, reduziu significativamente a presença de *Salmonella* Heidelberg em tonsilas e conteúdo cecal em 24 e 72 horas após o desafio em frangos de corte, sendo que o presente estudo observou resultado semelhante aos 21 dias pós-desafio. Os resultados também são análogos aos de Oliveira et al. (2014), que avaliaram a inoculação de probióticos (*Enterococcus faecium* e *Bacillus subtilis*) *in ovo* embrionados e seus efeitos na susceptibilidade a *Salmonella* spp. pós eclosão, e encontraram redução significativa no número de *Salmonella* Enteritidis em aves inoculadas com *Enterococcus faecium* e que continuaram recebendo o mesmo probiótico na dieta. Assim os autores concluíram que a colonização por probiótico *in ovo* é um método promissor para administração individual e de dose precisa em grande escala na avicultura.

De forma contrária ao que se observou com as análises microbiológicas do presente estudo, Murate et al. (2015), estudaram a eficácia de produtos probióticos para controlar infecção em galinhas poedeiras e frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis, e concluíram que os probióticos não influenciaram a infecção por *Salmonella* Enteritidis em galinhas poedeiras e frangos de corte.

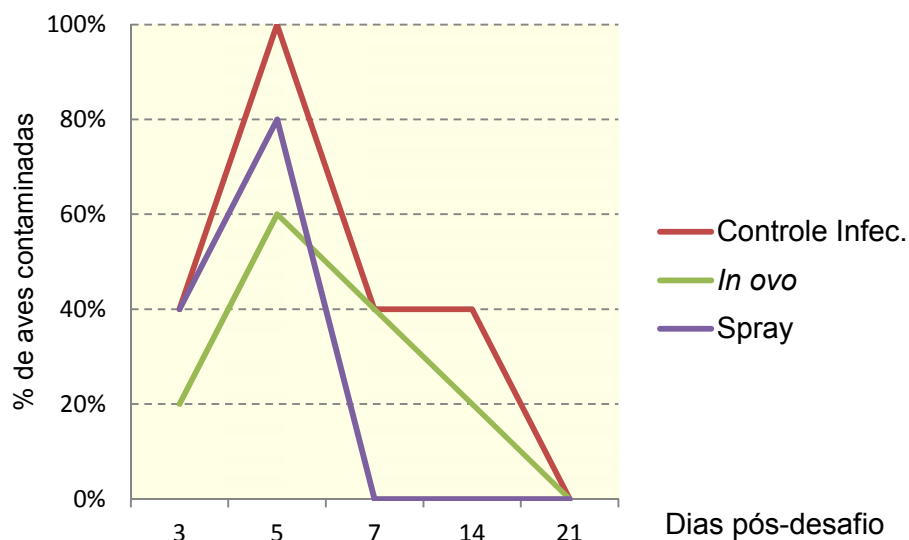


Figura 1 - Análise Microbiológica em fígado de frangos de corte tratados com probiótico e desafiados experimentalmente com *Salmonella* Heidelberg. Medianas seguidas de letras em um mesmo período diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

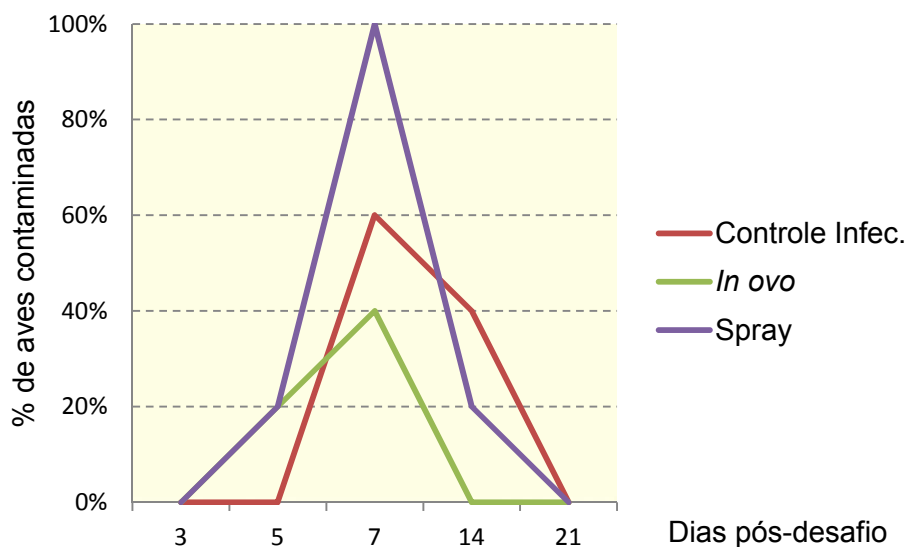


Figura 2 - Análise Microbiológica em baço de frangos de corte tratados com probiótico e desafiados experimentalmente com *Salmonella* Heidelberg. Medianas seguidas de letras em um mesmo período diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

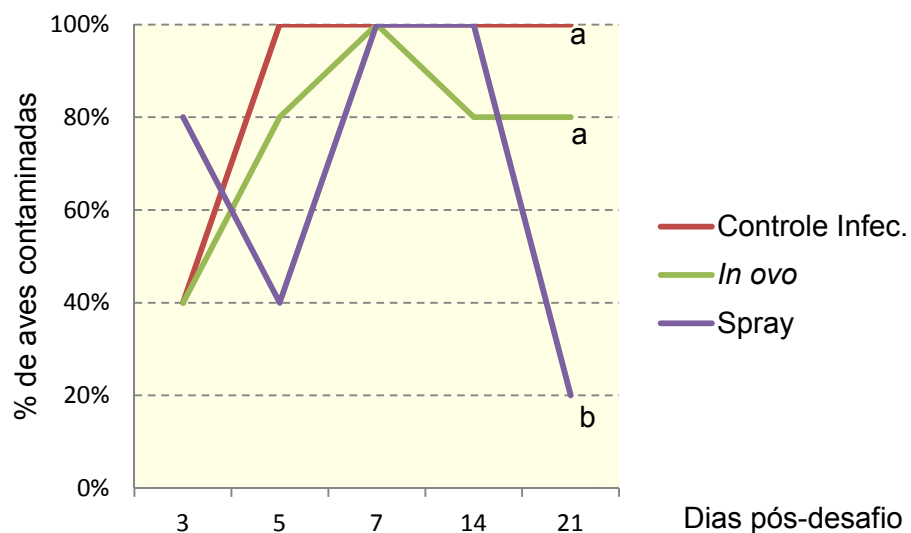


Figura 3 - Análise Microbiológica do conteúdo cecal de frangos de corte tratados com probiótico e desafiados experimentalmente com *Salmonella* Heidelberg. Medianas seguidas de letras em um mesmo período diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

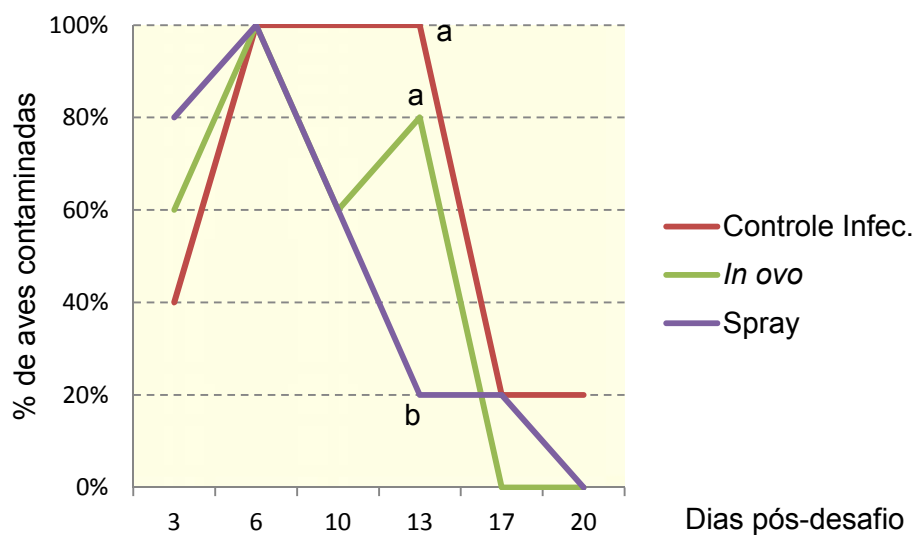


Figura 4 - Análise Microbiológica do suabe de cloaca de frangos de corte tratados com probiótico e desafiados experimentalmente com *Salmonella* Heidelberg. Medianas seguidas de letras em um mesmo período diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

CONCLUSÃO

O probiótico destaca-se como importante alternativa ao uso de antibióticos para controle de *Salmonella* Heidelberg em frangos e corte, pois houve redução da contaminação no conteúdo cecal e em suabe de cloaca, sendo que a administração via Spray mostrou-se mais efetiva. Assim o probiótico pode ser considerado agente trófico eficaz e que atende as novas tendências de mercado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, H.K. Antibiotic Resistance Gene Discovery in Food-Producing Animals. **Current Opinion in Microbiology**, v.19, p. 25-29, 2014.
- Andreatti Filho, R.L.; Okamoto, A.S.; Lima, E.T.; Gratão, P.R.; Delbem, S.R. Effect of cecal microflora and *Lactobacillus salivarius in ovo* administration used on chicken previously challenged with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Arquivos Brasileiros Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.4, p.467-471, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 62 -Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União. Brasília, 26 de agosto de 2003.
- Cury, H.A. Avaliação de aditivos na água de bebida para controle de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Heidelberg em frangos de corte. 2013. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.
- Ferreira, L.L. et al. Salmonelose em sanidade avícola e saúde pública. **Revista Eletrônica Nutridime**, v.10, p. 2716 – 2751, 2013.
- Jeong, J.S.; Kim, I.H. Effect of *Bacillus subtilis* C-3102 spores as a probiotic feed supplement on growth performance, noxious gas emission and intestinal microflora in broilers. **Poultry Science**, v.93, p.3097–3103, 2014.

- Khobondo, J.O.; Muasya, T.K.; Miyumo, S.; Okeno, T.O.; Wasike, C.B.; Mwakubambanya, R.; Kingori, A.M.; Kahi, A.K. Genetic and nutrition development of indigenous chicken in Africa. **Livestock Research for Rural Development**. v.27, 2015a.
- Khobondo, J.O.; Ogore, P.B.; Atela, J.A.; Onjoro, P.S.; Ondiek, J.O.; Kahi, A.K. The effects of dietary probiotics on natural IgM antibody titres of Kenyan indigenous chicken. **Livestock Research for Rural Development**, v.27, 2015b.
- Knap, I. et al. *Bacillus subtilis* (DSM17299) significantly reduces *Salmonella* in broilers. **Poultry Science**, v.90, p.1690–1694, 2011.
- Lekshimi, M. et al. The food production environment and the development of antimicrobial resistance In human pathogens of animal origin. **Microorganisms**, v.5, p.1-1, 2017.
- Lima, L. Ambiência e as leis da termodinâmica. In: 19º Simpósio Brasil Sul de Avicultura e 10º Brasil Sul Poultry Fair. 2018, Chapecó. **Anais...** Chapecó: Núcleo Oeste de Médicos Veterinários e Zootecnistas, p.18-20, 2018.
- Madej, J. P.; Stefaniak, T.; Bednarczyk, M. Effect of *in ovo*-delivered prebiotics and synbiotics on lymphoid-organs' morphology in chickens. **Poultry Science**, v.94, p.1209–1219, 2015.
- Matté, F.; Dalmagro, M.; Gazoni, F. L.; Piltz, S. Eficácia de um probiótico composto por 11 cepas de *Lactobacillus* no controle da *Salmonella* Heidelberg em frangos de corte. **Anais Conferência Apinco FACTA**. Atibaia, SP. 2014.
- Mead, G. et al. The *Salmonella* on Raw Poultry Writing Committee. Scientific and Technical Factors Affeting the setting of *Salmonella* Criteria for Raw Poultry: A Global Perspective. **Journal of Food Protection**, v.73, p.1566-1590, 2010.
- Menconi, A.; et al. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture for the treatment of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in neonatal broiler chickens and turkey poult. **Poultry Science**, n. 90, p. 561-565, 2011.

Murate, L.S.; Paião, F.G.; Almeida, A.M., Berchieri Jr, A.; Shimokomaki, M. Efficacy of prebiotics, probiotics, and synbiotics on laying hens and broilers challenged with *Salmonella* Enteritidis. **Journal Poultry Science**, v.52, p.52-56, 2015.

OIE (2013) The One health concept: the OIE approach. Disponível em: www.oie.int.

Oliveira, J. E.; Hoeven-Hangoor, E.; Linde, I. B.; Montijn, R. C.; Vossen, J. M. B. M. In ovo inoculation of chicken embryos with probiotic bacteria and its effect on posthatch *Salmonella* susceptibility. **Poultry Science**, v. 93, p. 818–829, 2014.

Pruszyńska-Oszmalek, E.; Kolodziejewski, P. A.; Stadnicka, K.; Sassek, M.; Chalupka, D.; Kuston, B.; Nogowski, L.; Mackowiak, P.; Maiorano, G.; Jankowski, J.; Bednarczyk, M. In ovo injection of prebiotics and synbiotics affects the digestive potency of the pancreas in growing chickens. **Poultry Science**, v.94, p.1909–1916, 2015.

Rodrigues, D. P. Salmoneloses aviárias e saúde pública. In: 19º Simpósio Brasil Sul de Avicultura e 10º Brasil Sul Poultry Fair. 2018, Chapecó. **Anais...** Chapecó: Núcleo Oeste de Médicos Veterinários e Zootecnistas, p.98-104, 2018.

Rostagno, H.S.; Albino, L.F.T.; Donzele, J.L.; Gomes, P.C.; Oliveira, R.F.; Lopes, D.C.; Ferreira, A.S.; Barreto, S.L.T.; Euclides, R.F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3. ed. Viçosa-MG: UFV, 252p, 2011.

Silva, I. et al . Evaluation of a Probiotic and a Competitive Exclusion Product Inoculated In Ovo on Broiler Chickens Challenged with *Salmonella* Heidelberg. **Brazilian Journal of Poultry Science**. Campinas, v. 19, p. 19-26, 2017.

Teague, K. D.; Graham, L. E.; Dunn, J. R.; Cheng, H. H.; Anthony, N.; Latorre, J. D.; Menconi, A.; Wolfenden, R. E.; Wolfenden, A. D.; Mahaffey, B. D.; Baxter, M.; Hernandez-Velasco, X.; Merino-Guzman, R.; Bielke, L. R.; Hargis, B. M.; Tellez, G. In ovo evaluation of FloraMax®-B11 on Marek's disease HVT vaccine protective efficacy, hatchability, microbiota composition, morphometric analysis, and *Salmonella* enteritidis infection in broiler chickens. **Poultry Science**, v.96, p.2074–2082, 2017.

WHO (2015). Global Plan on Antimicrobial Resistance. Disponível em: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en>.

Zhang, Z.F.; Kim I.H. Effects of multistrain probiotics on growth performance, apparent ileal nutrient digestibility, blood characteristics, cecal microbial shedding, and excreta odor contents in broilers. **Poultry Science**, v. 93, p. 364–370, 2014.

CAPÍTULO 3

INTEGRIDADE ENTÉRICA DE FRANGOS DE CORTE TRATADOS COM PROBIÓTICO POR DIFERENTES VIAS E DESAFIADOS COM *Salmonella* Heidelberg

RESUMO – O experimento foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de probiótico administrado *in ovo* ou spray sobre a histomorfometria, contagem de células caliciformes e avaliação ultraestrutural da mucosa entérica de frangos de corte desafiados experimentalmente com *Salmonella* Heidelberg (SH). Foram utilizados 297 frangos de corte de um dia de idade, machos da linhagem Cobb®, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (2x2)+2, com 9 repetições de 5 aves nos tratamentos sem desafio e 6 aves nos tratamentos com desafio com SH. Sendo os tratamentos: T1: aves tratadas *in ovo* com probiótico no 18º dia de incubação; T2: aves tratadas por spray com probiótico no 1º dia de vida; T3: aves tratadas *in ovo* com probiótico no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com SH no 2º dia de vida; T4: aves tratadas por spray com probiótico no 1º dia de vida e desafiadas por contato com SH no 2º dia de vida; T5 (controle infecção): aves não tratadas com probiótico e desafiadas por contato com SH no 2º dia de vida; T6 (controle negativo): aves não tratadas com probiótico e não desafiadas com SH. Um grupo de aves não tratadas foi desafiado no 1º dia de vida com cultura de SH, contendo $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, as aves receberam 0,5mL da cultura bacteriana via intraesofágica. No 2º dia de vida, as aves infectadas foram anilhadas e alojadas junto às aves dos tratamentos T3, T4 e T5, na proporção de 1 ave infectada para cada 5 aves livres de infecção. Nos 5, 9, 16 e 23 dias de vida das aves, 5 aves de todos os tratamentos mais 1 ave anilhada dos tratamentos T3, T4 e T5 foram eutanasiadas para análise histomorfométrica, contagem de células caliciformes e avaliação ultraestrutural, sendo que para a última análise foram utilizadas 3 aves por tratamento. Os dados de histomorfometria e contagem de número de células caliciformes foram submetidos à análise de variância ao nível de 5% de significância. Para os parâmetros histomorfométrico e contagem de número de células caliciformes, o probiótico apresentou ligeira melhora nas medidas em todas as idades e segmentos estudados. A integridade da mucosa ileal mostrou-se mais preservada, e a colonização com agente trófico foi mais intensa na mucosa cecal das aves do T2 e T4. O probiótico utilizado no presente estudo melhora a integridade da mucosa entérica de frangos de corte nas diferentes idades estudadas, e quando submetido a desafio com SH, mostra maior eficácia em estabelecer microbiota protetora capaz de preservar a ultraestrutura intestinal, sendo que a via de aplicação spray apresenta maior potencial de atuação.

PALAVRA-CHAVE: agente trófico, saúde intestinal, microbiota, ultraestrutura

ENTERIC INTEGRITY OF BROILERS TREATED WITH PROBIOTIC BY DIFFERENT ROUTES AND CHALLENGED WITH *Salmonella* Heidelberg

ABSTRACT - A trial was conducted to evaluate the effect of probiotic administered *in ovo* or spray on, histomorphometry, goblet cell count and ultrastructural evaluation of the enteric mucosa of broilers challenged experimentally with *Salmonella* Heidelberg (SH). Were used 297 one-day-old, males, Cobb® chicks distributed in a completely randomized design in a factorial (2x2) +2, with 9 replicates of 5 birds in the treatments without challenge and 6 birds in the treatments with challenge with SH. The treatments were: T1: birds treated *in ovo* with probiotic on the 18th day of incubation; T2: birds treated with probiotic spray on the 1st day of life; T3: birds treated *in ovo* with probiotic on the 18th day of incubation and challenged by contact with SH on the 2nd day of life; T4: birds treated by spray with the probiotic in the 1st day of life and challenged by contact with SH on the 2nd day of life; T5 (control infection): birds not treated with probiotic and challenged by contact with SH on the 2nd day of life; T6 (negative control): birds not treated with probiotic and not challenged with SH. A group of untreated birds was challenged on the 1st day of life with SH culture containing 1.0×10^8 CFU/mL, the birds received 0.5mL of the bacterial culture via intraesophageal. On the 2nd day of life, the infected birds were ringed and housed with birds from T3, T4 and T5 treatments, in the ratio of 1 infected bird to 5 infected birds. At 5, 9, 16 and 23 days of life of the birds, 5 birds of all treatments plus 1 ringed bird of T3, T4 and T5 treatments were euthanized for histomorphometric analysis, goblet cell counts. For ultrastructural evaluation were used three birds per treatment. The data of histomorphometric and goblet cell count were submitted to analysis of variance at the 5% level of significance. For the histomorphometry and number of goblet cell counts, the probiotic was able to show a tendency to improve measurements at all ages and segments studied. The integrity of the ileal mucosa was slightly more preserved, and the colonization with trophic agent was more intense in the cecal mucosa of the T2 and T4 birds. The probiotic used in the present study improves the integrity of the enteric mucosa of broiler at the different ages studied, and when challenged with SH, shows greater efficacy in establishing a protective microbiota capable of preserving the intestinal ultrastructure, being that spray application route presents has greater potential for action.

KEYWORDS: intestinal health, microbiota, trophic agent, ultrastructure

INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca como o maior exportador de carne de frango, com 4.320 milhões de toneladas e o segundo maior produtor avícola do mundo, não ultrapassando, apenas, os Estados Unidos. A produção brasileira de carne de frango subiu de 9,34 milhões de toneladas em 2006 para 13,05 milhões de toneladas em 2017. De toda carne de frango produzida, 33,1% direcionou-se ao mercado externo e 66,9% abasteceu o mercado interno (ABPA, 2018).

O crescimento dessa atividade é fruto de modernização da criação avícola e melhorias tecnológicas em toda cadeia produtiva, dada à pressão na demanda mundial de alimentos (Decker & Gomes, 2016).

Mesmo com tantos avanços, os produtos avícolas destinados ao consumo humano são passíveis de contaminação bacteriana, especialmente por microorganismos do gênero *Salmonella* spp., que podem se alojar no trato gastrointestinal das aves (Oliveira et al., 2014).

Dentre os sorovares patogênicos não-tifoidais, os de maior relevância são *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium e também *Salmonella* Heidelberg, devido ao aumento de surtos relacionados a esse sorovar na América do Norte nos últimos anos (EFSA & ECDC, 2014).

A adição de antibióticos na dieta de aves pode ser útil para redução de incidência de patógenos como *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp. ou em doses sub terapêuticas como melhoradores de desempenho. No entanto, atualmente o setor avícola preocupa-se com os riscos que envolvem a multiplicação e o desenvolvimento de resistência de patógenos aos antimicrobianos (Hume, 2011; Al-Sagan & Abudabos, 2017).

Devido ao fato da maioria dos antimicrobianos utilizados na avicultura, serem os mesmo utilizados para tratar doenças humanas, a União Europeia proibiu desde 2006 o uso de antibióticos na produção avícola. A justificativa foi por apresentar riscos para a saúde pública (Laxminarayan et al., 2015).

Frente a esse cenário a Organização Mundial para Saúde Animal (OIE), desenvolveu um plano de ação global, com o objetivo de coletar as informações concernentes ao uso e circulação de antimicrobianos. Vislumbrou-se a criação de um banco de dados para monitoramento do uso de antimicrobianos em animais. Nesse contexto, surgiu o termo “uso responsável e prudente de antimicrobianos”, que abrange: (i) proteger a eficácia dos antimicrobianos já existentes; (ii) racionalizar e supervisionar o uso de antimicrobianos; monitorar o uso de antimicrobianos em animais e (iii) desenvolver alternativas para o uso de antimicrobianos (OIE, 2017).

Desta forma, a utilização de novos aditivos alternativos na alimentação das aves a fim de maximizar a saúde do trato gastrointestinal ganhou nova visão. Sendo que o desenvolvimento e produção de produtos em substituição aos antimicrobianos mostraram-se via alternativa à capacidade de manter a qualidade produtiva das aves e integridade da mucosa entérica, além da relação com a composição da microbiota intestinal e da atuação no sistema imune (Oakley et al., 2014; Clavijo & Flórez, 2018).

Dentre os aditivos, os probióticos destacam-se por serem considerados microorganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidade adequada (Fuller, 1989). Estes podem ser definidos como suplementos alimentares não patogênicos que resistem ao ácido gástrico e bile, aderem ao epitélio e muco intestinal, persistem no trato gastrointestinal, produzem componentes inibitórios frente a agentes infecciosos ou substâncias tóxicas e alteram a microbiota local, estimulando o sistema imune associado ao intestino (Shneitz et al. 2016).

O mecanismo de ação do probiótico é por exclusão competitiva, e pode ser afetado por alguns fatores como métodos de preparação, vias de administração e ambiente no qual as aves são criadas (Ajuwon, 2015; Adhikari & Kim, 2017). As bactérias probióticas ocupam o sítio de ligação na mucosa intestinal, formando uma barreira física aos microorganismos patogênicos, os quais são excluídos por competição pelo sítio de ligação (Macari et al., 2014).

Desta forma, os probióticos são usados para ajudar a manter o equilíbrio microbiano saudável dentro do trato gastrointestinal com a finalidade de promover maior integridade intestinal e prevenir doença entérica (Cox & Dalloul, 2015).

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de probiótico administrado *in ovo* ou spray, quanto à ação na integridade entérica de frangos de corte desafiados ou não experimentalmente com *Salmonella* Heidelberg.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

O estudo foi realizado com frangos de corte provenientes de incubatório comercial no Estado de São Paulo, utilizaram-se ovos oriundos de matrizes Cobb® com 35 a 45 semanas.

As aves foram transportadas a partir do incubatório e alojadas em gaiolas experimentais no Infectório do Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista - FMVZ/UNESP, Câmpus de Botucatu-SP.

Foram alojados 297 frangos de corte, machos de um dia de idade distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (2x2)+2, sendo o primeiro fator as formas de administração de probiótico *in ovo* ou spray, o segundo fator aves desafiadas ou não com *Salmonella* Heidelberg e mais dois adicionais - o controle infecção (aves não tratadas com probiótico e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida) e o controle negativo (aves não tratadas com probiótico e não desafiadas com *Salmonella* Heidelberg). Foram utilizadas 9 repetições de 5 aves nos tratamentos sem desafio (T1, T2 e T6) e 6 aves (na proporção de 1 ave infectada para cada 5 aves livres de infecção) nos tratamentos com desafio com *Salmonella* Heidelberg (T3, T4 e T5).

Tratamentos:

T1: Aves tratadas *in ovo* com probiótico no 18º dia de incubação;

T2: Aves tratadas por spray com probiótico no 1º dia de vida;

T3: Aves tratadas *in ovo* com probiótico no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida;

T4: Aves tratadas por spray com probiótico no 1º dia de vida e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida;

T5 (Controle infecção): Aves não tratadas com probiótico e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida;

T6 (Controle negativo): Aves não tratadas com probiótico e não desafiadas com *Salmonella* Heidelberg.

Probiótico

O probiótico utilizado foi um produto comercial que possui em sua composição 21 cepas com os seguintes níveis de garantia: uma cepa de *Bacillus subtilis* ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL), seis cepas de *Enterococcus faecium* ($6,0 \times 10^8$ UFC/mL), uma cepa de *Lactobacillus acidophilus* ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL), uma cepa de *Lactobacillus delbrueckii* ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL), três cepas de *Lactobacillus plantarum* ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL), cinco cepas de *Lactobacillus reuteri* ($5,0 \times 10^8$ UFC/mL), uma cepa de *Lactobacillus salivarius* ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL) e três cepas de *Pediococcus acidilactici* ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL).

Tratamento *in ovo*

No 18º dia de incubação, no momento da transferência da incubadora para o nascedouro, os embriões receberam *in ovo* no fluido amniótico por meio de injetora comercial, 0,05mL/ovo de solução contendo probiótico e vacina contra a doença de Marek em diluente próprio, perfazendo a proporção de 1 frasco de 50mL do probiótico para cada 10.000 ovos de acordo com a recomendação do fabricante.

Tratamento por spray

Foi aplicado no primeiro dia de vida, ainda no incubatório, o probiótico por meio de pulverização por spray de gota grossa (100 a 150µm).

O preparo da solução de probiótico para aplicação por spray utilizou água livre de cloro. O frasco de probiótico de 50mL foi diluído em 2100mL de água para aspersão de 21mL por caixa de pinto de acordo com a recomendação do fabricante. A solução foi agitada antes da aplicação e a cada 30 minutos após o preparo. Os pintos permaneceram em caixas no local por 30 minutos após a aplicação.

Desafio com *Salmonella* Heidelberg

Um grupo de aves não tratadas foi desafiado no primeiro dia de vida com cultura de *Salmonella* Heidelberg, contendo $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, para isso foram administrados 0,5mL da cultura bacteriana via intraesofágica.

Foi utilizada uma cepa de *Salmonella* Heidelberg resistente a 100µg/mL de ácido nalidíxico (Nal) e 100µg/mL de rifampicina (Rif) (SHNal^rRif^r). A cepa foi cultivada em 10mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e incubada a 37°C por 18 horas

em agitação (150rpm). A contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizada por meio de diluição decimal seriada em solução salina fosfatada tamponada (PBS) e o plaqueamento foi realizado em ágar verde brilhante (AVB) contendo ácido nalidíxico (100µg/mL) e rifampicina (100µg/mL) (AVB Nal/Rif).

No segundo dia de vida, as aves desafiadas foram anilhadas e alojadas junto às aves dos grupos T3, T4 e T5, na proporção de 1 ave infectada para cada 5 aves livres de infecção, visando a contaminação por contato.

Objetivou-se assim, reproduzir umas das formas de contaminação da *Salmonella* Heidelberg nas criações comerciais, uma vez que quando a *Samonella* Heidelberg atinge uma ave, é facilmente disseminada por meio das fezes da ave contaminada, permanecendo no meio ambiente viável por período indeterminado, podendo contaminar todo o plantel.

Durante todo o período experimental de 23 dias, as aves receberam água e ração *ad libitum* sem acréscimo de antimicrobianos ou aditivos melhoradores de desempenho zootécnico.

A ração experimental (Tabela 1) foi produzida na Fábrica de Rações Experimentais da FMVZ/UNESP, seguindo as recomendações de composição e exigências nutricionais das Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos de Rostagno et al. (2011). O programa de luz seguiu as orientações do manual da linhagem Cobb®.

O experimento foi desenvolvido de acordo com os princípios éticos na experimentação animal (protocolo 0002/2017 – CEUA), determinados pela Comissão de Ética no Uso de Animais - FMVZ/UNESP, Câmpus Botucatu.

Tabela 1 – Composição centesimal e nutricional calculada da ração basal no período de 1 a 23 dias de idade.

Ingredientes	1 a 23 dias
Milho moído	58,62
Óleo de soja	2,60
Farelo de soja (45%)	34,20
Sal refinado	0,46
Calcário calcítico	1,70
Fosfato bicálcico	0,40
Cloreto de colina (60%)	0,06
DL - Metionina	0,30
L - Lisina HCl	0,27
L-Treonina	0,09
Suplemento vitamínico ¹	0,80
Suplemento mineral ²	0,50
TOTAL (kg)	100,00
Composição nutricional calculada	
Nutrientes	Valores
Proteína bruta (%)	20,84
Energia metabolizável aparente (kcal/kg)	3005
Sódio (Na) (%)	0,20
Cálcio (%)	0,85
Fósforo disponível (%)	0,40
Lisina digestível (%)	1,20
Metionina digestível (%)	0,47
Metionina+Cistina digestível (%)	0,87
Triptofano digestível (%)	0,20
Treonina digestível (%)	0,78

¹Suplemento vitamínico: PX VIT FC 0,8 kg/ton (DSM[®]) níveis de garantia por kg de ração: Vit. A, 7.200 UI; Vit. D3, 2.000 UI; Vit. E, 16 UI; Vit. K3, 2 mg; Vit. B1, 1,6 mg; Vit. B2, 4,8 mg; Ácido Pantotênico, 0,0096 g; Vit. B6, 2,4004 mg; Vit. B12, 12 µg; Ácido Nicotínico 0,0280 g; Ácido Fólico, 1,2000 mg; Biotina, 0,0800 mg; Selênio 0,2000 mg. ²Suplemento mineral: PX MINERAL FC 0,5 kg/ton (DSM[®]) níveis de garantia por kg de ração: Ferro 0,0500 g; Cobre 0,0100 mg; Manganês 0,0650 g; Zinco 0,0650 g; Iodo 1 mg.

Histomorfometria entérica e contagem do número de células caliciformes na mucosa intestinal

Para as análises histomorfométricas e contagem do número de células caliciformes da mucosa intestinal aos 5, 9, 16 e 23 dias de vida, 5 aves de todos os tratamentos mais uma ave anilhada dos tratamentos T3, T4 e T5 foram eutanasiadas por deslocamento cervical. Em seguida foram coletados segmentos de aproximadamente 2 cm do intestino delgado (duodeno: alça duodenal; jejuno: 2 cm anterior ao divertículo de Meckel; íleo: 2 cm posterior ao divertículo de Meckel) os quais foram abertos pela borda mesentérica e lavados com água destilada, posteriormente fixados em placas de polipropileno e mergulhados em solução de formalina tamponada a 10% por 24 horas. Após esse período, o material foi reduzido a fim de eliminar as bordas dilaceradas e lavados em água corrente por 48 horas, com a finalidade de retirar o fixador utilizado.

Após fixação e secção, todo material foi desidratado por imersão em uma série crescente de álcoois (entre 70% e absoluto), diafanizado em três trocas de xilol e incluído em parafina. Para a inclusão os segmentos foram orientados para obtenção de cortes histológicos longitudinais, em relação ao maior eixo do intestino.

A microtomia foi realizada com auxílio de micrótomo automático (Leica, RM-2145) equipado com navalhas descartáveis, obtendo-se uma série de cortes com 4-5 µm de espessura. Os cortes foram colocados em álcool 30%, em seguida, imersos em água destilada a 37°C. Posteriormente, distendidos sobre lâminas histológicas e levados para estufa, onde permaneceram por 60 minutos a 60°C. Após os procedimentos acima citados os cortes sofreram a desparafinização, por meio de duas passagens pelo xilol. Finalmente, foram hidratados em álcoois de concentrações decrescentes e submetidos aos métodos de colorações histológicas (Caputo et al., 2010).

Os cortes histológicos foram corados com Tricrômico de Masson, de acordo com a metodologia preconizada por Behmer et al. (2003).

A morfometria da mucosa foi obtida por intermédio das análises dos cortes histológicos, foram realizadas medidas de altura de vilosidade, profundidade de cripta e largura de vilo com auxílio do microscópio óptico acoplado a um sistema computadorizado de captura de imagem (Leica DM 750). Foram realizadas 10 medidas/ave/tratamento/coleta, totalizando 3960 medidas.

A contagem do número de células caliciformes foi realizada em 10 vilos/ave/tratamento/coleta nos diferentes segmentos do intestino delgado, totalizando

3960 contagens. Após a captura da imagem por meio de fotomicroscópio a contagem do número de células foi realizada com o auxílio de um aplicativo.

Avaliação ultraestrutural da integridade entérica

Nos 5, 9, 16 e 23 dias de vida, das aves já eutanasiadas para as coletas histomorfométricas foram utilizadas 3 aves de todos os tratamentos mais uma ave anilhada dos tratamentos T3, T4 e T5 para a avaliação ultraestrutural da integridade entérica dos segmentos de íleo e ceco, os quais foram processadas no Laboratório do Centro de Microscopia Eletrônica do IBB/UNESP – Câmpus de Botucatu.

As amostras foram abertas longitudinalmente, esticadas e brevemente lavadas com tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3) para remover o conteúdo intestinal. Os segmentos foram fixados por 24 horas a 4°C em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3). Após a fixação, as amostras foram lavadas em água destilada e fixadas por 30 minutos em tetróxido de ósmio 0,5% em água deionizada. O material foi desidratado em uma série crescente de álcool (7,5 % a 100%). Em seguida, submetido à secagem com dióxido de carbono líquido em um aparelho de ponto crítico de secagem Balzers CPD-020, montados em “stubs” de cobre, e metalizados com 10 nm de ouro usando um Metalizador SCD-050 da Bal-Tec (Silveira, 1998). Após o processamento as amostras foram examinadas e fotografadas usando um microscópio eletrônico de varredura Quanta 200 da FEI, sob tensão de 10 a 15 KV. As imagens foram analisadas quanto à integridade da mucosa dos segmentos intestinais.

Análise Estatística

Os dados de histomorfometria e contagem de número de células caliciformes foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 2009). As diferenças entre as médias foram submetidas ao teste *Tukey*, utilizando o procedimento GLM (*General Linear Models*) ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Histomorfometria entérica e contagem do número de células caliciformes na mucosa intestinal

Os valores médios da histomorfometria da mucosa entérica dos diferentes segmentos do intestino delgado de frangos de corte submetidos a diferentes vias de aplicação de probiótico aos 5, 9, 16 e 23 dias de idade desafiados ou não com *Salmonella* Heidelberg encontram-se nas Tabelas 2 a 5.

Aos 5 dias de idade foi possível observar para o primeiro segmento do intestino delgado, o duodeno, para o parâmetro altura de vilos no grupo de aves desafiadas com *Salmonella* Heidelberg e tratadas com probiótico, que as aves que receberam tratamento com probiótico via spray apresentaram maior altura de vilos.

Esse resultado corrobora com a pesquisa realizada por Vineetha et al. (2017), para avaliar a eficácia de *Lactobacillus plantarum* sobre a histomorfometria intestinal de duodeno verificou que aves tratadas com probiótico obtiveram as maiores alturas de vilos.

Além disso, as aves tratadas com probiótico *in ovo* e não desafiadas com *Salmonella* Heidelberg apresentaram maior altura de vilos quando comparadas com as aves que receberam o probiótico pela mesma via e foram desafiadas com *Salmonella* Heidelberg (Tabela 2).

Por outro lado, as aves que não foram tratadas com probiótico e nem desafiadas com *Salmonella* Heidelberg (controle negativo) apresentaram menor altura de vilos, quando comparado com as aves que receberam probiótico *in ovo* sem desafio com *Salmonella* Heidelberg e probiótico spray com desafio com *Salmonella* Heidelberg (Tabela 2).

As maiores profundidades de cripta foram observadas, nas aves desafiadas com *Salmonella* Heidelberg e que receberam probiótico *in ovo* quando comparadas com as aves também desafiadas com *Salmonella* Heidelberg e tratadas com probiótico via spray. Além disso, o controle negativo apresentou menores profundidades de criptas em relação às aves desafiadas com *Salmonella* Heidelberg e que receberam probiótico *in ovo* (Tabela 2).

Resultados esses que se assemelham aos de Vineetha et al. (2017), que observaram maior profundidade de cripta no duodeno de aves tratadas com *Lactobacillus plantarum*.

Por último, observou-se para o parâmetro largura de vilo, que as aves submetidas ao tratamento com probiótico via spray sem desafio com *Salmonella* Heidelberg apresentaram maior largura de vilo quando comparadas com as aves dos tratamentos controle (controle infecção - não tratadas e desafiadas com *Salmonella* Heidelberg e controle negativo – não tratadas e não desafiadas com *Salmonella* Heidelberg) (Tabela 2).

Para o segmento de jejuno não houve interação entre as variáveis, assim a diferença foi observada apenas entre via de aplicação do probiótico para o parâmetro largura de vilo, sendo que as aves que receberam probiótico *in ovo* foram as que apresentaram maior largura de vilo (Tabela 3).

Para o último segmento do intestino delgado, o íleo a diferença foi verificada somente entre os tratamentos controles para altura de vilosidade, aves não tratadas com probiótico e desafiadas com *Salmonella* Heidelberg foram as que obtiveram as maiores alturas (Tabela 3). Sendo que esse resultados se opõem aos de Teague et al. (2017), que injetaram solução salina ou probiotico *in ovo* no 18º dia de incubação e verificaram que o probiótico aumentou a área de superfície das vilosidades no segmento de íleo.

Aos 9 dias de idade, para altura de vilo no duodeno e profundidade de cripta no jejuno, as diferenças foram observadas apenas comparando as diferentes vias de aplicação de probiótico, sendo que as aves tratadas via spray obtiveram as maiores medidas (Tabela 3).

Esses resultados assemelham-se aos encontrados em frangos de corte inoculados experimentalmente com *Salmonella* Heidelberg e alimentados com probiótico até os 10 dias de idade, as aves apresentaram aumento da altura das vilosidades intestinais de duodeno e jejuno, nos tratamentos que foram suplementados com probiótico (Matias, 2016).

Aos 16 dias de idade, no segmento de duodeno para o parâmetro profundidade de cripta, foi possível observar que aves do tratamento controle infecção apresentaram maior profundidade de cripta quando comparadas com as aves do tratamento com probiótico *in ovo* e desafiadas com *Salmonella* Heidelberg (Tabela 4). Essas mesmas aves apresentaram maior largura de vilo quando comparadas com as aves do tratamento controle negativo (Tabela 5).

No segmento de íleo nessa mesma idade, houve interação entre as variáveis para profundidade de cripta, sendo que o tratamento com probiótico *in ovo* sem desafio com *Salmonella* Heidelberg foi o que apresentou o melhor resultado quando comparado com o tratamento com probiótico via spray sem desafio e probiótico *in ovo* com desafio com *Salmonella* Heidelberg (Tabela 4).

Os resultados do presente estudo aos 16 dias de idade são semelhantes aos de Wang et al. (2016), que estudaram o efeito dos prebióticos, probióticos e sua combinação na morfologia do intestino delgado e observaram aos 14 dias de idade que os tratamentos não afetaram a altura de vilo e profundidade de cripta de jejuno.

Por outro lado, os resultados são contrários aos encontrados em estudo sobre a suplementação de probiótico *Clostridium butyricum* em frangos de corte desafiados com *Escherichia coli* na morfologia de jejuno aos 7, 14 e 21 dias pós-desafio, que as aves desafiadas e tratadas com probiótico apresentaram as maiores alturas de vilosidade (Zhang et al., 2016).

No último período estudado, 23 dias de idade, o segmento de duodeno apresentou maior altura de vilo nas aves do tratamento controle negativo em relação ao tratamento controle infecção. Já para o parâmetro profundidade de cripta as aves não desafiadas com *Salmonella* Heidelberg foram as que apresentaram a maior profundidade (Tabela 5).

No segmento de íleo, quando estudado apenas via de aplicação do probiótico as maiores alturas de vilo foram observadas nas aves que receberam probiótico *in ovo*; e para o fator desafio com *Salmonella* Heidelberg, aves sem desafio com *Salmonella* Heidelberg foram as que apresentaram as maiores alturas de vilo. Os resultados de profundidade de cripta foram semelhantes aos encontrados para o segmento de duodeno nessa mesma idade (Tabela 5).

Lei et al. (2015), avaliaram de alimentação direta à base de microorganismo *Bacillus amyloliquefaciens* sobre a morfologia intestinal e constataram que todas as dietas com probiótico para os segmentos de duodeno, jejuno e íleo apresentaram a altura de vilosidade e profundidade de criptas aumentadas aos 21 dias de idade, de forma que o presente estudo apresentou resultados divergente para o segmentos de duodeno e jejuno e semelhantes para o íleo.

O aumento das alturas de vilosidade do íleo nas aves que receberam probiótico também são semelhantes aos de Beski & Al-Sardary (2015), que avaliaram os efeitos da suplementação de probiótico e simbiótico na dieta quanto à morfologia do íleo de frangos de corte aos 42 dias de idade e constataram que as aves suplementadas apresentaram aumento do comprimento de vilo em relação as aves do tratamento controle, enquanto que a profundidade de cripta não foi afetada.

Tabela 2 – Médias de altura de vilo, profundidade de cripta e largura de vilo (μm) da mucosa de duodeno de frangos de corte aos 5 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com *Salmonella* Heidelberg.

Altura de vilo	Controle Infecção 963,05	Controle Negativo 930,26 [#]	p=0,360
	Sem Desafio	Com Desafio	p(Tratamento x Desafio) = 0,043
<i>In ovo</i>	1043,29 [#] aA	957,11bB	p(Controles x Tratamento/ Desafio) = 0,015
Spray	971,27aA	1041,74 [#] aA	
Profundidade de cripta	Controle Infecção 188,29	Controle Negativo 160,77 [#]	p=0,060
	Sem Desafio	Com Desafio	p(Tratamento x Desafio) = 0,041
<i>In ovo</i>	178,82A	203,94 [#] A	p(Controles x Tratamento/ Desafio) = 0,314
Spray	184,04A	166,48B	
Largura de vilo	Controle Infecção 120,44 [*]	Controle Negativo 118,74 [#]	p=0,855
	Sem Desafio	Com Desafio	p(Tratamento x Desafio) = 0,591
<i>In ovo</i>	137,00	127,40	p(Controles x Tratamento/ Desafio) = 0,012
Spray	146,20 ^{*#}	129,60	

Médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si na coluna, e minúsculas diferem entre si na linha pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); Médias seguidas de asterisco diferem do controle infecção, e hashtag do controle negativo pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Tabela 3 – Médias de altura de vilosidade, profundidade de cripta e largura de vilosidade (μm) da mucosa de duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 5 e 9 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com *Salmonella* Heidelberg.

	Tratamentos	Altura de vilosidade	p	Profundidade de cripta	p	Largura de vilosidade	p
5 dias de idade	Jejuno						
	<i>In ovo</i>	430,29	0,706	136,96	0,219	154,46A	0,009
	Spray	417,45		157,33		120,09B	
	Sem Desafio	417,29	0,699	153,36	0,449	140,70	0,578
	Com Desafio	430,45		140,93		133,84	
	Controle Infecção	382,39	0,125	138,62	0,819	124,59	0,841
	Controle Negativo	457,91		133,33		128,08	
	Íleo						
	<i>In ovo</i>	444,01	0,389	130,84	0,534	132,97	0,726
	Spray	419,42		126,03		135,70	
	Sem Desafio	417,38	0,316	122,67	0,144	140,16	0,144
	Com Desafio	446,05		134,19		128,50	
9 dias de idade	Controle Infecção	474,92A	0,027	125,44	0,064	128,14	0,103
	Controle Negativo	381,66B		104,47		146,63	
	Duodeno						
	<i>In ovo</i>	1112,39B	0,034	207,54	0,941	162,76	0,895
	Spray	1224,84A		208,45		164,11	
	Sem Desafio	1148,52	0,430	214,72	0,277	166,37	0,567
	Com Desafio	1188,70		201,28		160,51	
	Controle Infecção	1124,10	0,467	199,71	0,312	169,13	0,954
	Controle Negativo	1176,44		182,05		168,31	
	Jejuno						
	<i>In ovo</i>	588,31	0,700	111,77B	0,020	153,77	0,975
	Spray	603,32		123,07 ^a		153,50	
	Sem Desafio	587,44	0,666	115,88	0,502	157,70	0,357
	Com Desafio	604,19		118,96		149,57	
	Controle Infecção	620,66	0,507	120,35	0,553	153,45	0,991
	Controle Negativo	584,13		116,51		153,59	
	Íleo						
	<i>In ovo</i>	570,66	0,499	108,90	0,254	143,89	0,529
	Spray	588,79		101,79		151,52	
	Sem Desafio	564,34	0,256	108,77	0,271	143,26	0,463
	Com Desafio	595,11		101,91		152,16	
	Controle Infecção	572,49	0,796	101,96	0,359	144,92	0,697
	Controle Negativo	582,25		93,92		151,57	

Médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si para cada tratamento na coluna, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Médias de profundidade de cripta (μm) da mucosa de duodeno e íleo de frangos de corte aos 16 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com *Salmonella* Heidelberg.

Duodeno	Controle Infecção 187,11*	Controle Negativo 173,12	p=0,230
	Sem Desafio	Com Desafio	p(Tratamento x Desafio) = 0,902
<i>In ovo</i>	165,90	156,40*	p(Controles x Tratamento/ Desafio) = 0,035
Spray	171,70	164,20	
Íleo	Controle Infecção 102,77	Controle Negativo 101,58	p=0,895
	Sem Desafio	Com Desafio	p(Tratamento x Desafio) = 0,019
<i>In ovo</i>	125,15aA	101,92bA	p(Controles x Tratamento/ Desafio) = 0,084
Spray	106,33aB	114,77aA	

Médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si na coluna, e minúsculas diferem entre si na linha pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); Médias seguidas de asterisco diferem do controle infecção, pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Tabela 5 – Médias de altura de vilosidade, profundidade de cripta e largura de vilosidade (μm) da mucosa de duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 16 e 23 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com *Salmonella* Heidelberg.

	Tratamentos	Altura de vilos	p	Profundidade de cripta	p	Largura de vilos	p
16 dias de idade	Duodeno						
	<i>In ovo</i>	1459,85		*		187,56	
	Spray	1438,97	0,696	*	*	176,83	0,389
	Sem Desafio	1434,22		*		187,77	
	Com Desafio	1464,61	0,570	*	*	176,62	0,371
	Controle Infecção	1458,24		*		194,15A	
	Controle Negativo	1541,54	0,276	*	*	153,50B	0,027
	Jejuno						
	<i>In ovo</i>	636,46		115,90		199,00	
	Spray	656,11	0,678	120,28	0,581	169,41	0,057
	Sem Desafio	668,58		121,55		196,22	
	Com Desafio	623,98	0,350	114,62	0,385	172,19	0,117
	Controle Infecção	628,73		116,87		153,10	
	Controle Negativo	710,90	0,226	117,75	0,938	192,35	0,073
	Íleo						
	<i>In ovo</i>	642,84		*		169,07	
	Spray	632,83	0,832	*	*	150,91	0,111
	Sem Desafio	638,49		*		160,56	
	Com Desafio	637,18	0,978	*	*	159,42	0,918
	Controle Infecção	583,07		*		140,67	
	Controle Negativo	615,00	0,634	*	*	166,97	0,103
23 dias de idade	Duodeno						
	<i>In ovo</i>	1588,07		175,59		211,65	
	Spray	1542,45	0,563	193,47	0,063	202,05	0,406
	Sem Desafio	1603,47		196,07 ^a		201,72	
	Com Desafio	1527,05	0,335	172,99B	0,019	211,99	0,374
	Controle Infecção	1546,92B		182,17		223,20	
	Controle Negativo	1840,73A	0,013	193,56	0,389	194,94	0,091
	Jejuno						
	<i>In ovo</i>	681,52		101,75		165,62	
	Spray	662,85	0,519	110,52	0,080	175,40	0,458
	Sem Desafio	685,07		110,79		167,86	
	Com Desafio	659,30	0,376	101,48	0,065	173,16	0,686
	Controle Infecção	645,90		98,75		161,27	
	Controle Negativo	718,61	0,084	103,10	0,528	153,54	0,677
	Íleo						
	<i>In ovo</i>	709,72A		97,16		159,78	
	Spray	641,01B	0,038	98,76	0,616	163,01	0,786
	Sem Desafio	721,91A		105,96 ^a		162,70	
	Com Desafio	628,83B	0,007	89,96B	0,01	160,09	0,826
	Controle Infecção	604,53		95,79		145,83	
	Controle Negativo	672,10	0,141	99,09	0,466	161,28	0,363

Médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si para cada tratamento na coluna, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Asterisco (*) representam valores com interação.

Os resultados referentes à contagem do número de células caliciformes estão apresentados nas Tabelas 6 a 11.

Aos 5 dias de idade, para o segmento de duodeno foi possível observar que a contagem do número de células caliciformes nas aves do tratamento controle negativo foi menor quando comparado com contagem do número de células caliciformes das aves tratadas com probiótico via spray desafiadas ou não com *Salmonella* Heidelberg (Tabela 6).

Para o segmento de jejuno, aves do tratamento controle infecção foram as que apresentaram menor número de células caliciformes em relação ao controle negativo, ao probiótico *in ovo* sem desafio com *Salmonella* Heidelberg e ao probiótico via spray com desafio com *Salmonella* Heidelberg (Tabela 6). Resultados convergentes com os de Rocha et al. (2016), que suplementaram frangos de corte com probiótico *Bacillus subtilis* aos 7 e 35 dias de idade e concluíram que o grupo controle apresentou menor número de células caliciformes do que o grupo tratado no seguimento de jejuno.

Já o controle negativo, apresentou maior número de células caliciformes quando comparado com número de células caliciformes das aves tratadas com probiótico *in ovo* e desafiadas com *Salmonella* Heidelberg e aves tratadas com probiótico via spray e não desafiadas com *Salmonella* Heidelberg (Tabela 6).

Ainda no segmento de jejuno, quando comparado via de aplicação do probiótico nas aves sem desafio por *Salmonella* Heidelberg, aves que receberam probiótico *in ovo* apresentaram as maiores contagens de célula caliciformes, porém quando submetidas ao desafio com *Salmonella* Heidelberg, às aves que receberam probiótico via spray foram as que apresentaram os maiores números de células caliciformes (Tabela 6).

Para o segmento de íleo, aos 5 dias de idade não houve diferença entre os tratamentos para contagem do número de células caliciformes (Tabela 7).

Aos 9 dias de idade, as aves tratadas com probiótico via spray e desafiadas com *Salmonella* Heidelberg mantiveram-se com a maior contagem de célula califorme em todos os segmentos estudados (Tabela 8). De forma semelhante ao estudo realizado por Lourenço et al. (2013), para avaliarem o efeito do probiótico em frangos de corte desafiados com *Salmonella* Minnesota, relatam que aos 7 dias de idade o segmento de íleo das aves suplementadas com probiótico apresentaram aumento de células caliciformes.

A contagem do número de células caliciformes aos 16 dias de idade para todos os segmentos de intestino delgado encontra-se na Tabela 9. Para o segmento de duodeno, o primeiro resultado observado foi que os controles infecção e negativo diferiram entre si.

Além disso, controle infecção obteve menor contagem de células caliciformes em relação às aves do tratamento com probiótico via spray sem desafio com *Salmonella* Heidelberg. O controle negativo também obteve menor contagem de células caliciformes em relação às mesmas aves, bem como para as aves do tratamento com probiótico *in ovo* sem desafio com *Salmonella* Heidelberg.

Da mesma forma que no presente estudo o desafio com *Salmonella* Heidelberg reduziu o número de células caliciformes e o probiótico elevou esse número, Zhen et al. (2018), aferiram a eficácia protetora de dois níveis de *Bacillus coagulans* na dieta de aves desafiadas com duas concentrações de *Salmonella* Enteritidis. Os resultados mostraram que a infecção por *Salmonella* Enteritidis reduziu o número de células caliciformes enquanto que as aves tratadas com *Bacillus coagulans* o número de células aumentou aos 7 e 17 dias pós-desafio.

Quando comparado à via de aplicação de probiótico nas aves sem desafio com *Salmonella* Heidelberg, aves do tratamento com probiótico spray obtiveram as maiores contagens de célula caliciforme. No entanto, essas mesmas aves foram as que obtiveram maiores contagens de célula caliciforme se comparado à infecção por *Salmonella* Heidelberg (Tabela 9).

No jejuno, o controle negativo apresentou maior número de células caliciformes do que aves tratadas com probiótico *in ovo* e desafiadas ou não com *Salmonella* Heidelberg. Já o controle infecção além de diferir (maior número de células caliciformes) das mesmas aves do controle negativo também diferiu das aves que receberam probiótico via spray e foram desafiadas com *Salmonella* Heidelberg (Tabela 9).

No íleo novamente os controles diferiram, mas dessa vez o controle negativo foi quem conquistou o maior número de células caliciformes. Além disso, o controle negativo permaneceu com o maior número de células caliciformes em relação às aves que receberam probiótico *in ovo* e desafiadas ou não com *Salmonella* Heidelberg e as aves que receberam probiótico via spray e desafiadas com *Salmonella* Heidelberg.

Sendo que esses resultados são divergentes aos de Manafi et al., (2017) que ao avaliarem o efeito do *Bacillus subtilis* em frangos de corte após a inoculação intramuscular de *Escherichia coli*, concluíram que o desafio por *Escherichia coli* leva ao aumento do número de células caliciformes no íleo das aves.

Aos 23 dias de idade, não houve interação entre as variáveis para o segmento de duodeno. No entanto, foi possível observar para o fator via de aplicação do probiótico, que aves que receberam probiótico *in ovo* obtiveram maior número de células caliciformes (Tabela 10).

Para a variável desafio com *Salmonella* Heidelberg, as aves sem desafio foram as que apresentaram maior número de células caliciformes. E entre os controles, o maior número de células caliciformes foi encontrado nas aves não tratadas com probiótico e desafiadas com *Salmonella* Heidelberg (controle infecção) (Tabela 10).

Na tabela 11, é possível observar os resultados ainda aos 23 dias de idade para o segmento de jejuno e íleo. Para o jejuno, o maior número de células foi encontrado no tratamento com probiótico *in ovo* com desafio com *Salmonella* Heidelberg, porém ele diferiu apenas do controle negativo. No segmento de íleo, novamente o maior número de células foi encontrado no tratamento com probiótico *in ovo* com desafio com *Salmonella* Heidelberg, sendo que as diferenças foram com as aves que receberam probiótico via spray e também desafiadas com *Salmonella* Heidelberg e do controle infecção.

De forma semelhante aos resultados dos 21 dias para os diferentes segmentos estudados, pesquisa realizada para avaliar o efeito do probiótico sobre a estrutura e ultraestrutura do intestino delgado de perus, desafiados aos 3 dias de idade, com 10^{10} UFC/mL de *Salmonella* spp. (*Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Kentucky) demonstrou que aves que receberam probiótico mostraram aumento no número de células caliciformes no duodeno, jejuno e íleo aos 21 dias de idade (Rahimi et al., 2009).

Tabela 6 – Contagem do número de células caliciformes na mucosa de duodeno e jejuno de frangos de corte aos 5 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com *Salmonella* Heidelberg.

Duodeno	Controle Infecção 93,04	Controle Negativo 89,36 [#]	p=0,623
	Sem Desafio	Com Desafio	p(Tratamento x Desafio) = 0,696 p(Controles x Tratamento/ Desafio) = 0,01
<i>In ovo</i>	101,80	107,20	
Spray	109,70 [#]	111,00 [#]	
Jejuno	Controle Infecção 62,58b [*]	Controle Negativo 73,93a [#]	p=0,028
	Sem Desafio	Com Desafio	p(Tratamento x Desafio) = 0,01 p(Controles x Tratamento/ Desafio) = 0,823
<i>In ovo</i>	77,28aA [*]	58,50bB [#]	
Spray	59,56bB [#]	80,48aA [*]	

Médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si na coluna, e minúsculas diferem entre si na linha pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); Médias seguidas de asterisco diferem do controle infecção, e hashtag do controle negativo pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Tabela 7 – Contagem do número de células caliciformes na mucosa de íleo de frangos de corte aos 5 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com *Salmonella* Heidelberg.

Tratamentos	Número de células	p
<i>In ovo</i>	78,64	0,858
Spray	77,98	
Sem Desafio	75,63	0,146
Com Desafio	80,63	
Controle Infecção	81,64	0,257
Controle Negativo	75,74	

Médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si na coluna, e minúsculas diferem entre si na linha pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 8 – Contagem do número de células caliciformes na mucosa de duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 9 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com *Salmonella* Heidelberg.

Duodeno	Controle Infecção 181,24*	Controle Negativo 178,78 [#]	p=0,553
	Sem Desafio	Com Desafio	p(Tratamento x Desafio) = 0,004 p(Controles x Tratamento/ Desafio) = 0,063
<i>In ovo</i>	140,30 ^a A	154,82aB	
Spray	154,30bA	212,86 ^{a#} aA	
Jejuno	Controle Infecção 94,28*	Controle Negativo 105,50 [#]	p=0,138
	Sem Desafio	Com Desafio	p(Tratamento x Desafio) = 0,01 p(Controles x Tratamento/ Desafio) = 0,678
<i>In ovo</i>	111,22aA	80,02 ^a bB	
Spray	101,66aA	114,34 ^a aA	
Íleo	Controle Infecção 98,94	Controle Negativo 93,86 [#]	p=0,500
	Sem Desafio	Com Desafio	p(Tratamento x Desafio) = 0,026 p(Controles x Tratamento/ Desafio) = 0,092
<i>In ovo</i>	110,18aA	115,84 ^a aA	
Spray	80,62bB	110,04aA	

Médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si na coluna, e minúsculas diferem entre si na linha pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); Médias seguidas de asterisco diferem do controle infecção, e hashtag do controle negativo pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Tabela 9 – Contagem do número de células caliciformes na mucosa de duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 16 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com *Salmonella* Heidelberg.

Duodeno	Controle Infecção 222,52*a	Controle Negativo 195,52 ^a b	p=0,031
	Sem Desafio	Com Desafio	p(Tratamento x Desafio) = 0,026 p(Controles x Tratamento/ Desafio) = 0,001
<i>In ovo</i>	237,23 ^a aB	124,20aA	
Spray	264,34 ^{a#} aA	112,00bA	
Jejuno	Controle Infecção 195,06*	Controle Negativo 169,50 [#]	p=0,051
	Sem Desafio	Com Desafio	p(Tratamento x Desafio) = 0,139 p(Controles x Tratamento/ Desafio) = 0,01
<i>In ovo</i>	133,90 ^{a#}	112,40 ^{a#}	
Spray	188,50	139,70*	
Íleo	Controle Infecção 145,10b	Controle Negativo 167,36 ^a	p=0,036
	Sem Desafio	Com Desafio	p(Tratamento x Desafio) = 0,167 p(Controles x Tratamento/ Desafio) = 0,01
<i>In ovo</i>	123,10 ^a	128,10 ^a	
Spray	143,30	127,60 ^a	

Médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si na coluna, e minúsculas diferem entre si na linha pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); Médias seguidas de asterisco diferem do controle infecção, e hashtag do controle negativo pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Tabela 10 – Contagem do número de células caliciformes na mucosa de duodeno de frangos de corte aos 23 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com *Salmonella* Heidelberg.

Tratamentos	Número de células	p
<i>In ovo</i>	175,78A	0,009
Spray	158,71B	
Sem Desafio	173,61A	0,050
Com Desafio	160,88B	
Controle Infecção	171,66A	0,009
Controle Negativo	147,74B	

Médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si na coluna, e minúsculas diferem entre si na linha pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 11 – Contagem do número de células caliciformes na mucosa de jejuno e íleo de frangos de corte aos 23 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com *Salmonella* Heidelberg.

Jejuno	Controle Infecção 140,94	Controle Negativo 129,34 [#]	p=0,202
	Sem Desafio	Com Desafio	p(Tratamento x Desafio) = 0,096
<i>In ovo</i>	134,70	158,30 [#]	p(Controles x Tratamento/ Desafio) = 0,042
Spray	145,30	147,60	
Íleo	Controle Infecção 123,92 [*]	Controle Negativo 135,22	p=0,193
	Sem Desafio	Com Desafio	p(Tratamento x Desafio) = 0,041
<i>In ovo</i>	139,52A	154,68 [*] A	p(Controles x Tratamento/ Desafio) = 0,048
Spray	138,10A	128,16B	

Médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si na coluna, e minúsculas diferem entre si na linha pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); Médias seguidas de asterisco diferem do controle infecção, e hashtag do controle negativo pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

Avaliação ultraestrutural da integridade entérica

As avaliações da integridade da mucosa entérica de frangos de corte por meio da microscopia eletrônica de varredura em diferentes idades, desafiadas ou não com *Salmonella* Heidelberg, estão apresentadas nas Figuras 1 a 17.

Com relação à integridade da mucosa do íleo, foi possível observar para todas as idades estudadas (5, 9, 16 e 23 dias de idade) que as aves submetidas aos tratamentos com probiótico (T1 e T2) apresentaram mucosa mais integra quando comparadas com o controle negativo (Ctr N). De maneira geral, seus vilos mostraram-se mais organizados e espessos, sendo que a integridade da mucosa das aves que receberam probiótico via spray (T2) mostrou-se ligeiramente mais preservada (Figura 1, 2, 3 e 4).

Os resultados do presente estudo corroboram com os encontrados por Chichlowski et al. (2007), sobre ultraestrutura e relação espacial entre bactérias do epitélio do íleo, ceco e colon em frangos de corte alimentados com dieta contendo probiótico e salinomicina. Os autores demonstraram que a colonização do trato gastrointestinal com probiótico impediu a ligação de patógenos ao epitélio devido à capacidade do mesmo de atuar como agente trófico capaz de promover uma superpopulação na microbiota e também alterar a microarquitetura dos enterócitos.

Para as aves que foram submetidas ao desafiado com *Salmonella* Heidelberg o padrão da mucosa ileal das aves tratadas com probiótico independente da via de aplicação (T3 e T4) mostraram-se mais preservada e integra quando comparada com o tratamento controle infecção, ou seja, aves desafiadas com *Salmonella* Heidelberg e não tratadas com probiótico (Ctr I). Da mesma maneira que foi observado nas aves tratadas com probiótico via spray e não desafiadas com *Salmonella* Heidelberg (T2), a mucosa das aves tratadas com probiótico via spray e desafiadas com *Salmonella* Heidelberg (T4) apresentou-se melhor preservada quando comparada com as aves tratadas com probiótico *in ovo* e desafiadas com *Salmonella* Heidelberg (T3) (Figura 5, 6, 7 e 8).

A mucosa da região apical dos vilos das aves do tratamento controle infecção (Ctr I) mostrou erosão e epitélio degenerado, o que sugere atuação da *Salmonella* Heidelberg sobre o epitélio, sendo essas características melhor evidenciadas aos 23 dias de idade (Figura 8).

Esses resultados são semelhantes aos encontrados na pesquisa realizada com o objetivo de avaliar o efeito do probiótico sobre a estrutura e ultraestrutura do intestino delgado de perus, desafiados aos 3 dias de idade, com 10^{10} cfu/mL de *Salmonella* spp. (*Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella*

Kentucky) realizado por Rahimi et al. (2009), que demonstraram encurtamento, espessamento e atrofia das vilosidades ileais das aves desafiadas com *Salmonella* quando comparada com as aves controle e tratadas com probiótico.

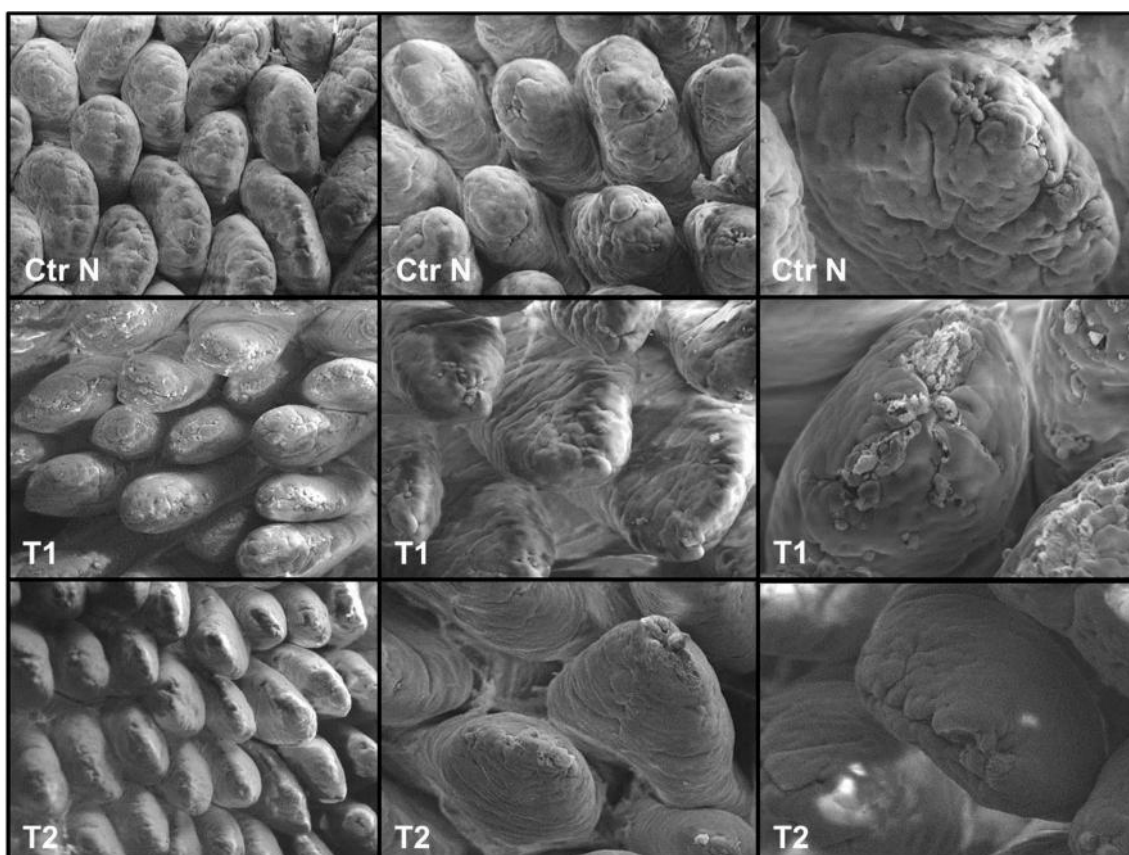


Figura 1 - Fotomicrografia da mucosa ileal de frangos de corte aos 5 dias de idade. Tratamentos: Ctr N: controle negativo – sem probiótico e sem desafio com *Salmonella* Heidelberg; T1: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T2: probiótico pulverizado via spray no nascimento. 400X, 800X e 1500X.

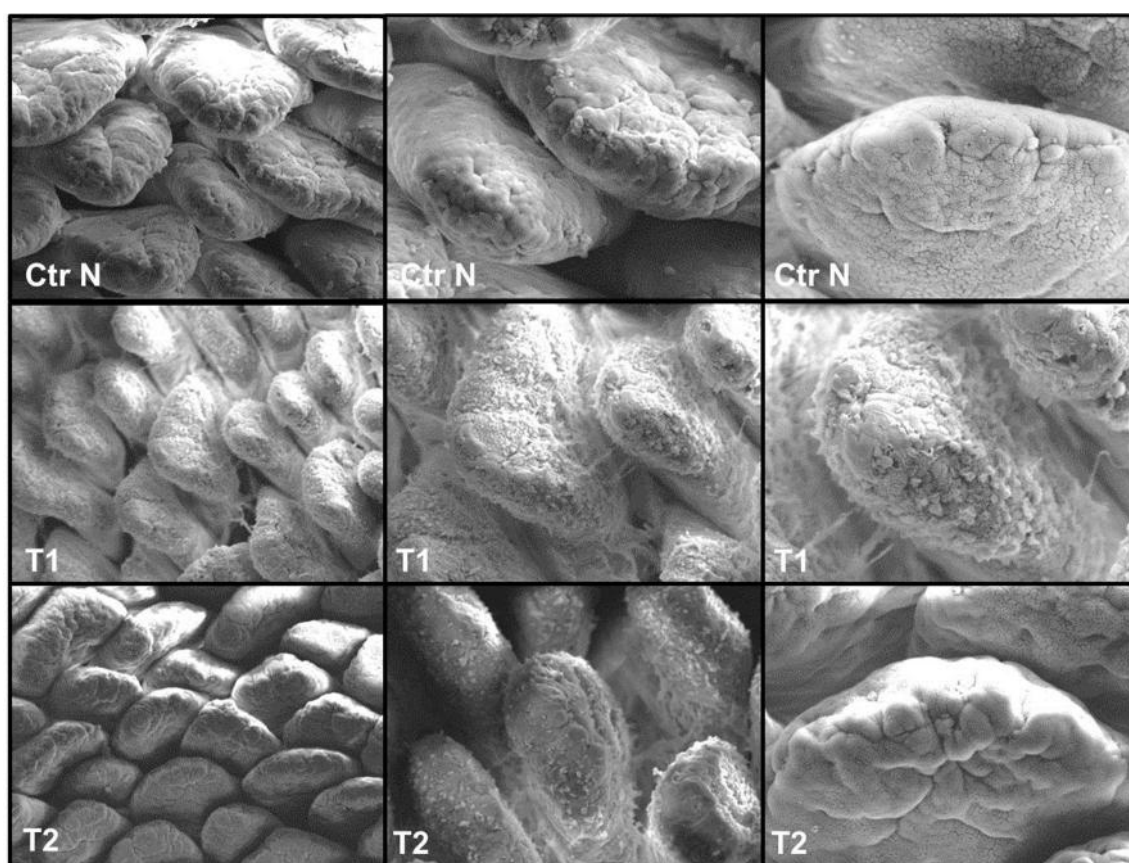


Figura 2 - Fotomicrografia da mucosa ileal de frangos de corte aos 9 dias de idade. Tratamentos: Ctr N: controle negativo – sem probiótico e sem desafio com *Salmonella* Heidelberg; T1: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T2: probiótico pulverizado via spray no nascimento. 400X, 800X e 1500X.

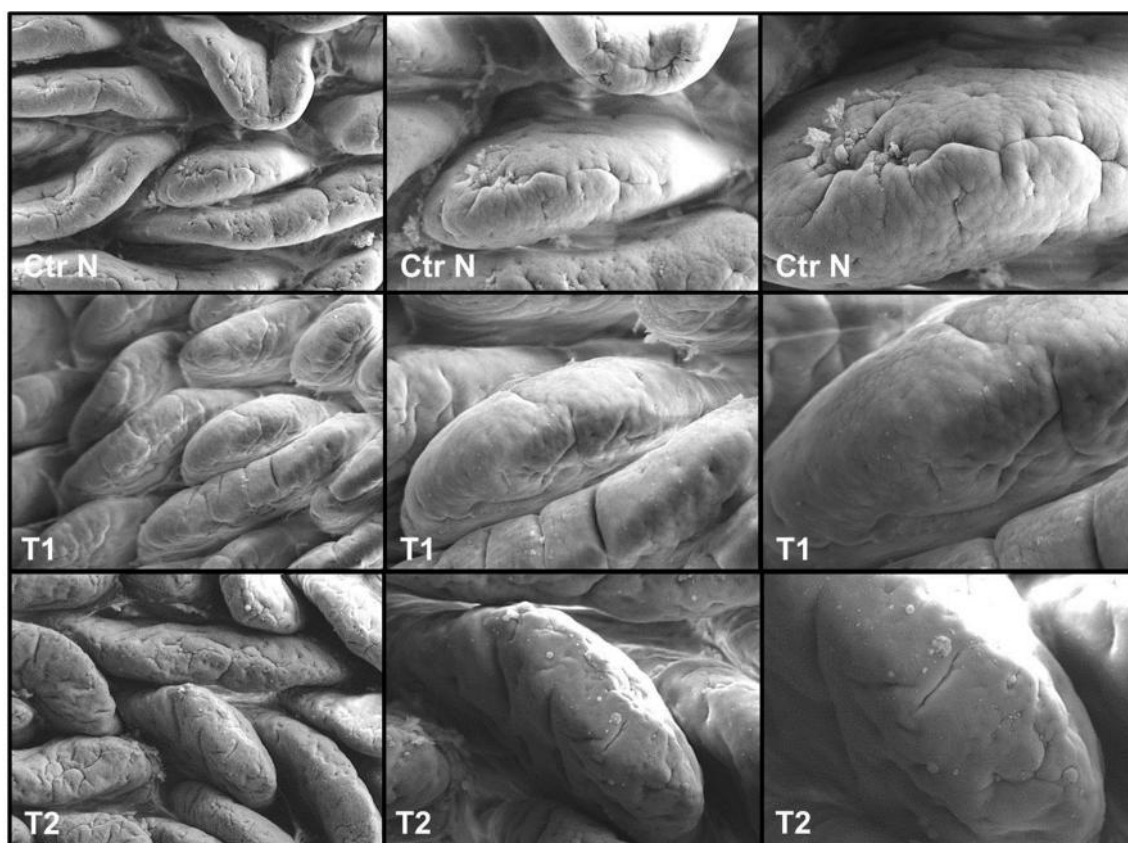


Figura 3 - Fotomicrografia da mucosa ileal de frangos de corte aos 16 dias de idade. Tratamentos: Ctr N: controle negativo – sem probiótico e sem desafio com *Salmonella* Heidelberg; T1: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T2: probiótico pulverizado via spray no nascimento. 400X, 800X e 1500X.

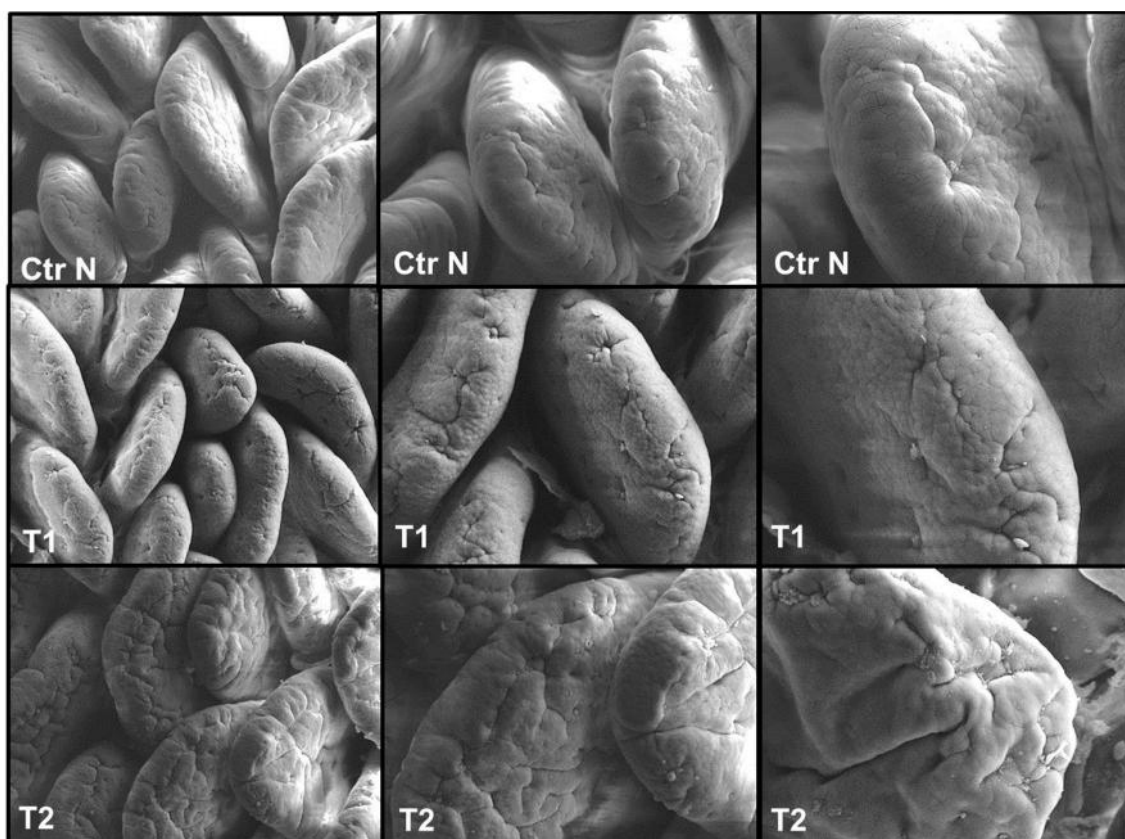


Figura 4 - Fotomicrografia da mucosa ileal de frangos de corte aos 23 dias de idade. Tratamentos: Ctr N: controle negativo – sem probiótico e sem desafio com *Salmonella* Heidelberg; T1: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T2: probiótico pulverizado via spray no nascimento. 400X, 800X e 1500X.

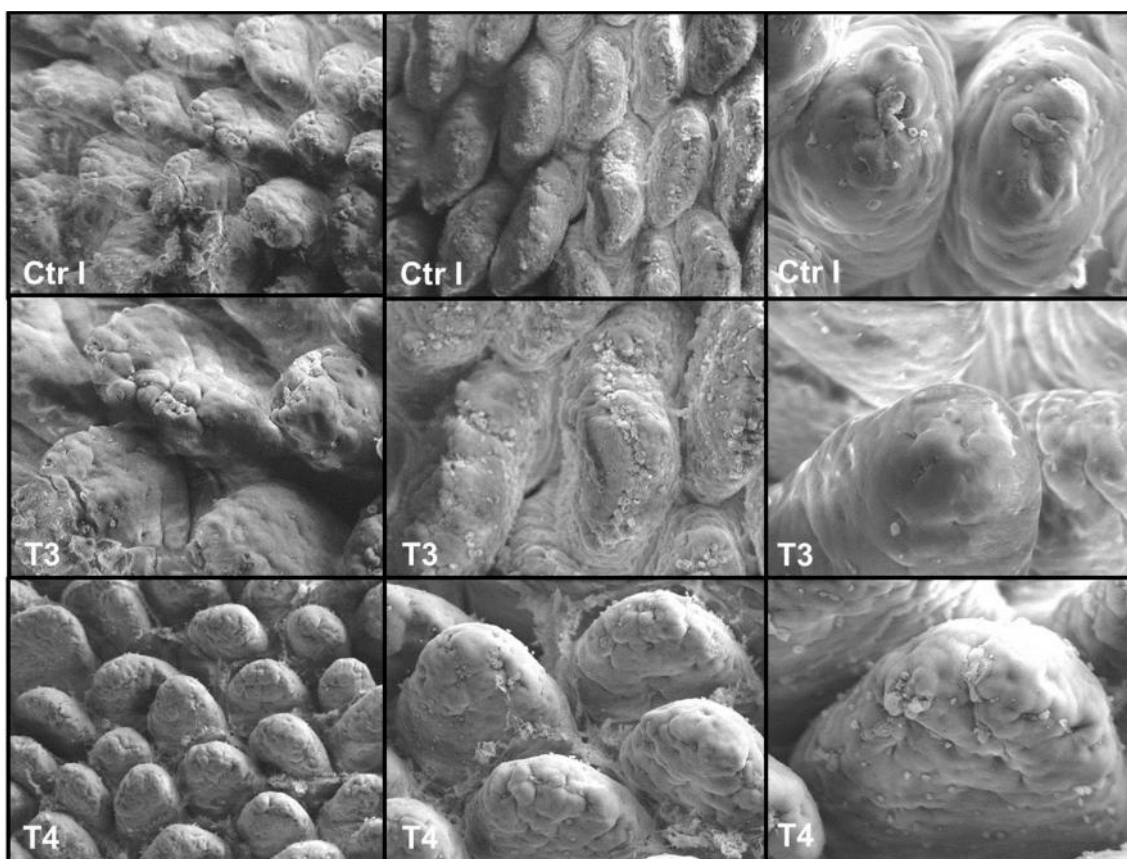


Figura 5 - Fotomicrografia da mucosa ileal de frangos de corte aos 5 dias de idade. Tratamentos: Ctrl I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. 400X, 800X e 1500X.

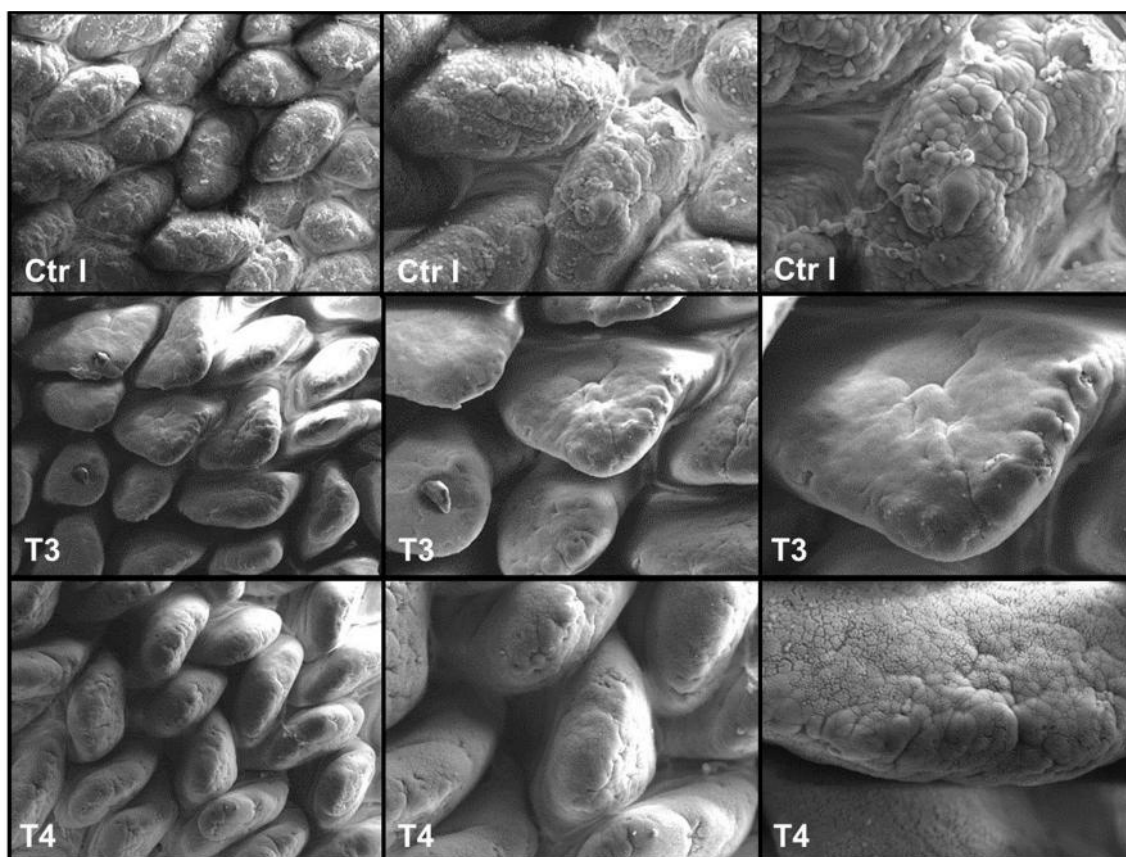


Figura 6 - Fotomicrografia da mucosa ileal de frangos de corte aos 9 dias de idade. Tratamentos: Ctr I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. 400X, 800X e 1500X.

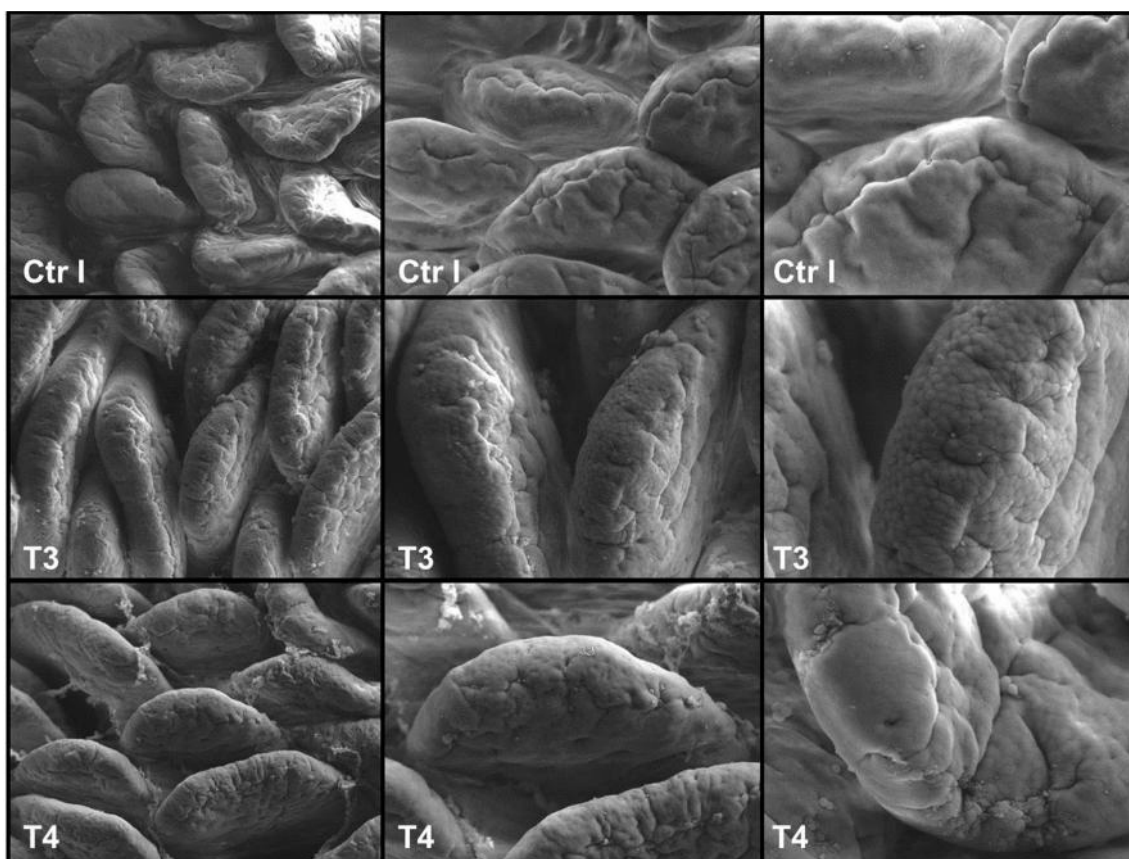


Figura 7 - Fotomicrografia da mucosa ileal de frangos de corte aos 16 dias de idade. Tratamentos: Ctr I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. 400X, 800X e 1500X.

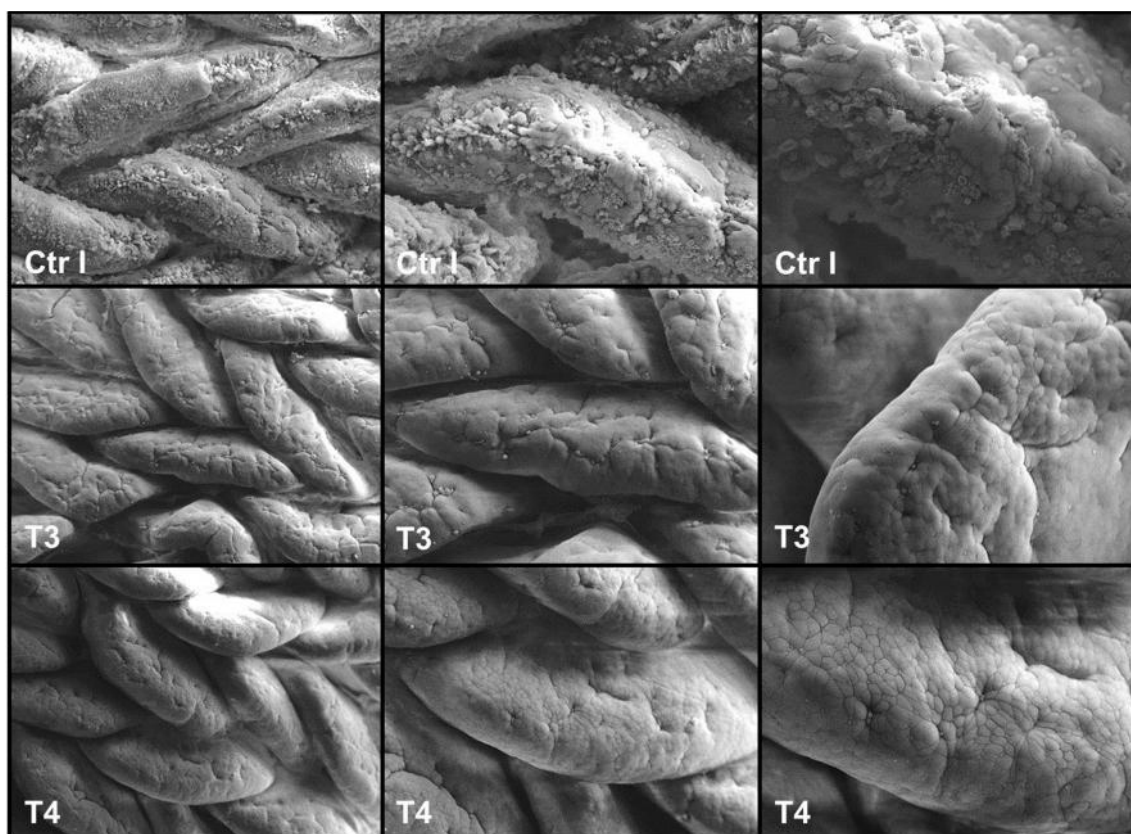


Figura 8 - Fotomicrografia da mucosa ileal de frangos de corte aos 23 dias de idade. Tratamentos: Ctr I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. 400X, 800X e 1500X.

Ao avaliar o segmento do intestino grosso, o ceco, por meio da microscopia eletrônica de varredura, aos 5, 9, 16 e 23 dias de idade, foi possível visualizar somente a presença de criptas. Segundo Boleli et al. (2002), no ceco de frangos de corte as vilosidades reduzem de tamanho desde sua base até desaparecerem no ápice. Portanto, a maior extensão da mucosa do ceco está constituída essencialmente por longas glândulas tubulares simples não ramificadas, as chamadas glândulas de Lieberkühn ou criptas.

Segundo Muniz (2014), a maioria das salmonelas paratíficas instala-se na parede intestinal, principalmente dos cecos, onde se multiplicam e são eliminadas pelas fezes de forma constante ou intermitente. O que leva a inferir que as maiores alterações morfológicas e ultraestruturais ocorram na mucosa desse segmento intestinal.

Aos 5 dias de idade, embora ainda não estivesse estabelecido o padrão da superfície da mucosa cecal caracterizada apenas pela presença de criptas, foi possível verificar que a estrutura cecal se apresentava com pregas longitudinais nas quais se observava evaginações (Figura 9).

Já aos 9, 16 e 23 dias de idade, as criptas se apresentam com contorno mais definido e arredondado de suas aberturas, sendo que a superfície da mucosa cecal das aves tratadas com probiótico (T1 e T2) apresentou-se mais preservada quando comparada com a mucosa das aves do tratamento controle negativo (Ctr N).

Foi também possível observar que a integridade da mucosa cecal, mostrou-se ligeiramente mais preservada nas aves que receberam probiótico via spray quando comparado com as aves que receberam probiótico via *in ovo* (Figura 10, 11 e 12).

Martins et al. (2014) estudaram o efeito das diferentes vias de aplicação do probiótico sobre a integridade cecal em frangos de corte desafiados ou não com *Salmonella* Enteritidis aos 7 dias de idade, também verificaram que as aves submetidas aos tratamentos com probiótico independente da via de aplicação apresentaram mucosa mais íntegra quando comparada com a mucosa das aves do tratamento controle.

Outro resultado importante observado em todas as idades estudadas está relacionado com a intensa colonização da mucosa cecal com o agente trófico nas aves tratadas com probióticos, sendo essa colonização mais intensa na mucosa cecal das aves que receberam probiótico via spray (Figura 9, 10, 11 e 12).

Os resultados do presente estudo foram similares aos encontrados por Chichlowski et al. (2007), que avaliaram o efeito de dietas com probiótico e salinomicina sobre ultraestrutura e relação espacial entre bactérias do epitélio do íleo,

ceco e colon em frangos de corte e encontraram aumento da colonização bacteriana nos segmentos de ceco e colon aos 21 dias de idade.

A mucosa das aves desafiadas com *Salmonella* Heidelberg em todas as idades estudadas apresentou-se bastante alterada na sua ultraestrutura, porém foi possível observar que a mucosa das aves tratadas com probiótico (T3 e T4) mostrou-se ligeiramente mais preservada quando comparada com o controle infecção (Ctr I) (Figura 13, 14, 15 e 16). Aos 23 dias de idade, foi possível observar que o efeito do probiótico aplicado via spray manteve a mucosa mais preservada quando comparada com a mucosa das aves que receberam probiótico *in ovo* (Figura 16).

Martins et al. (2015) avaliou probiótico de microbiota definida na integridade entérica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis, e constataram também que o probiótico é capaz de atuar na melhora da integridade entérica.

Borsoi et al. (2009), avaliaram as evoluções das mudanças ultraestruturais em pintos recém eclodidos e inoculados com *Salmonella* Heidelberg, e também encontraram resultados que indicam que a infecção por *Salmonella* Heidelberg alteram a fisiologia intestinal normal, a extrusão celular cecal e que também podem afetar o desempenho zootécnico e a saúde das aves.

As alterações estruturais observadas com o presente estudo foram semelhantes as já observadas em estudos realizados sobre a morfologia dos cecos de pintos de corte submetidos ao tratamento com microbiota cecal antes e após infecção por *Salmonella* Enteritidis, verificaram que no 7º dia após tratamento, pintos não infectados com *Salmonella* Enteritidis e os tratados com suspensão bacteriana de exclusão competitiva antes da infecção apresentaram pregas cecais longitudinais com evaginações evidentes da mucosa em sua superfície, enquanto que os pintos infectados e os tratados com suspensão bacteriana de exclusão competitiva após a infecção apresentaram pregas cecais ainda mais largas e sem as evaginações (Sterzo, 2011).

A colonização intestinal foi observada em todas as idades e tratamentos (Ctr I, T3 e T4), desta forma não foi possível afirmar que essa colonização tenha sido por patógenos (*Salmonella* Heidelberg) ou por agentes tróficos (probiótico) nos tratamentos com probiótico e desafio (T3 e T4) enquanto que o tratamento controle infecção (Ctr I) pode-se afirmar que a colonização foi inerente ao desafio por *Salmonella* Heidelberg (Figura 13, 14, 15 e 16).

Rahimi et al. (2009) avaliaram o efeito de probiótico sobre a estrutura e ultraestrutura na mucosa entérica de perus, também relataram a presença de bastonetes semelhantes a *Salmonella* spp. na mucosa entérica do grupo controle

submetido ao desafio com *Salmonella* spp. (*Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Kentucky).

Na figura 17 é possível observar a fotomicrografia aos 5, 9, 16 e 23 dias de idade da mucosa ileal e cecal de frangos de corte que receberam desafio com *Salmonella* Heidelberg via intraesofágica. A mucosa de ambos os segmentos apresentaram severas alterações na integridade quando comparada com a mucosa das aves desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg (Ctr I, T3 e T4).

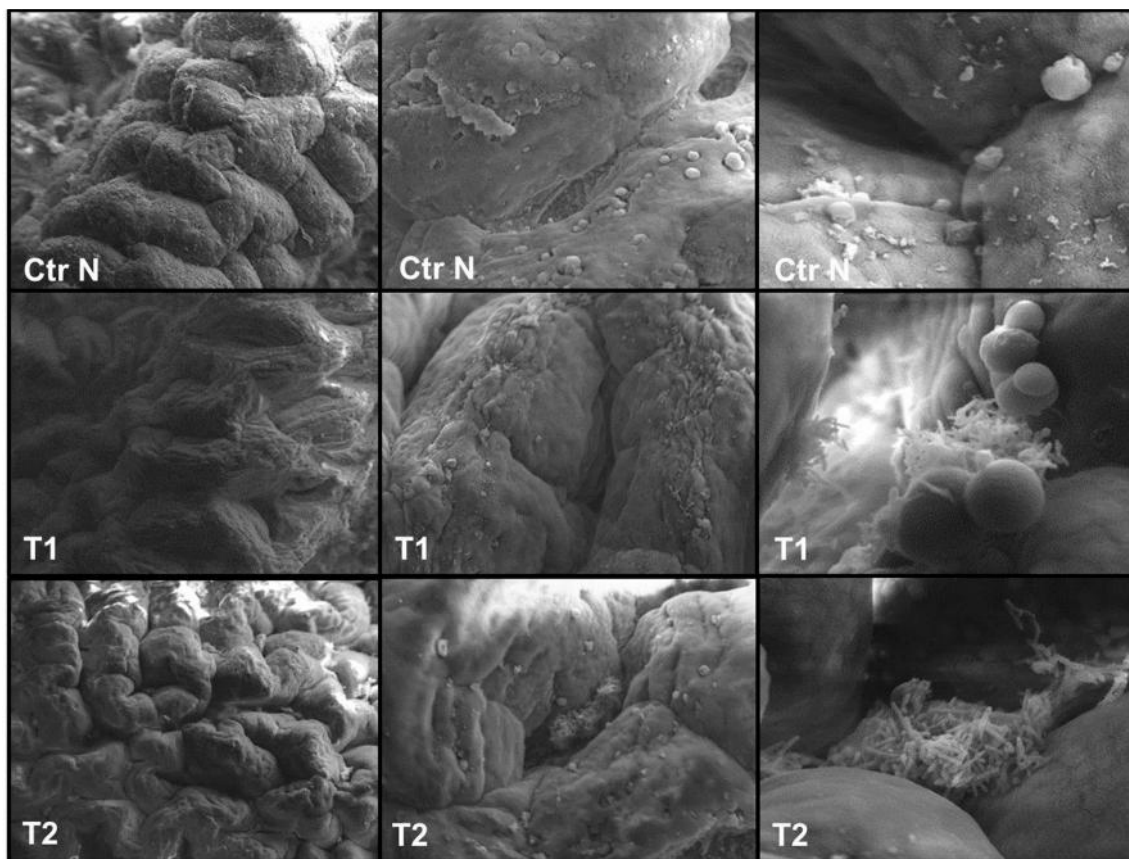


Figura 9 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 5 dias de idade. Tratamentos: Ctr N: controle negativo – sem probiótico e sem desafio com *Salmonella* Heidelberg; T1: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T2: probiótico pulverizado via spray no nascimento. 400X, 1500X e 5000X.

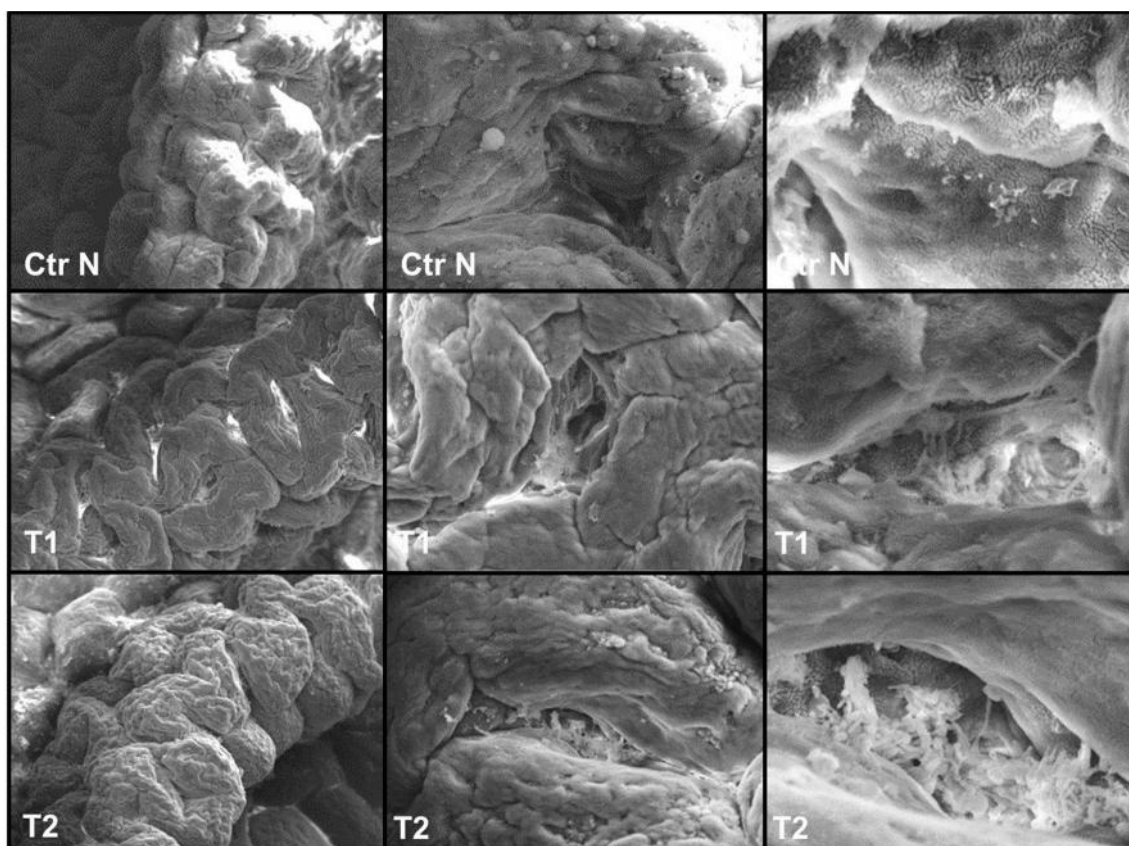


Figura 10 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 9 dias de idade. Tratamentos: Ctr N: controle negativo – sem probiótico e sem desafio com *Salmonella* Heidelberg; T1: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T2: probiótico pulverizado via spray no nascimento. 400X, 1500X e 5000X.

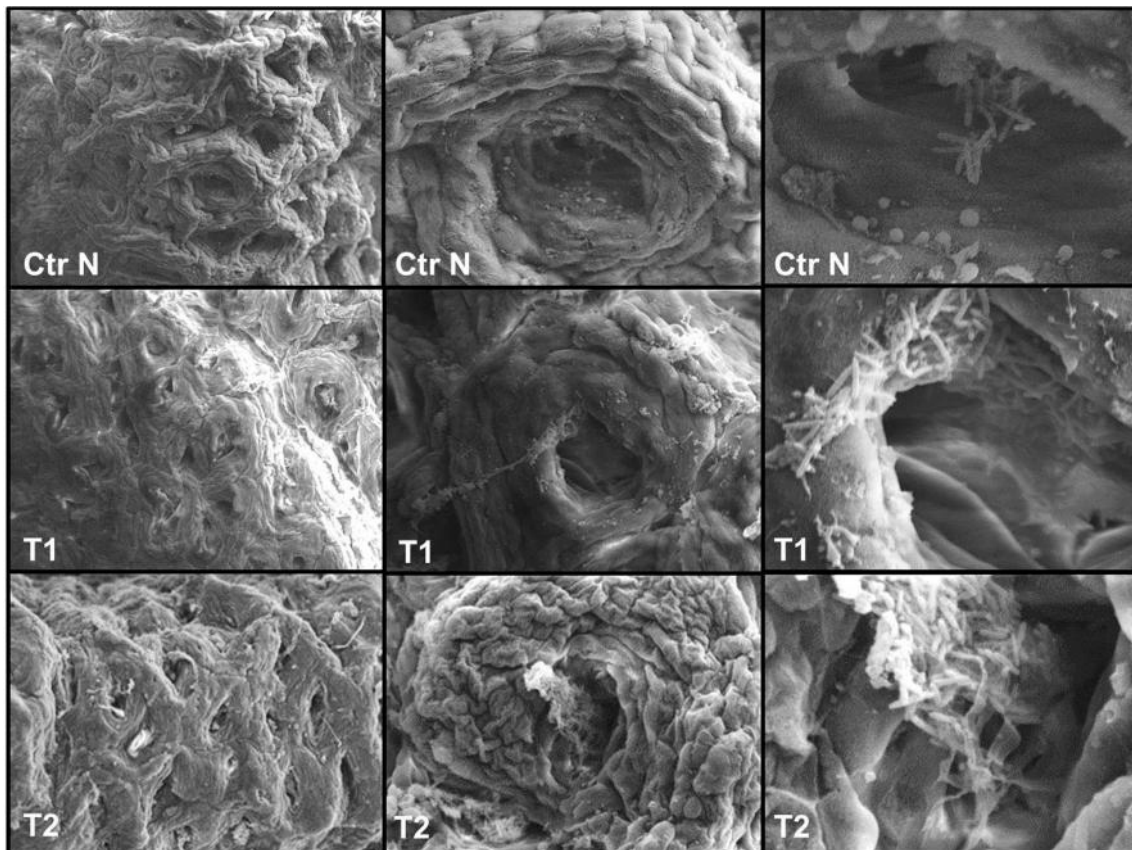


Figura 11 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 16 dias de idade. Tratamentos: Ctr N: controle negativo – sem probiótico e sem desafio com *Salmonella* Heidelberg; T1: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T2: probiótico pulverizado via spray no nascimento. 400X, 1500X e 5000X.

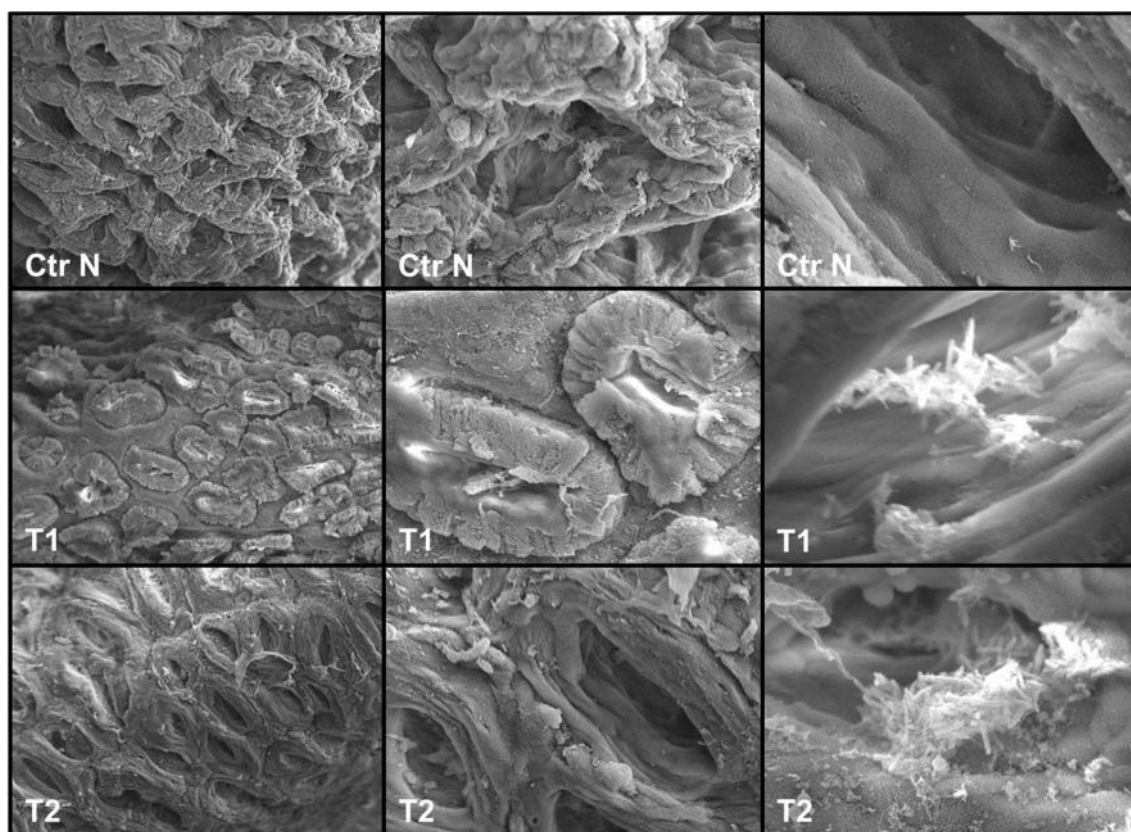


Figura 12 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 23 dias de idade. Tratamentos: Ctr N: controle negativo – sem probiótico e sem desafio com *Salmonella* Heidelberg; T1: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T2: probiótico pulverizado via spray no nascimento. 400X, 1500X e 5000X.

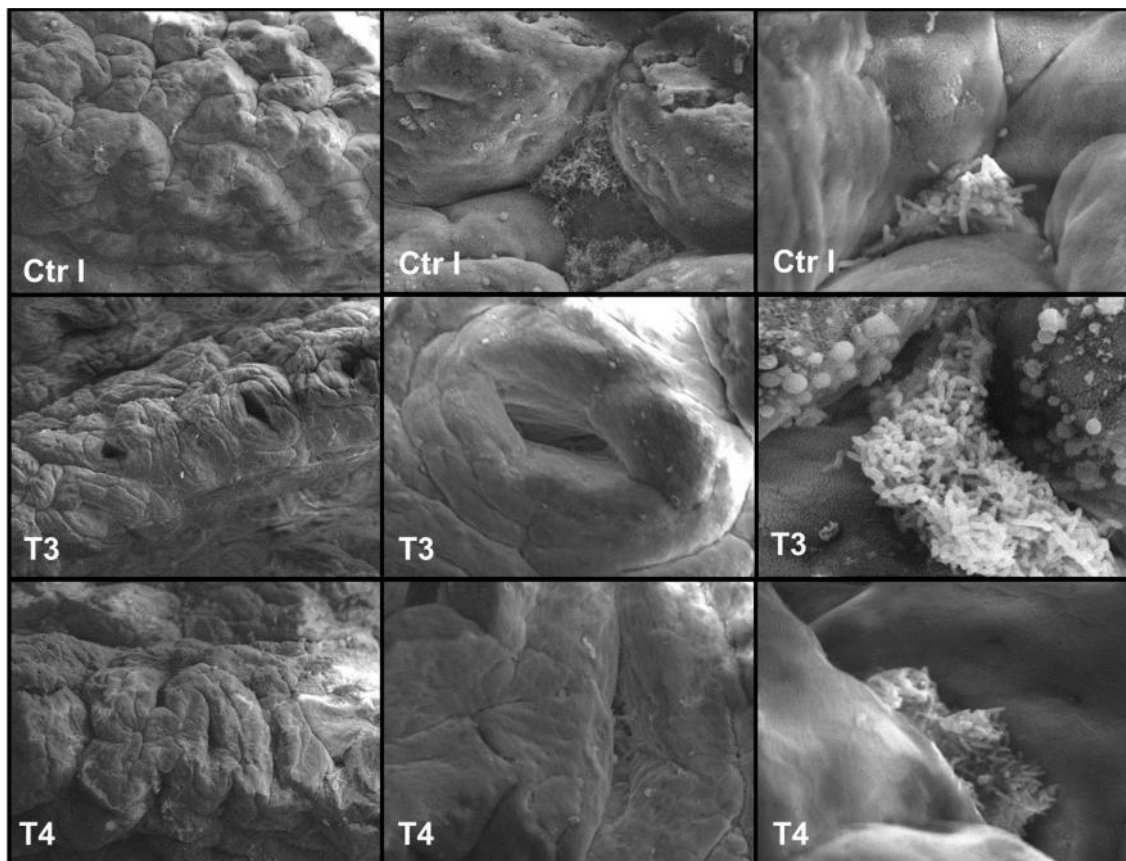


Figura 13 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 5 dias de idade. Tratamentos: Ctr I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. 400X, 1500X e 5000X.

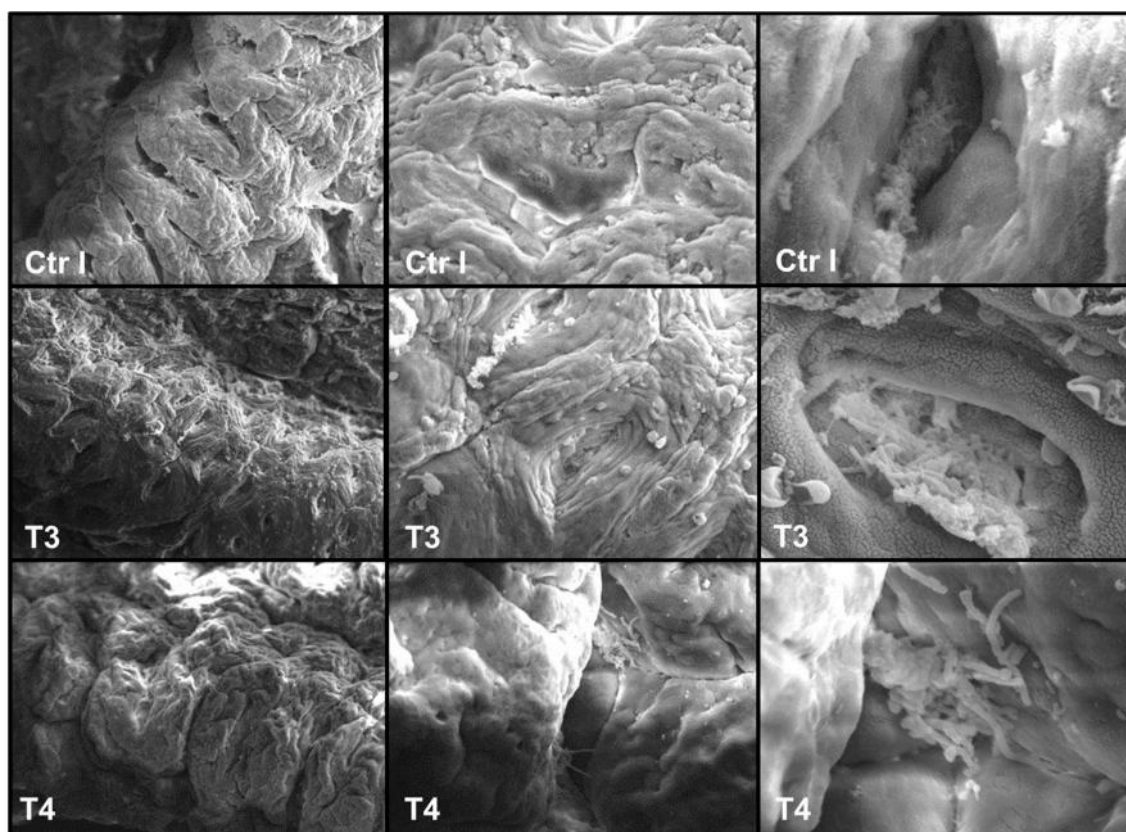


Figura 14 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 9 dias de idade. Tratamentos: Ctr I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. 400X, 1500X e 5000X.

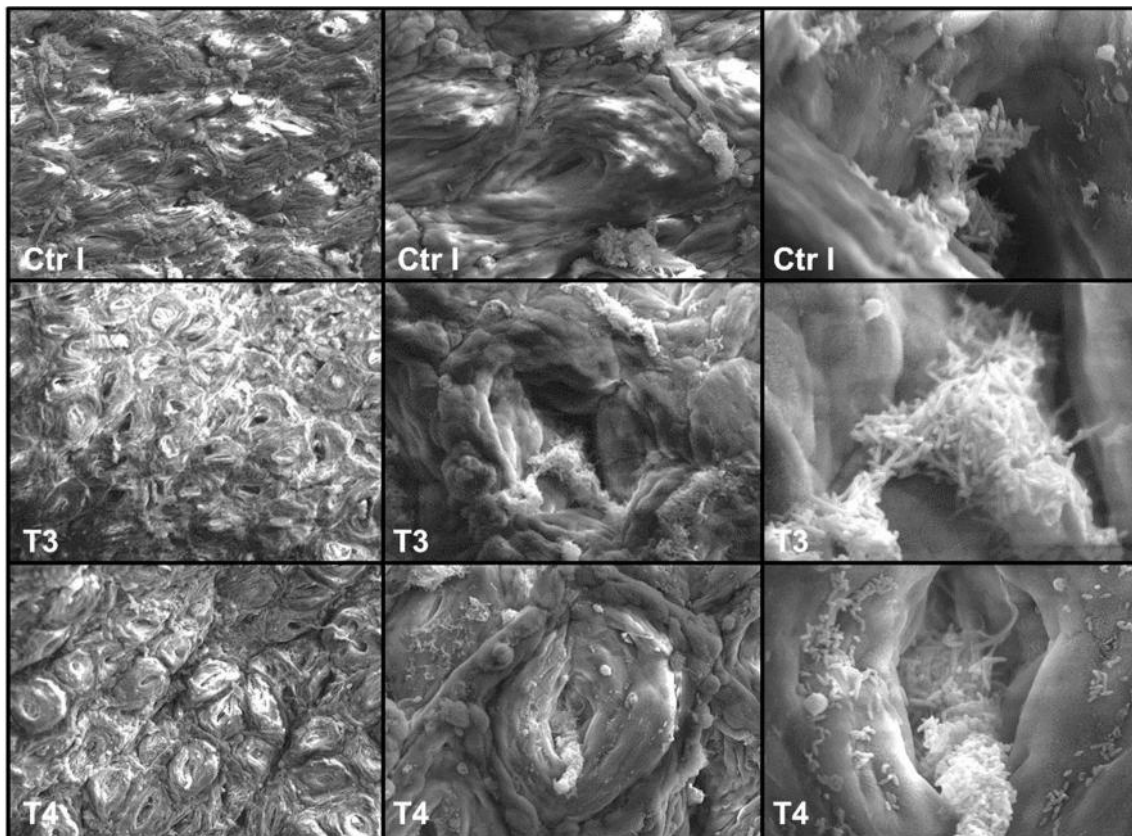


Figura 15 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 16 dias de idade. Tratamentos: Ctr I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. 400X, 1500X e 5000X.

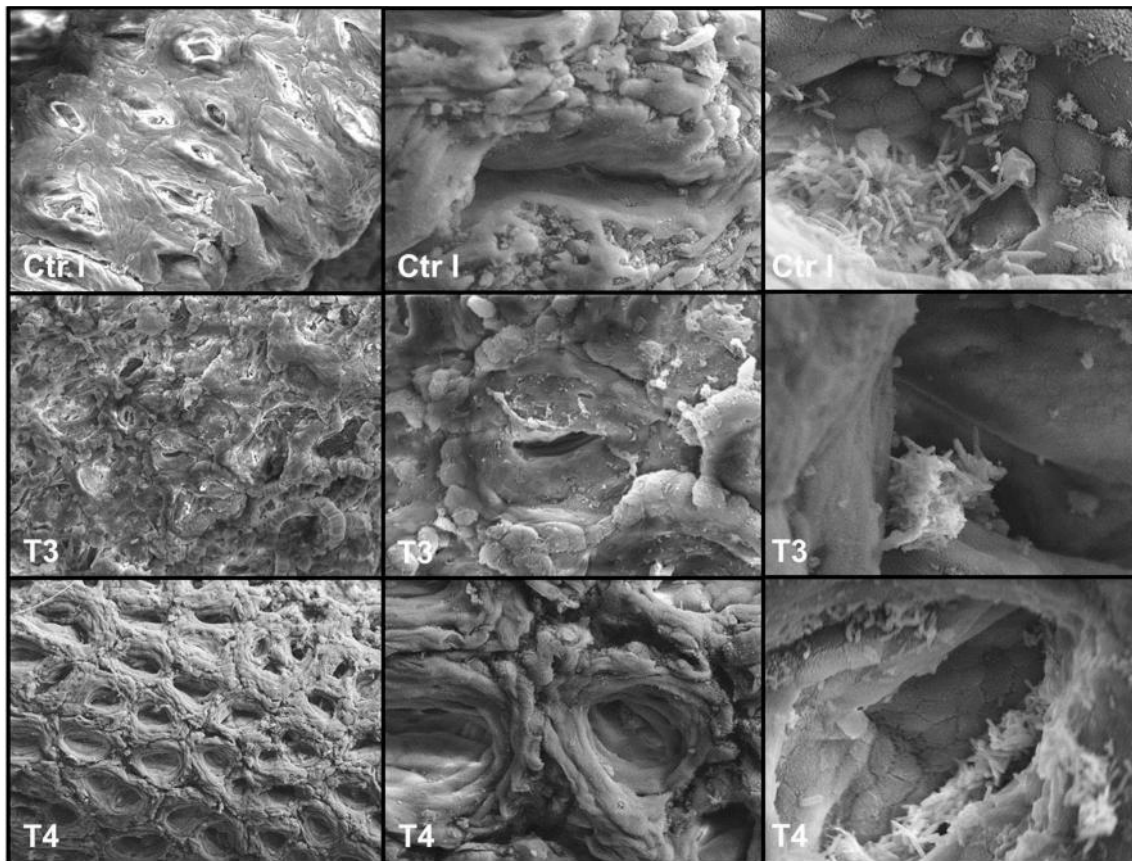


Figura 16 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 23 dias de idade. Tratamentos: Ctr I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. 400X, 1500X e 5000X.

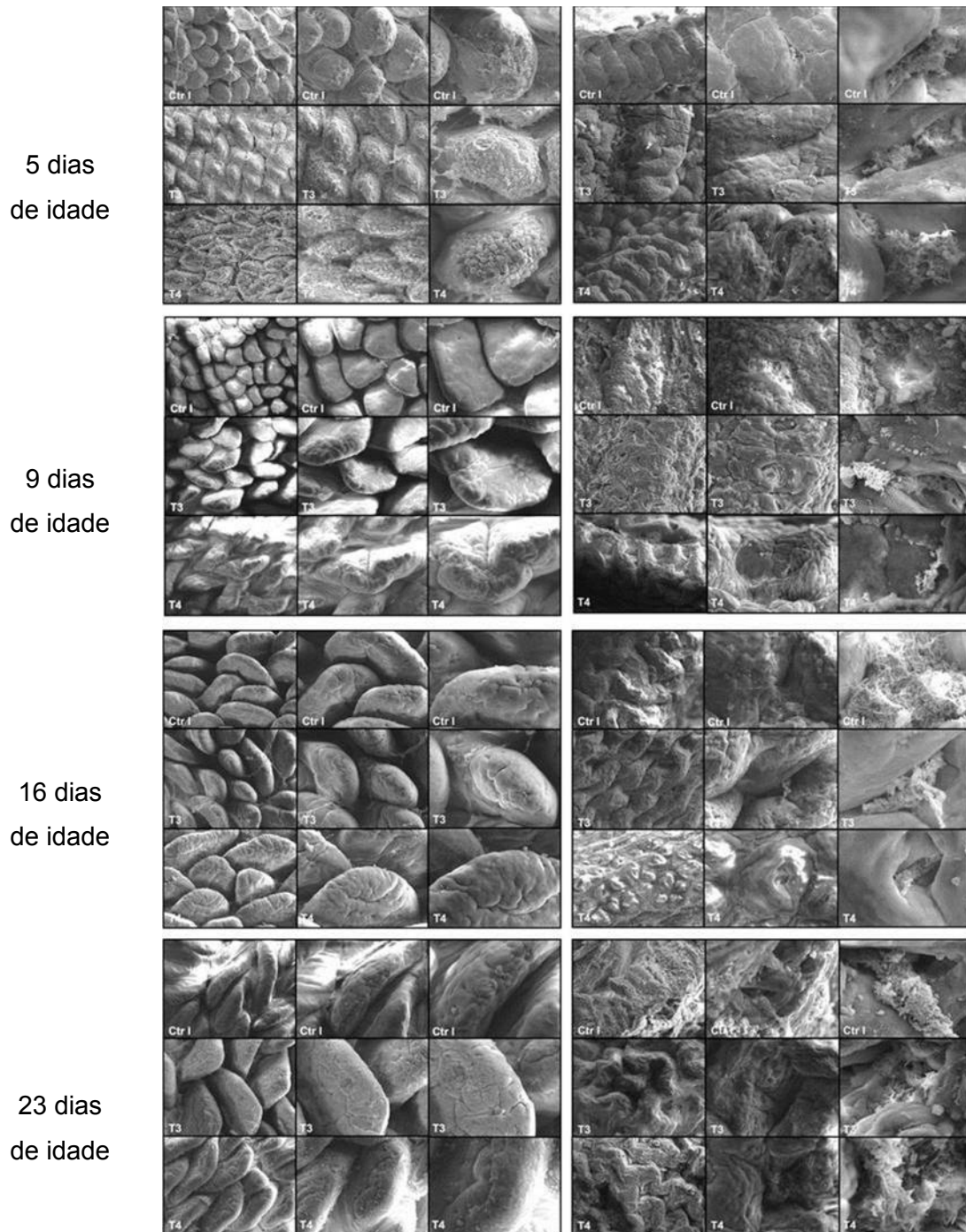


Figura 17- Fotomicrografia aos 5, 9, 16 e 23 dias de idade da mucosa ileal à esquerda e cecal à direita de frangos de corte que receberam desafio com *Salmonella* Heidelberg via intraesofágica. Tratamentos: Ctrl I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. Íleo: 400X, 800X e 1500X e ceco: 400X, 1500X e 5000X.

CONCLUSÃO

O probiótico utilizado no presente estudo melhora a integridade da mucosa entérica de frangos de corte nas diferentes idades estudadas, e quando submetido a desafio com *Salmonella* Heidelberg, mostra maior eficácia em estabelecer microbiota protetora capaz de preservar a ultraestrutura intestinal. Entre as vias de aplicação, a spray apresenta maior potencial de atuação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal – Relatório Anual 2018. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>>. Acesso em 10 jul. 2018.
- Adhikari, P. A., Kim, W.K. Overview of prebiotics and probiotics: focus on performance, gut health and immunity – a review. **Annals of Animal Science**, v.17, 2017.
- Ajuwon, K. M. Toward a better understanding of mechanisms of probiotics and prebiotics action in poultry species. **Journal Applied Poultry Research**, v.0, p.1-7, 2015.
- Al-Sagan A.A. & Abudabos A.M. Effect of a prebiotic, probiotic and symbiotic on performance of broilers under *Clostridium Perfringens* challenge. **Thai Journal Vet Med**, v.47, n.2, p.257-264, 2017.
- Behmer, O.A.; Tolosa, E.M.C.; Freitas Neto, A.G. Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica. 2.ed. Barueri: Editora Manole, p.331, 2003.
- Beski, S.S.M.; Al-Sardary, S,Y.T. Effects of dietary supplementation of probiotic and synbiotic on broiler chickens hematology and intestinal integrity. **International Journal Poultry Science**, v.14, p.31-36, 2015.
- Boleli, I. C.; Maiorka, A.; Macari, M. Estrutura funcional do trato digestório. In: Macari, M.; Furlan, R. L.; Gonzales, E. Fisiologia Aviária aplicada a frangos de corte. 2ª ed. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, p.75-95, 2002.

- Borsoi, A.; Santin, A.E.; Santos, L.R.; Salle, A.C.T.P.; Moraes, H.L.S.; Nascimento, A.V.P. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance, and pulsed field gel electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation, **Poultry Science**, v.88, p. 750–758, 2009.
- Caputo, L.F.G.; Gitirana, L.B.; Manso, P.P.A. Técnicas histológicas. In: Molinaro, E.M.; Caputo, L.F.G.; Amendoeira, M.R.R. Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratório de saúde. Rio de Janeiro: Escola Politecnica de Saúde Joaquim Venâncio, v.2, p. 89-188, 2010.
- Chichlowski, M.; Croom, W.J.; Edens, F.W.; McBride, B.W.; Qiu, R.; Chiang, C.C.; Daniel, L.R.; Havenstein, G.B.; Koci, M.D. Microarchitecture and spatial relationship between bacteria and ileal, cecal, and colonic epithelium in chicks fed a direct-fed microbial, primalac, and salinomycin. **Poultry Science**, v.86, p.1121–1132, 2007.
- Clavijo, V.; Flórez, M.J.V. The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review. **Poultry Science**, v.97, n.3, p.1006-1021, 2018.
- Cox, C.M.; Dalloul, R.A. Immunomodulatory role of probiotics in poultry and potential in ovoapplication. **Beneficial Microbes**, v.6, p.45–52, 2015.
- Decker, S.R.F.; Gomes, M.C. Análise do desempenho e participação da agricultura familiar na avicultura de corte na região sul do rio grande do sul / Brasil. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v.6, n.1, p.15-25, 2016.
- EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. **EFSA Journal**, n.12(2):3547, p.312, 2014.
- Fuller, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Microbiology**. v.66, n.5, p.365-378, 1989.

- Hume, M.E. Historic perspective: Prebiotics, probiotics, and other alternatives to antibiotics. **Poultry Science**, v.90, p.2663-2669, 2011.
- Laxminarayan, R.; Matsoso, P.; Pant, S.; Brower, C.; Rottingen, J.A.; Klugman, K.; Davies, S. Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. **The Lancet**, v.387, n.10014, p.168-175, 2015.
- Lei, X.; Piao, X.; Ru, Y.; Zhang, H.; Péron, A.; Zhang, H. Effect of *Bacillus amyloliquefaciens*-based Direct-fed Microbial on Performance, Nutrient Utilization, Intestinal Morphology and Cecal Microflora in Broiler Chickens. **Asian Australas. Journal Animal Science**, v.28, n.2, p.239-246, 2015.
- Lourenço, M.C.; Kuritza, L.N.; Westphal, P.; Miglino, L.B.; Pickler, L.; Kraieski, A.L.; Santin, E. Use of probiotics on the T cells activation and *Salmonella* Minnesota control in broiler chickens. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.1, p.11-14, 2013.
- Macari, M.; Lunedo, R.; Pedroso, A.A. Microbiota intestinal de aves. In: Macari, M.; Mendes, A.A., Menten, J.F.; Naas, I.A. Produção de frangos de corte. 2ª Ed. Campinas: FACTA, p.300-319, 2014.
- Manafi, M.; Khalaji, S.; Hedayati, M.; Pirany, N. Efficacy of *Bacillus subtilis* and bacitracin methylene disalicylate on growth performance, digestibility, blood metabolites, immunity, and intestinal microbiota after intramuscular inoculation with *Escherichia coli* in broilers. **Poultry Science**, v.96, n.5, p.1174–1183, 2017.
- Martins, B.B.; Mendes, A.A.; Martins, M.R.F.B.; Aguiar, E.F.; Alvarenga, B.O.; Lee, I.M. Efeito das diferentes vias de aplicação do probiótico sobre a integridade cecal em frangos de corte desafiados ou não com *Salmonella* Enteritidis. In: IV Congresso Sul Brasileiro de Avicultura, Suinocultura e Laticínios e Feira de equipamentos, serviços e inovação. 2014, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Federação das Indústrias do Estado do Rio Grande do Sul, 2014.
- Martins, B.B.; Mendes, A.A.; Martins, M.R.F.B.; Aguiar, E.F.; Alvarenga, B.O.; Lee, I.M. Eficácia de probiótico no desempenho, morfologia e integridade entérica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis. In: CONFERÊNCIA FACTA, 2015, Campinas. **Anais...** Facta: Campinas, 2015.

- Matias, T.D. Influência de probiótico sobre a saúde intestinal de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Heidelberg em diferentes tempos de jejum pós eclosão. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal de Goiás. p.73, 2016.
- Muniz, E.C. Salmonelas paratíficas em aves: avaliação da resposta imunológica e controle por meio de probióticos. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p.98, 2014.
- Oakley, B.B.; Buhr, R.F.; Ritz, C.W.; Kiepper, B.H.; Berrang, M.E.; Seall, B.S.; Cox, N.A. Successional changes in the chicken cecal microbiome during 42 days of growth are independent of organic acid feed additives. **BMC Veterinary Research**, v.10, p.282, 2014.
- OIE. Responsible and prudent use of antimicrobial agents in Veterinary Medicine. Terrestrial Animal Health Code. Chapter 6.9. 2017. Disponível em: www.oie.org.
- Oliveira, J.E.; Hoeven-Hangoor, E.; Linde, I.B.; Montijn, R. C.; Vossen, J. M. B. M. In ovo inoculation of chicken embryos with probiotic bacteria and its effect on posthatch *Salmonella* susceptibility, **Poultry Science**, v. 93, p. 818–829, 2014.
- Rahimi, S.; Grimes, J.L.; Fletcher, O.; Oviedo, E.; Sheldon, B.W. Effect of a direct-fed microbial (Primalac) on structure and ultrastructure of small intestine in turkey poults, **Poultry Science**, v. 88, p.491–503, 2009.
- Rocha, P.M.C.; Barros, M.E.G.; Evêncio-Neto, J. Análise morfométrica da parede intestinal e dinâmica de mucinas secretadas no jejuno de frangos suplementados com probiótico *Bacillus subtilis* cepa C3102. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v.36, n.4, p.312-316, 2016.
- Rostagno, H.S.; Albino, L.F.T.; Donzele, J.L.; Gomes, P.C.; Oliveira, R.F.; Lopes, D.C.; Ferreira, A.S.; Barreto, S.L.T.; Euclides, R.F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3. ed. Viçosa-MG: UFV, 252p, 2011.

- Shneitz, C.; Koivunen, E.; Tuunainen, P.; Valaja, J. The effects of a competitive exclusion product and two probiotics on *Salmonella* colonization and nutrient digestibility in broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, p.1-11. 2016.
- Silveira, M. Preparo de amostras biológicas para a Microscopia Eletrônica de Varredura. In: Souza, W. Técnicas básicas de Microscopia Eletrônica aplicada as Ciências Biológicas. Rio de Janeiro, p.33- 56, 1998.
- Statistical Analysis System. **SAS User's Guide**: Verson 9.2 Review Edition. SAS Institute Inc, Cary, NC, 2009.
- Sterzo, E.V. Morfologia dos cecos de pintos de corte submetidos ao tratamento com microbiota cecal antes e após infecção por *Salmonella enteritidis*. 2011. 98 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011.
- Teague, K. D.; Graham, L. E.; Dunn, J. R.; Cheng, H. H.; Anthony, N.; Latorre, J.D.; Menconi, A.; Wolfenden, R.E.; Wolfenden, A.D.; Mahaffey, B.D.; Baxter, M.; Hernandez-Velasco, X.; Merino-Guzman, R.; Bielke, L.R.; Hargis, B.M.; Tellez, G. *In ovo* evaluation of FloraMax[®]-B11 on Marek's disease HVT vaccine protective efficacy, hatchability, microbiota composition, morphometric analysis, and *Salmonella enteritidis* infection in broiler chickens. **Poultry Science**, v.96, p.2074–2082, 2017.
- Vineetha, P.G.; Tomar, S.; Saxena, V.K.; Kapgate, M.; Suvarna, A.; Adil, K. Effect of laboratory-isolated *Lactobacillus plantarum* LGFCP4 from gastrointestinal tract of guinea fowl on growth performance, carcass traits, intestinal histomorphometry and gastrointestinal microflora population in broiler chicken. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.101, p. e362–e370, 2017.
- Wang, X.; Farnell, Y. Z.; Peebles, E.D.; Kiess, A.S.; Wamsley, K.G.S.; Zhai, W. Effects of prebiotics, probiotics, and their combination on growth performance, small intestine morphology, and resident *Lactobacillus* of male broilers. **Poultry Science**, v.95, p.1332–1340, 2016.

Zhang, L.; Zhang, L.; Yang, C.; Zhan, X.; Zeng, X.; Zhou, L.; Cao, G.; Chen, An'guo. Effects of dietary supplementation of probiotic, *Clostridium butyricum*, on growth performance, immune response, intestinal barrier function, and digestive enzyme activity in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.7, n.3, 2016.

Zhen, W.; Shao, Y.; Gong, X.; Wu, Y.; Geng, Y.; Wang, Z.; Guo, Y. Effect of dietary *Bacillus coagulans* supplementation on growth performance and immune responses of broiler chickens challenged by *Salmonella* Enteritidis. **Poultry Science**, p.119, 2018.

CAPÍTULO 4

IMPLICAÇÕES

A avicultura é atualmente o mais eficiente sistema produtivo animal de produção global de proteína. Essa projeção mundial se deve aos avanços tecnológicos e científicos em áreas como a nutrição, genética e sanidade avícola. Contudo, com o objetivo de redução dos custos de produção e maior produtividade, o setor avícola tem se estruturado com alta densidade de alojamento de frangos e seleção genética precoce. Estes dois pontos, somados a outros, que influem e desafiam a sanidade das aves, como falhas nos programas de biossegurança e negligência de notificações de enfermidades, comprometem o bom desempenho zootécnico da produção por interferirem na saúde das aves.

A manutenção da integridade gastrointestinal é um dos fatores de maior dificuldade na cadeia avícola, devido ao grande número de fatores predisponentes envolvidos. Assim, a seleção de microbiota benéfica desempenha papel importante na produção, saúde, proteção contra patógenos e modulação do sistema imunológico.

A possibilidade de modular a microbiota intestinal, com o uso racional dos probióticos contribui com os efeitos benéficos já criados pela natureza, tornou-se uma alternativa para a proibição dos antibióticos como aditivos alimentares para promoção do crescimento dos animais de produção.

Os probióticos atualmente destacam-se como estratégias para (i) modular a microbiota intestinal a fim de promover a manutenção da saúde das aves, (ii) em condições adversas ser capaz de realizar a regeneração da mucosa intestinal pós infecção, (iii) fortalecer o sistema imune e aumento dos mecanismos de defesa das aves.

Os resultados do presente trabalho mostraram que o probiótico foi eficaz em desempenhar sua ação trófica na colonização intestinal, por meio da manutenção da integridade da mucosa entérica e redução de *Salmonella* Heidelberg em frangos de corte nas diferentes idades estudadas. O probiótico também mostrou maior eficácia em estabelecer microbiota protetora capaz de preservar a ultraestrutura intestinal em condição de desafio com *Salmonella* Heidelberg. Quando comparado via de aplicação, ambas as vias estudadas são viáveis, no entanto a aplicação via spray apresentou maior potencial de atuação.

Desta forma, os probióticos destacam-se como importante aliado para manutenção da saúde intestinal por exclusão competitiva, assim novos estudos com diferentes doses, outras vias de aplicação, diferentes linhagens bem como a combinação de probióticos com outros agentes tróficos devem ser estudados visando

combater a *Salmonella* spp. e outras infecções bacterianas intestinais em frangos de corte.