

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU**

**AVALIAÇÃO DE PROBIÓTICO E GLUTAMINA *IN OVO* EM FRANGOS
DE CORTE DESAFIADOS COM *SALMONELLA* HEIDELBERG**

CAMILA DE SOUZA ORO

**Botucatu – SP
2021**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DE PROBIÓTICO E GLUTAMINA *IN OVO* EM FRANGOS
DE CORTE DESAFIADOS COM *SALMONELLA* HEIDELBERG**

CAMILA DE SOUZA ORO

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Raphael Lúcio Andreatti Filho
Coorientador(a): Prof.^a Dr^a Elisane Lenita Milbradt

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Oro, Camila de Souza.

Avaliação de probiótico e glutamina *in ovo* em frangos de corte desafiados com *Salmonella* Heidelberg / Camila de Souza Oro. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Raphael Lúcio Andreatti Filho

Coorientador: Elisane Lenita Milbradt

Capes: 50503014

1. Salmonelose em frango de corte. 2. *Salmonella*. 3. Aves domésticas. 4. Probióticos. 5. Intestinos - Doenças.

Palavras-chave: Avicultura; Incubação; Salmonelose; Saúde intestinal.

Camila de Souza Oro

AVALIAÇÃO DE PROBIÓTICO E GLUTAMINA *IN OVO* EM FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM *SALMONELLA* HEIDELBERG

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Raphael Lúcio Andreatti Filho

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Adriano Sakai Okamoto

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Alexandre Hataka

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Edir Nepomuceno da Silva

Membro

Departamento de Tecnologia de Alimentos

Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP – Campinas

Profa. Dra. Ana Angelita Sampaio Baptista

Membro

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UEL – Londrina

05 de novembro de 2021.

"Tudo parece impossível até que seja feito".

Nelson Mandela

"Enquanto não souber pensar, a mulher será instrumento passivo em favor das instituições do passado. E ela própria, inconsequente, trabalhará para a sua escravidão".

Maria Lacerda de Moura

OFEREÇO

A minha família, pelo suporte e incentivo.

DEDICO

Ao meu pai Pedro João Oro,

*pelo seu exemplo de profissional que me direciona
diariamente.*

AGRADECIMENTOS

A minha família, que com muito carinho e apoio não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao Professor e Orientador Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho, pela orientação e oportunidade concedida.

A minha coorientadora Elisane Lenita Milbradt pela orientação, ajuda e paciência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela concessão da bolsa de estudos – Número do processo: 170179/2018-4.

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

Ao Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu, pela oportunidade de realização deste trabalho.

A empresa Ghenvet pelo fornecimento de materiais, aditivos e recursos.

A empresa C.Vale pelo fornecimento dos pintainhos e permissão para realização de uma das etapas do experimento.

Ao meu companheiro Ewerton Henrique Alves Silva De Santana pela ajuda e apoio emocional.

Aos colegas do Laboratório de Ornitopatologia Ana Carolina Izidoro de Moraes, Cauê Bastos Tertuliano dos Santos, Gabriella Costa Ribeiro, Larissa Justino, Tais Gomes Coletti e aos colegas da Produção Animal Caio Ouros e Gustavo Henrique Chaves pela imprescindível e fundamental ajuda na execução do experimento e durante o curso.

Ao Professores da FMVZ/UNESP – Botucatu, Dr. Adriano Sakai Okamoto e Dr. Alexandre Hataka, pela colaboração na execução do experimento.

A todos que contribuíram de alguma forma para a execução desse trabalho e não foram citados nominalmente, muito obrigada!

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Parâmetros avaliados após tratamentos <i>in ovo</i> e desafio com <i>Salmonella</i> Heidelberg (SH).....	29
Tabela 2.	Média e desvio padrão da quantidade de bactérias totais do conteúdo digestório de embriões antes e após administração <i>in ovo</i> dos tratamentos. Resultados inversamente proporcionais a quantidade de DNA presente na amostra.....	34
Tabela 3.	Quantidade em log 10 de UFC/mL de <i>Salmonella</i> Heidelberg (SH) nos cecos de aves tratadas <i>in ovo</i> e experimentalmente desafiadas com SH.....	35
Tabela 4.	Quantidade em log 10 de UFC/mL de <i>Salmonella</i> Heidelberg (SH) no inglúvio de aves tratadas <i>in ovo</i> e experimentalmente desafiadas com SH.....	35
Tabela 5.	Média e desvio padrão do peso corporal das aves, comprimento relativo e peso relativo do intestino de aves tratadas <i>in ovo</i> e experimentalmente desafiadas com <i>Salmonella</i> Heidelberg.....	41
Tabela 6.	Média e desvio padrão da altura dos vilos e profundidade das criptas, em micrômetros, no duodeno, jejuno e íleo de aves tratadas <i>in ovo</i> após três do desafio experimental com <i>Salmonella</i> Heidelberg (SH).....	42
Tabela 7.	Média e desvio padrão da altura dos vilos e profundidade das criptas, em micrômetros, no duodeno, jejuno e íleo de aves tratadas <i>in ovo</i> após 21 do desafio experimental com <i>Salmonella</i> Heidelberg (SH).....	43
Tabela 8.	Média e desvio padrão da quantidade de <i>Lactobacillus</i> spp. nos cecos de aves tratadas <i>in ovo</i> e experimentalmente desafiadas com <i>Salmonella</i> Heidelberg (SH).....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Carrinho de ovos antes da incubação: marcação em vermelho indica as bandejas selecionadas para tratamento experimental.....	24
Figura 2.	Corte histológico do íleo. Mensuração da altura do viló (A) e da profundidade da cripta (B) de frango de corte que recebeu probiótico <i>in ovo</i> após três dias do desafio com a <i>Salmonella</i> Heidelberg. Objetiva 5x.....	31
Figura 3.	Percentual de eclodibilidade de aves tratadas <i>in ovo</i>	33
Figura 4.	Quantidade de SH nos cecos de aves que receberam os tratamentos <i>in ovo</i> nos diferentes períodos avaliados.....	36
Figura 5.	Mediana em log 10 de UFC/mL de <i>Salmonella</i> Heidelberg (SH) os cecos de frangos que receberam glutamina <i>in ovo</i> conforme os dias após desafio com a SH.....	37
Figura 6.	Média em log 10 de UFC/mL de <i>Salmonella</i> Heidelberg (SH) nos cecos de frangos que receberam probiótico e glutamina <i>in ovo</i> conforme os dias após desafio com a SH.....	37
Figura 7.	Mediana em log 10 de UFC/mL de <i>Salmonella</i> Heidelberg (SH) nos cecos de frangos que receberam probiótico + glutamina <i>in ovo</i> conforme os dias após desafio com a SH.....	38
Figura 8.	Mediana em log 10 de UFC/mL de <i>Salmonella</i> Heidelberg (SH) nos cecos de frangos não tratados <i>in ovo</i> conforme os dias após desafio com a SH.....	39
Figura 9.	Mediana em log 10 de UFC/mL de <i>Salmonella</i> Heidelberg (SH) nos cecos de frangos que não receberam aditivo <i>in ovo</i> conforme os dias após desafio com a SH.....	39
Figura 10.	Mediana em log 10 de UFC/mL de <i>Salmonella</i> Heidelberg (SH) no ingluvío de frangos que receberam probiótico <i>in ovo</i> conforme os dias após o desafio com SH.....	40
Figura 11.	Mediana em log 10 de UFC/mL de <i>Salmonella</i> Heidelberg (SH) no ingluvío de frangos não tratados <i>in ovo</i> conforme os dias após desafio com a SH.....	40

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
REVISÃO DE LITERATURA	15
<i>Taxonomia, patogenia e epidemiologia da Salmonella spp.</i>	15
<i>Saúde e microbiota intestinal das aves</i>	17
<i>Probiótico: contexto histórico e conceitos</i>	19
<i>Glutamina e probiótico in ovo</i>	20
OBJETIVO GERAL	22
<i>Objetivos específicos</i>	22
MATERIAL E MÉTODOS	23
<i>Delineamento experimental - etapa A</i>	23
<i>Ovos e instalações</i>	24
<i>Parâmetros avaliados na etapa A</i>	25
<i>Eclodibilidade</i>	25
<i>Quantificação molecular de bactérias totais</i>	26
<i>Delineamento experimental - etapa B</i>	27
<i>Cepa de Salmonella Heidelberg e desafio experimental</i>	27
<i>Parâmetros avaliados na etapa B</i>	28
<i>Análise microbiológica – Quantificação das colônias de Salmonella Heidelberg</i>	29
<i>Análise biométrica do intestino</i>	30
<i>Análise morfológica da mucosa intestinal – Mensuração de vilos e criptas</i>	30
<i>Quantificação molecular de Lactobacillus spp.</i>	31
<i>Análise estatística</i>	32
RESULTADOS	33
DISCUSSÃO	44

CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
TRABALHO CIENTÍFICO.....	65

RESUMO - ORO, C. S. **Avaliação de probiótico e glutamina *in ovo* em frangos desafiados com *Salmonella Heidelberg***. Botucatu, 2021. 96p. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

A *Salmonella Heidelberg* (SH) é uma bactéria que resulta em grande prejuízo econômico à produção avícola brasileira e, o uso não adequado de antibióticos na criação das aves pode induzir a seleção de cepas resistentes. Desta forma, produtos naturais são alternativas para substituição de antibióticos, contribuindo também para a manutenção da saúde intestinal das aves. O objetivo do estudo foi avaliar a eclodibilidade e o efeito profilático de um probiótico com cinco cepas de *Lactobacillus reuteri* e da glutamina *in ovo* em frangos de corte desafiados com SH. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com sete tratamentos. Os ovos foram vacinados *in ovo* com os aditivos avaliados (probiótico, glutamina e antibiótico) misturados à vacina para a doença de Marek e Gumboro. O desafio com SH ocorreu 24 horas após o alojamento e cada ave recebeu 0,5 mL do inóculo com SH contendo 4×10^6 UFC/mL. Os parâmetros avaliados foram: quantificação molecular de bactérias totais e de *Lactobacillus spp.*, eclodibilidade, quantificação das colônias de SH, análise biométrica do intestino e análise morfológica da mucosa intestinal. Os dados foram submetidos a análise de variância, teste de Tukey e Dunn com nível de significância de 5%. Todos os tratamentos que receberam glutamina *in ovo* apresentaram melhor eclodibilidade que o grupo controle. Os embriões que receberam o tratamento com probiótico + glutamina obtiveram maior quantidade de bactérias totais no trato digestório do que aqueles que receberam antibiótico. O tratamento com o probiótico, associado ou não com a glutamina, apresentou menor quantidade de SH quando comparado com os demais tratamentos. Após três dias do desafio o tratamento que recebeu o probiótico apresentou maior altura de vilo e maior profundidade de cripta no duodeno jeuno e íleo comparado ao tratamento que recebeu o antibiótico. Portanto, a glutamina *in ovo* melhora a eclodibilidade e, o probiótico *in ovo* reduz a quantidade de SH, além de aumentar a altura de vilo e a profundidade de cripta em frangos de corte.

Palavras-chave: avicultura, incubação, saúde intestinal, salmonelose

ABSTRACT - ORO, C. S. **Evaluation of probiotic and glutamine *in ovo* in broilers challenged with *Salmonella* Heidelberg**. Botucatu, 2021. 96p. Thesis (Ph.D.) Departamento of Clinical Veterinary Medicine Animal, College of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP) "Júlio de Mesquita Filho". Botucatu, São Paulo, Brazil.

Salmonella Heidelberg (SH) is a bacterium that causes great economic damage to Brazilian poultry production and, the indiscriminate use of antibiotics in poultry farming may induce the selection of resistant strains. In this way, natural products are alternatives for replacing antibiotics, also contributing to the maintenance of the intestinal health of birds. Thus, the objective of the experiment was to evaluate the hatchability and the effect of probiotic with five strains of *Lactobacillus reuteri* and glutamine *in ovo* in broiler chickens exposed to SH. The experimental design was completely randomized with seven treatments. The *in ovo* treatments evaluated (probiotic, glutamine, and an antibiotic) were mixed with the vaccine against Marek and Gumboro disease. The exposure to SH occurred 24 hours after chick placement and each chick received 0.5 mL of the inoculum with SH containing 4×10^6 UFC/mL. The parameters evaluated were: molecular quantification of total bacteria and *Lactobacillus spp.*, hatchability, quantification of SH colonies, biometric analysis of the intestine and morphological analysis of the intestinal mucosa. Data was subjected to analysis of variance, Tukey, and Dunn test, with a significance level of 5%. All treatments that received glutamine *in ovo* showed better ability to hatch. Embryos that received the treatment with probiotic + glutamine had a greater number of total bacteria in the digestive tract than those that received antibiotics. The treatment with the probiotic, associated or not, with glutamine, showed a lower amount of SH when compared to the other treatments. Three days after exposure, the treatment that received the probiotic showed greater villus height and greater crypt depth in the duodenum, jejunum, and ileum compared to the treatment that received the antibiotic. Therefore, glutamine *in ovo* improves the hatchability and probiotic *in ovo* reduces the amount of SH, in addition to increasing the villus height and crypt depth in broilers.

Key words: broiler, gut health, hatching, salmonellosis.

INTRODUÇÃO

A *Salmonella* spp. é uma bactéria de difícil controle e frequentemente encontrada na indústria avícola brasileira, resultando em grande prejuízo econômico devido a embargos nas exportações, eliminação das aves e descarte de produtos. Além de alguns sorotipos, como a *Salmonella* Heidelberg (SH), representarem risco à saúde pública por resultarem em doença transmitida por alimento (DTA).

No Brasil os surtos alimentares ainda são subdiagnosticados e, frequentemente são notificados somente aqueles que acometem grande número de pessoas ou quando os sintomas têm um período de duração maior. Conforme os dados do Ministério da saúde (2021), durante os anos de 2007 a 2019, foram notificados 9.030 surtos de DTA no Brasil e, desses surtos notificados, 3.275 (36,27%) tiveram a identificação de agente etiológico, sendo que a *Salmonella* spp. foi a responsável por 24,8% dos casos.

Com o intuito de prevenir e controlar a contaminação por patógenos entéricos, como a *Salmonella* spp., as empresas avícolas utilizam com frequência antimicrobianos. Entretanto, seu uso não adequado pode induzir a seleção de microrganismos resistentes.

Nesse contexto, os produtos naturais surgiram como alternativa valiosa para a substituição de antimicrobianos na avicultura, por meio da manutenção da saúde intestinal. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a eclodibilidade e o efeito profilático de probiótico e glutamina *in ovo* em frangos desafiados com *Salmonella* Heidelberg.

REVISÃO DE LITERATURA

Taxonomia, patogenia e epidemiologia da Salmonella spp.

A *Salmonella spp.* é um bacilo Gram negativo que pertence à família Enterobacteriaceae, subespécie e espécie Entérica (ANDREATTI FILHO, 2007). A designação do gênero foi adotada em 1900, por Lignières, em homenagem a Daniel Salmon, o qual isolou pela primeira vez o microrganismo de suínos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

A divisão do gênero *Salmonella spp.* ocorre de acordo com suas características bioquímicas. Já, a identificação dos sorovares é feita através do esquema de Kauffmann-White-Le Minor, baseado nas diferenças encontradas em certas estruturas antigênicas, somáticos (O) e flagelares (H), na superfície da célula (GRIMONT e WEILL, 2007).

Por ser uma bactéria mesófila (SILVA et al., 2007) e termo sensível, (podendo ser destruída a 60°C, em 15 a 20 minutos) (FORSHYTE, 2013), a contaminação em seres humanos geralmente ocorre pela ingestão de alimentos não cozidos ou contaminação cruzada da carne crua com alimentos consumidos sem cozimento (DIANIN, 2016).

A dose infectante da bactéria no organismo humano varia de 10^5 a 10^8 células. Porém, em pacientes imunocomprometidos, têm sido observadas doses menores (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Já, a patogenicidade da *Salmonella spp.* inclui a presença de proteínas de parede (lipopolissacárideo - LPS), responsáveis pela fixação e penetração no intestino do hospedeiro e liberação de enterotoxinas (SILVA, 2017). A colonização bacteriana danifica a integridade intestinal, afetando as vilosidades e criptas intestinais, causando manifestação clínica que inclui quadros entéricos agudos ou crônicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

A capacidade de sobrevivência no interior dos macrófagos facilita sua disseminação sistêmica, podendo atingir outros órgãos como fígado e baço (CHAPELL, 2009), causando infecções septicêmicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Hofer et al. (1997) relataram que no Brasil a bactéria *Salmonella* Heidelberg foi uma das principais causadoras de surtos alimentares entre os sorovares que

causam a salmonelose em humanos. Pulido-Landínez et al. (2013) isolaram o sorovar Heidelberg em 46% das amostras em um estudo na região sul do Brasil, apresentando-se como o sorovar de maior predominância.

As aves ocupam o ponto central na epidemiologia da Salmonelose (CORY et al., 2002), representando uma fonte de infecção de grande importância sanitária, porém, de difícil controle, principalmente devido à alguns sorotipos não ocasionarem sinais clínicos nas aves (ANDREATTI FILHO, 2007).

A contaminação das aves ocorre através de subprodutos de origem animal, fômites, e carreadores biológicos (ROCHA et al., 2003). Uma vez que um animal infectado pode eliminar a bactéria em grande número nas fezes, contaminando o ambiente no qual a bactéria possui sobrevivência longa, podendo resistir mais de 28 meses nas fezes de aves (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Além da transmissão horizontal, pode ocorrer também a transmissão vertical (BERCHIERI JÚNIOR et al., 2009) pela presença da bactéria nos folículos ovarianos da reprodutora (CARDOSO e TESSARI, 2008), levando a contaminação do pintainho antes mesmo do nascimento.

Na criação de frango de corte, o momento sanitário mais crítico é o jejum pré-abate pelo maior consumo de cama contaminada nessa fase, tendo o agravante da diminuição da imunidade devido ao estresse causado pelo manejo pré-abate, facilitando a entrada do patógeno no organismo da ave (ORO et al., 2020).

No abatedouro, o risco de contaminação continua alto devido à contaminação cruzada que pode ocorrer em algumas etapas como escaldagem, depenagem e resfriamento (GONZALEZ-MIRET et al., 2006; VON RÜCKERT et al. 2009).

Desta forma, medidas devem ser tomadas, desde a criação das aves, para prevenir a contaminação do produto e assim, evitar surtos alimentares e prejuízos econômicos para a indústria avícola brasileira.

Saúde e microbiota intestinal das aves

A saúde intestinal é essencial para garantir bom desempenho das aves e depende, principalmente, de três fatores que estão interligados: integridade física da mucosa, microbiota equilibrada e a modulação da resposta imunológica local (ROCHA et al., 2016).

A resposta imunológica intestinal inicia-se através de células apresentadoras de antígenos ou células fagocíticas (células M, heterófilos e células *natural killer*) que estão entremeadas nos enterócitos (BEAL et al., 2006). Em estreita proximidade com essas células, com diferentes graus de organização, estão folículos ricos em linfócitos (BORGES & BONATO, 2019). Além desses folículos, as aves possuem tonsilas cecais e a bursa de fabrícius que também auxiliam na resposta imunológica intestinal das aves frente à desafios (LEE et al. 2010).

Quando vencidas as defesas imunológicas do intestino e as barreiras físicas, como renovação de enterócitos, pH, motilidade e muco (LOURENÇO et al. 2013), agentes patogênicos podem ocasionar atrofia de vilos além de alcançar a corrente sanguínea, levando a complicações ainda mais graves para a saúde da ave (GOLDER et al., 2011).

Desta forma, a microbiota equilibrada pode também auxiliar na proteção da mucosa intestinal, por meio de diversos mecanismos. Entre eles, destaca-se a imunoestimulação indireta, quando bactérias benéficas são reconhecidas por células imunológicas adaptativas, através da manutenção da tolerância imunológica, criando resposta de memória mais rápida e eficiente à bactérias patogênicas que possam se multiplicar de forma acelerada (LEE et al. 2010).

Contudo, para buscarmos ferramentas que possam contribuir com a manutenção da eubiose intestinal (equilíbrio da microbiota) é importante a compreensão sobre os mecanismos que mantêm a funcionalidade do microbioma intestinal (MORAES, 2019).

A colonização bacteriana natural nas aves ocorre antes mesmo de seu nascimento por via vertical (transovariana) ou através dos poros da casca (PEDROSO et al., 2008). O número e composição dos microrganismos variam consideravelmente ao longo do sistema digestório e da idade das aves (MACARI et al. 2014). No embrião, a microbiota presente no TGI (trato gastrointestinal) é

de baixa quantidade e diversidade (predominância de *Lactobacillus* spp. >50%) (LU et al., 2003), sendo maior no trato digestório superior e progredindo para o ceco onde se estabelece após a primeira semana de idade (OLIVEIRA et al., 2014). Somente após os 30 dias de idade da ave, considera-se que as comunidades estão atingindo a maturidade (MACARI et al., 2014).

As condições de pH ácido no papo, pro-ventrículo e moela permite a colonização por *Lactobacillus* spp. e outras bactérias ácido-láticas (GONG et al., 2007). No intestino delgado, apesar da alta concentração salina e grande variação do pH no lúmen, este segmento apresenta uma camada de muco extremamente espessa e, dentro desta camada permite a colonização bacteriana (LU et al., 2003). Entretanto, a concentração bacteriana nessa região é baixa e há predominância dos *Lactobacillus* (70-94%), podendo incluir alguns Clostridiales e enterobactérias em números menores (BJERRUM et al., 2006; GONG et al., 2007; NAKPHAICHIT et al., 2011). No ceco predomina-se as bactérias Clostridiales (46-68%), seguido pelas Eubacterias (15-22%), e baixas populações de *Lactobacillus* spp. e *Bacteroides* (até 10%) (MACARI et al. 2014).

As bactérias intestinais podem encontrar-se, tanto no epitélio, como livres na luz intestinal. Aquelas livres devem multiplicar-se rapidamente para compensar a eliminação pelo peristaltismo intestinal (OAKLEY et al., 2014). Para se manter em equilíbrio populacional, as bactérias interagem entre si, essa “comunicação” é conhecida como *Quorum sensing* e ocorre por meio da produção de substâncias, como peptídeos ativos (bacteriocinas) que inibem ou estimulam o desenvolvimento de outras (MORAES, 2019). Nas Gram-negativas, a molécula sinalizadora (ou auto indutora) mais comum é uma acil homoserina lactona. Já, nas bactérias Gram-positivas, um pré-peptídeo é clivado em um oligopeptídeo sinalizador funcional de 10-12 aminoácidos (MACARI et al., 2014).

Além do equilíbrio da microbiota intestinal, fontes energéticas também podem auxiliar na manutenção da saúde intestinal (GIVISIEZ et al., 2020). A renovação celular constante e a produção de muco no intestino necessitam de alto gasto energético. Esse gasto é ainda maior frente a um desafio em que ocorre a destruição dos enterócitos (GOLDER et al., 2011). Portanto, alguns aminoácidos, como a glutamina, podem suprir esse custo energético. A glutamina é um aminoácido não essencial que contribui para a redução do

catabolismo proteico fornecendo carbono para gliconeogênese (MAIORKA, 2004).

Além disso, a glutamina é um importante agente trófico, estimulante da renovação celular, por meio da indução da enzima ODC (ornitina-decarboxilase) e produção de poliaminas importantes no processo de proliferação celular (MAIORKA, 2004). A glutamina pode também ser hidrolisada em glutamato, agindo como um imunomodulador, inibindo citocinas pró-inflamatórias, protegendo a mucosa da resposta imunológica exacerbada e mudanças de pH (SUINOCULTURA INDUSTRIAL, 2018).

Contudo, saúde intestinal é um tema complexo e novos estudos podem contribuir ainda mais na compreensão do funcionamento do microbioma intestinal e, principalmente, da relação deste com outros sistemas do organismo das aves.

Probiótico: contexto histórico e conceitos

A incidência de resistência bacteriana a antimicrobianos representa risco à saúde única, conceito que integra o ser humano, animal e ambiente como fatores interdependentes (OGAWA et al., 2019). Alguns sorovares de *Salmonella* spp., por exemplo, possuem caráter zoonótico e, já demonstraram resistência à alguns princípios ativos como à fluoroquinolona, com o percentual de resistência elevando-se de 17% na década de 1970 para 31% ao final dos anos 1980 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Devido a esse contexto de resistência antimicrobiana, na União Européia desde 2006, não é permitido o uso de qualquer antimicrobiano promotor de crescimento, sendo permitido somente o uso de antibióticos e quimioterápicos com finalidade terapêutica (GONZALES et al., 2012).

Além disso, devido à preocupação de alguns consumidores com resquícios de antibióticos na carne, bem-estar das aves e meio ambiente, sistemas de produção alternativos, com redução ou restrição de produtos químicos, estão ganhando expressividade econômica (AVILA & SOARES, 2010).

Buscando atender essa nova tendência e as restrições dos mercados internacionais, iniciou-se a produção e comercialização de produtos naturais,

como probióticos e prebióticos para suprir a necessidade de prevenção contra bactérias patogênicas como a *Salmonella* spp. (ANADÓN et al., 2006).

Existem algumas diferenças conceituais e funcionais entre prebióticos, probióticos e simbióticos. Para que seja considerado prebiótico, a substância não pode ser hidrolisada no sistema digestório e deve ter ação seletiva somente para um limitado número benéfico de bactérias comensais, as quais terão crescimento e metabolismo estimulados. Geralmente os prebióticos são fornecidos juntamente com os probióticos (simbióticos), para melhorar o desempenho do produto (KURITZA, 2014). Já, os probióticos são microrganismos vivos que devem possuir a capacidade de persistir e se multiplicar (SILVA & ANDREATTI FILHO, 2000).

As bactérias escolhidas para uso em probióticos devem obedecer a alguns critérios, como: pertencer a microbiota natural da espécie, possuir estabilidade a secreção ácida e biliar, não carcinogênicas ou patogênicas e trazer benefícios ao hospedeiro. Podem possuir também habilidades, como: se aderir às células do hospedeiro agindo por exclusão competitiva, além de produzir metabólitos (ácidos graxos e bacterocinas) que inibam direta ou indiretamente o crescimento de bactérias patogênicas (KURITZA, 2014).

O inóculo para a produção do probiótico pode ser obtido através de fezes ou de conteúdo cecal recém-colhidos (ANDREATTI FILHO et al., 1997, 1999 e 2000 e ANDREATTI FILHO & SILVA 2005) e, as bactérias presentes devem ser identificadas e descritas no rótulo. São constituídas, em sua maioria, por bactérias colonizadoras *Lactobacillus* e *Enterococcus* spp. ou não residentes, de trânsito livre, como *Bacillus* spp. (HUYGHEBAERT et al., 2011).

Glutamina e probiótico in ovo

Nos diferentes estudos na literatura em que se avaliou nutrientes *in ovo* há diferenças, principalmente, em termos de dose, local de aplicação e momento adequado de aplicação do nutriente, considerando a idade cronológica de incubação (RETES et al., 2017).

Contudo, devido às limitações nutricionais durante o período de desenvolvimento embrionário do frango de corte (UNI et al., 2012), alguns desses estudos demonstraram que a inoculação *in ovo* de nutrientes pode resultar em benefícios como, a modulação da resposta imune (MADEJ et al., 2020) e o melhor desenvolvimento intestinal ao nascimento (MOREIRA FILHO et al., 2019).

Durante os últimos dias de incubação do embrião de frango de corte, o intestinal é um dos órgãos que mais cresce de tamanho, passando de 1% do peso do embrião aos 18 dias de incubação para 3,5% no momento da eclosão (UNI et al., 2003). Após a eclosão, o sistema digestório continua a se desenvolver rapidamente (GEYRA et al., 2001).

Como fonte de energia para o desenvolvimento embrionário, as aves utilizam os aminoácidos presentes na gema (GIVISIEZ et al., 2020). O saco da gema de um pinto recém-eclodido, oriundo de uma ave jovem, contém aproximadamente 150 mg de glutamina (VIEIRA & MORAN, 1998). Porém, como o desenvolvimento do intestino é intenso na fase final de desenvolvimento embrionário, o fornecimento de aminoácidos *in ovo* pode contribuir ainda mais para o desenvolvimento do intestino (OHTA et al., 2004).

A inoculação *in ovo* de aminoácidos já se mostrou viável em alguns estudos (OHTA & KIDD, 2001; UNI et al., 2005). Entre os aminoácidos com potencial de utilização para nutrição *in ovo*, a glutamina destaca-se por ser agente trófico, importante no processo de proliferação celular (MAIORKA, et al. 2001; MANEEWAN & YAMAUCHI, 2005).

Além da glutamina, bactérias probióticas *in ovo* também podem trazer benefícios. A pouca diversidade de bactérias intestinais dos embriões facilita a colonização intestinal de bactérias fornecidas através de probióticos (MAIORKA et al., 2001), principalmente, porque as primeiras bactérias a chegarem no sistema digestório tenderão a colonizá-lo, por quase não existir disputa com outras bactérias por sítios de ligação (FURLAN et. al., 2004).

Leandro et al. (2004) e Oliveira et al. (2014), relataram que é possível prevenir a contaminação por *Salmonella* spp. através de probiótico *in ovo*. Contudo, novos estudos devem ser realizados para demonstrar os benefícios a partir dessa via, tanto para a aplicação do probiótico, como da glutamina, considerando que diferentes fatores podem influenciar no sucesso da aplicação,

como: dose ou volume (PEDROSO et al., 2006a; CAMPOS et al., 2011), concentração (PEDROSO et al., 2006b), local de aplicação (LEITÃO et al., 2010) fase do desenvolvimento embrionário da aplicação (ANDREATTI FILHO et al., 2006; YAMAWAKI et al., 2013) e tamanho e peso do ovo (ORO et al., 2019).

OBJETIVO GERAL

Avaliar a eclodibilidade e o efeito profilático de probiótico e glutamina *in ovo* em frangos de corte desafiados com *Salmonella* Heidelberg.

Objetivos específicos

- Verificar e comparar a eclodibilidade de ovos embrionados após a aplicação *in ovo* de probiótico, glutamina e antibiótico.
- Avaliar e comparar o efeito profilático da aplicação *in ovo* do probiótico, glutamina e antibiótico em pintainhos desafiados com *Salmonella* Heidelberg.
- Avaliar e comparar o desenvolvimento dos vilos e criptas intestinais de aves desafiadas experimentalmente com *Salmonella* Heidelberg, que receberam o probiótico, glutamina e antibiótico *in ovo*
- Avaliar e comparar a efetiva colonização de *Lactobacillus* spp. no intestino de aves desafiadas experimentalmente com *Salmonella* Heidelberg, que receberam o probiótico, glutamina e antibiótico *in ovo*.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais para Experimentação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP/Botucatu, com o número de protocolo: 0101/2019.

Foram utilizados 7.056 ovos da linhagem Cobb, provenientes do mesmo núcleo de produção de um matrizeiro comercial livre de *Salmonella* spp., originados de reprodutores com 60 semanas de idade.

O experimento foi dividido em duas etapas. A etapa A foi a avaliação realizada em um incubatório comercial no Paraná. Já a etapa B foi a continuação da etapa A, realizada no infectório da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus Botucatu.

Delineamento experimental - etapa A

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com a mesma quantidade de ovos para cada tratamento, a exceção do controle negativo, onde foi incubado o dobro de ovos, posteriormente separados na segunda etapa do experimento. Os ovos foram separados em seis tratamentos com quatro repetições. Na sala de recebimento dos ovos, antes da incubação, as bandejas foram selecionadas, identificadas e colocadas nas mesmas posições nos diferentes carrinhos (Figura 1). Cada carrinho de ovos recebeu um tratamento.

Para a análise do PCR em tempo real foram utilizados dois ovos embrionados por repetição. Já, para avaliação da eclodibilidade foi utilizado o total de ovos embrionados presentes na caixa do nascedouro (168 ovos embrionados), 672 ovos embrionados por tratamento.



Figura 1. Carrinho de ovos antes da incubação: marcação em vermelho indica as bandejas selecionadas para tratamento experimental.

Ovos e instalações

No incubatório os ovos foram estocados por dois dias a temperatura de 18°C antes de serem incubados. Os ovos foram alocados em incubadoras de estágio único (*Jamesway*). Realizou-se um pré-aquecimento de oito horas de forma crescente e linear, dentro da própria incubadora, até atingir a temperatura inicial preconizada (38°C). Os parâmetros utilizados na incubação durante o experimento foram:

- Incubadora: temperatura entre 38,0°C a 36,3°C, 70% a 40% umidade relativa e 10000 a 3500 ppm de CO₂.

- Nascidouro: temperatura entre 36,8°C a 35,6°C, 68% a 40% umidade relativa e 4000 a 3200 ppm de CO₂.

Antes da transferência automática para os nascedouros, com 18 dias e seis horas de desenvolvimento embrionário, os ovos foram vacinados *in ovo* (*Embrex* - Zoetis) com as vacinas: Gumboro (*Transmune IBD* - Ceva) e Marek (*Poultvac CVI-HVT* - Zoetis), na dose de 0,05 mL/ovo.

Foi realizada a vacinação *in ovo* em sistema de agulha dupla, regulada para atingir o líquido amniótico, com sistema embutido de desinfecção com hipoclorito de sódio.

Cada aditivo, de acordo com os tratamentos, foi incluído junto ao diluente vacinal, *bag* de 400 mL com capacidade para vacinação de oito mil ovos. Para melhor controle, alternadamente foi adicionado um corante ao diluente vacinal indicando a mudança de tratamento. Além disso, foram intercalados ovos que não fizeram parte do experimento entre os tratamentos, para evitar qualquer resquício do aditivo anterior.

Os tratamentos foram: controle negativo (não recebeu aditivo *in ovo* e não foi desafiado), glutamina (concentração de 10%), probiótico (com cinco cepas de *Lactobacillus reuteri* 10¹⁰ UFC/mL) associado com a glutamina, somente o probiótico, antibiótico (cloridrato de ceftiofur na dose de 0,02 mg/mL) e, por fim, antibiótico associado a glutamina.

Já no nascedouro, durante a incubação, de oito em oito horas um dispositivo liberou formaldeído para reduzir o nível de contaminação no momento do nascimento. Em cada nascedouro foram utilizados 300 mL de formaldeído a 37% (0,02 mL por ovo).

Parâmetros avaliados na etapa A

Eclodibilidade

No momento da transferência dos ovos da incubadora para o nascedouro realizou-se a ovoscopia com o auxílio da máquina de vacinação *in ovo* (*Embrex* - Zoetis). Foram retirados e anotados os ovos inférteis. Após a eclosão foram contabilizados os ovos eclodidos e calculada a eclodibilidade por meio da divisão

do número de ovos eclodidos pela quantidade de ovos férteis incubados nos nascedouros de acordo com a metodologia realizada por Fernandes et al. (2016).

Quantificação molecular de bactérias totais

A colheita das amostras foi realizada de acordo com a metodologia de Oliveira et al. (2014). Realizou-se colheita aleatória do conteúdo da moela, intestino delgado e grosso, e cecos de 48 embriões, oito embriões por tratamento, imediatamente antes da vacinação *in ovo*, e do conteúdo do intestino e cecos do mesmo número de embriões 48 horas após a primeira colheita.

As amostras foram acondicionadas em tubo criogênico (*DNAse e RNase-Free*) de 2 mL e armazenadas em nitrogênio líquido.

O DNA foi extraído utilizando-se o *QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen)*, seguindo-se as instruções do fabricante.

A quantificação relativa de bactérias totais foi obtida por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real, utilizando-se o *Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*. As reações de amplificação foram realizadas empregando o *SYBR Green (Promega)* ajustando-se o volume final de cada reação para 10µL dos quais: 5µL de *SYBR Green*, 4µM de cada oligo nucleotídeo (5' - 3': 16s-UniF CGAAAGCGTGGGGAGCAAA e 16s-UniR GTTCGTACTIONCCCCAGGCGG), 1µL de DNA extraído inteirando-se com água *DNAse e RNase-Free*, até atingir o volume final da reação. As condições utilizadas no modo de amplificação de longa duração para a quantificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguindo-se 40 ciclos compostos por uma etapa de desnaturação a 94°C por 15 segundos, uma etapa de anelamento e extensão a 60°C por um minuto, seguidos de curva dissociação de 95°C até 60°C com leitura de fluorescência a cada 0,1°C.

Para avaliação das concentrações de DNA foi realizado o método CT (*cycle threshold*) comparativo e utilizou-se um controle endógeno para avaliar a eficiência da reação. Desta forma, os resultados representaram o ponto de corte onde a fluorescência emitida caracterizou a amostra como positiva e foram inversamente proporcionais a quantidade de DNA, uma vez que, quanto menor o tempo necessário para detecção, menos ciclos de duplicação foram realizados

e conseqüentemente maior foi a quantidade de material genético desejável presente na amostra.

Delineamento experimental - etapa B

Para a etapa B foram utilizados 426 pintainhos originados da primeira etapa. Nas colheitas foram avaliadas 336 aves no total, 56 aves por colheita, total de sete tratamentos, com quatro repetições cada, e duas aves por repetição.

Animais e instalações

Após a eclosão, os pintainhos foram transportados para o infectório do Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu-SP.

Antes do alojamento, uma ave de cada tratamento foi eutanasiada por deslocamento cervical e colhidos os cecos e fígado para a análise de presença/ausência de *Salmonella* spp. por meio da metodologia preconizada por Mallinson et al. (1989).

Foram alojadas 60 aves de cada tratamento em salas previamente limpas e desinfetadas e separadas estrategicamente para evitar contaminação cruzada. Em cada tratamento, as aves foram alocadas em quatro gaiolas com piso revestido de papel contendo 15 aves cada (repetição).

As aves foram mantidas com água e ração isentas de antimicrobianos promotores de crescimento e coccidiostáticos.

Cepa de Salmonella Heidelberg e desafio experimental

A cepa de *Salmonella* Heidelberg utilizada no inóculo pertence a bacterioteca do Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia na UNESP (Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho). Essa cepa foi previamente marcada com resistência ao Ácido

Nalidíxico (Nal) e Rifampicina (Rif). Para tanto, realizaram-se passagens sucessivas em meio líquido Infusão Cérebro e Coração (BHI) e Ágar Verde Brilhante (AVB), aumentando os antibióticos gradativamente até a concentração de 100 µg/mL conforme metodologia preconizada por Andreatti Filho et al. (1997).

O número de UFC foi determinado por meio de diluições decimais em solução tampão (*phosphate buffered saline* - PBS) com pH 7,2. Todas as determinações bacterianas foram realizadas pelo plaqueamento de 0,1 mL das suspensões (BHI) e respectivas diluições decimais (PBS), em placas de AVB (Nal/Rif). A leitura foi feita após incubação a 40°C por 24 horas.

O desafio com SH ocorreu 24 horas após o alojamento das aves. O inóculo foi administrado diretamente no ingluvío por meio de gavagem. Cada ave recebeu 0,5 mL do inóculo com SH contendo 4×10^6 UFC/mL. As aves do controle negativo receberam 0,5 mL de PBS.

Parâmetros avaliados na etapa B

Os parâmetros avaliados e os períodos das colheitas das amostras estão descritos tabela 1. Em cada colheita foram eutanasiadas 56 aves por deslocamento cervical para a obtenção das amostras.

Tabela 1. Parâmetros avaliados após tratamentos *in ovo* e desafio com *Salmonella* Heidelberg (SH).

Colheita	Tempo após desafio com SH (dias)	Parâmetros
1°	1	Quantificação de SH no ingluvío e cecos e quantificação molecular de <i>Lactobacillus spp</i> nos cecos.
2°	3	Quantificação de SH no ingluvío e cecos e morfologia intestinal.
3°	7	Quantificação de SH no ingluvío e cecos.
4°	14	Quantificação de SH no ingluvío e cecos.
5°	21	Quantificação de SH no ingluvío e cecos e morfologia intestinal.
6°	37	Quantificação de SH no ingluvío e cecos quantificação molecular de <i>Lactobacillus spp.</i> nos cecos e; análise biométrica intestinal.

Análise microbiológica – Quantificação das colônias de *Salmonella* Heidelberg

Foram colhidos de forma asséptica, o ceco direito e o ingluvío de cada ave. Os órgãos foram colocados separadamente em bolsas plásticas estéreis, onde foram pesados e macerados com auxílio de espátula. De acordo com o peso do órgão e conteúdo, determinou-se a quantidade de PBS a ser adicionada a fim de alcançar a proporção de 1:10, obtendo-se a diluição 10^{-1} . Após a homogeneização do conteúdo, foi retirado 0,1 mL para realizar as demais diluições até a diluição 10^{-7} , em microtubos contendo 0,9 mL de PBS. Para o plaqueamento, utilizou-se 0,1 mL de cada diluição em placas de Petri contendo AVB Nal/Rif, cultivadas durante 24 horas à temperatura de 40°C, determinando-se posteriormente o número de UFC/mL conforme metodologia utilizada por Andreatti Filho et al. (1997).

Análise biométrica do intestino

Mediu-se o comprimento do duodeno até o final do íleo, sendo este limitado pela abertura dos cecos. A medida de comprimento foi realizada por meio de régua métrica milimetrada sob o órgão distendido. A medida de peso da ave e intestino foi realizada com pesagem em balança digital de bancada conforme a metodologia de Salmanzadeh et al. (2016).

Análise morfológica da mucosa intestinal – Mensuração de vilos e criptas

O intestino foi dividido segundo Dyce et al. (1997), em: duodeno - porção entre o piloro e a parte distal da alça duodenal, jejuno - a partir da parte distal da alça duodenal até o divertículo de Meckel e íleo - a partir do divertículo de Meckel até a inserção dos cecos.

Cada divisão do intestino foi grampeada em papel pelas extremidades após serem lavados com formol 10%, e com o auxílio de uma agulha acoplada a seringa, foram preenchidos com o formol.

Após 24 horas de fixação e 24 horas com água, cada região do intestino foi clivada em seis segmentos menores de mesmo tamanho, a exceção do duodeno clivado em quatro segmentos e, em seguida armazenados em álcool 70%.

Posteriormente, as amostras foram seccionadas e acondicionadas em cassetes histológicos. Os tecidos foram processados conforme a metodologia de rotina do laboratório de histologia do serviço de Patologia Veterinária da FMVZ da Unesp Botucatu. Realizou-se a microtomia com auxílio de micrótomo automático (*RM-2145, Leica Microsystems*) obtendo-se cortes de 4µm de forma semi-seriada. A coloração utilizada foi de Hematoxilina e Eosina de acordo com a metodologia preconizada pelo Manual de Colorações Histológicas do serviço de Patologia Veterinária da FMVZ da Unesp Botucatu.

As medidas de altura dos vilos e profundidade das criptas foram obtidas por meio das análises das imagens dos cortes histológicos realizadas com auxílio de sistema computadorizado de captura de imagem (*Qwin Lite 3.0, Leica*

Microsystems). Foram realizadas as mensurações da altura de 10 vilos e 10 criptas de cada segmento colhido (Figura 2).

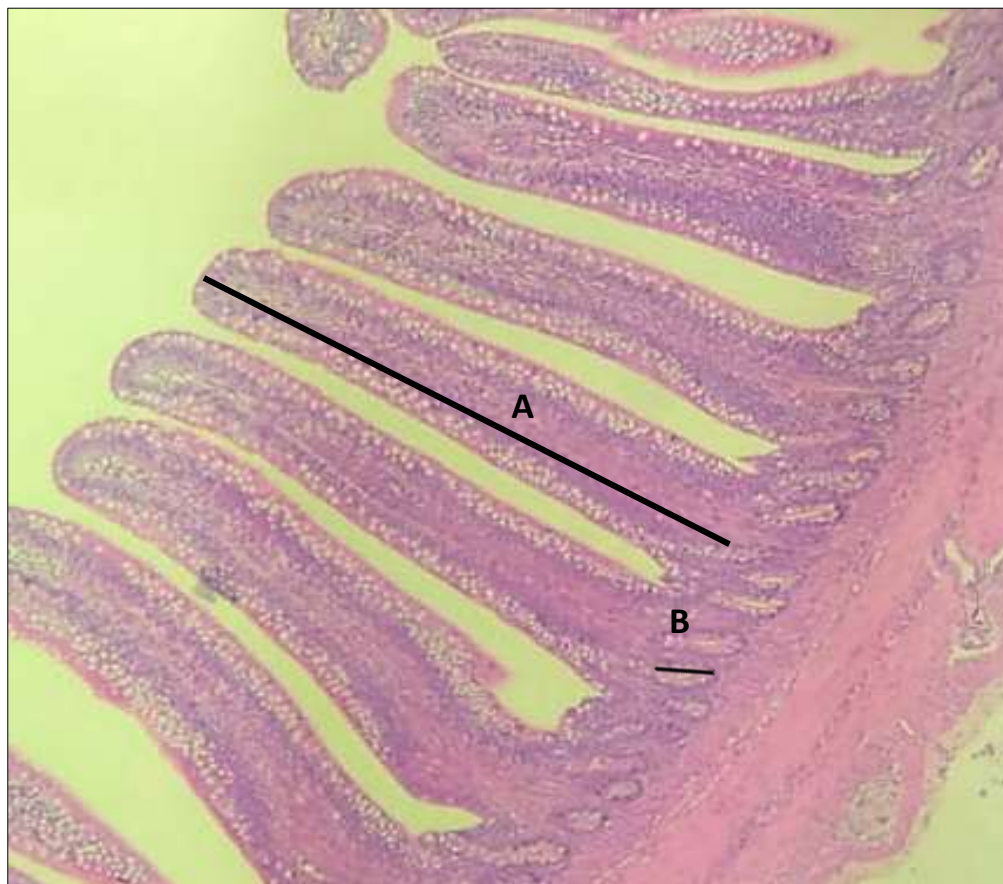


Figura 2. Corte histológico do íleo. Mensuração da altura do vilos (A) e da profundidade da cripta (B) de frango de corte que recebeu probiótico *in ovo* após três dias do desafio com a *Salmonella* Heidelberg. Objetiva 5x.

Quantificação molecular de *Lactobacillus* spp.

A colheita das amostras foi realizada de acordo com Wise & Saragusa (2007). O ceco esquerdo de cada ave foi aberto longitudinalmente para a retirada do conteúdo, o qual armazenou-se em tubo de plástico *DNase* e *RNase*-Free de 2 mL à -80°C.

A cepa bacteriana utilizada como controle positivo foi o *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356), cultivado em caldo MRS (*De Man Rugosa Sharpe*) a

37°C, em anaerobiose, por 48 horas. Para isolamento das colônias, 0,1 mL de caldo foi estriado em placa contendo ágar MRS, incubado novamente nas mesmas condições.

O DNA das amostras foi extraído utilizando-se o *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (Qiagen), seguindo-se as instruções do fabricante.

A quantificação relativa de *Lactobacillus* spp. foi obtida por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real, utilizando-se o *Step One Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). As reações de amplificação foram realizadas empregando o *SYBR Green* (Promega) ajustando-se o volume final de cada reação para 10µL dos quais: 5µL de *SYBR Green*, 4µM de cada oligo nucleotídeo (5' - 3': LacF CACCGCTACACATGGAG e LacR AGCAGTAGGGAATCTTCCA), 1µL de DNA extraído, inteirando-se com água *DNase e RNase-Free*, até atingir o volume final da reação.

As condições utilizadas no modo de amplificação de longa duração para a quantificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguindo-se 40 ciclos compostos por uma etapa de desnaturação a 94°C por 15 segundos, uma etapa de anelamento e extensão a 60°C por um minuto, seguidas de curva de dissociação de 95°C até 60°C com leitura de fluorescência a cada 0,1°C.

Para avaliação das concentrações de DNA foi realizado o método CT (*cycle threshold*) comparativo. Desta forma, os resultados representaram o ponto de corte onde a fluorescência emitida caracterizou a amostra como positiva e foram inversamente proporcionais a quantidade de DNA, uma vez que, quanto menor o tempo necessário para detecção, menos ciclos de duplicação foram realizados e conseqüentemente maior foi a quantidade de material genético desejável presente na amostra.

Análise estatística

Foi realizada a análise de variância complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey (ZAR, 2009), considerando o nível de 5% de significância. Já para a quantificação de SH no inglvio e cecos, realizou-se análise de regressão e observou-se que os dados apresentavam melhor

disposição de forma não paramétrica. Portanto, optou-se também, por realizar a técnica de análise de variância não paramétrica complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn (ZAR, 2009), considerando o nível de 5% de significância.

RESULTADOS

Houve diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) sob a eclodibilidade e, o tratamento com antibiótico + glutamina obteve a maior média de eclodibilidade (Figura 3). Já a menor média foi observada no tratamento com somente o antibiótico. Todos os tratamentos com glutamina apresentaram melhor eclodibilidade que o grupo controle, com exceção do tratamento com somente probiótico que não diferiu do grupo controle.

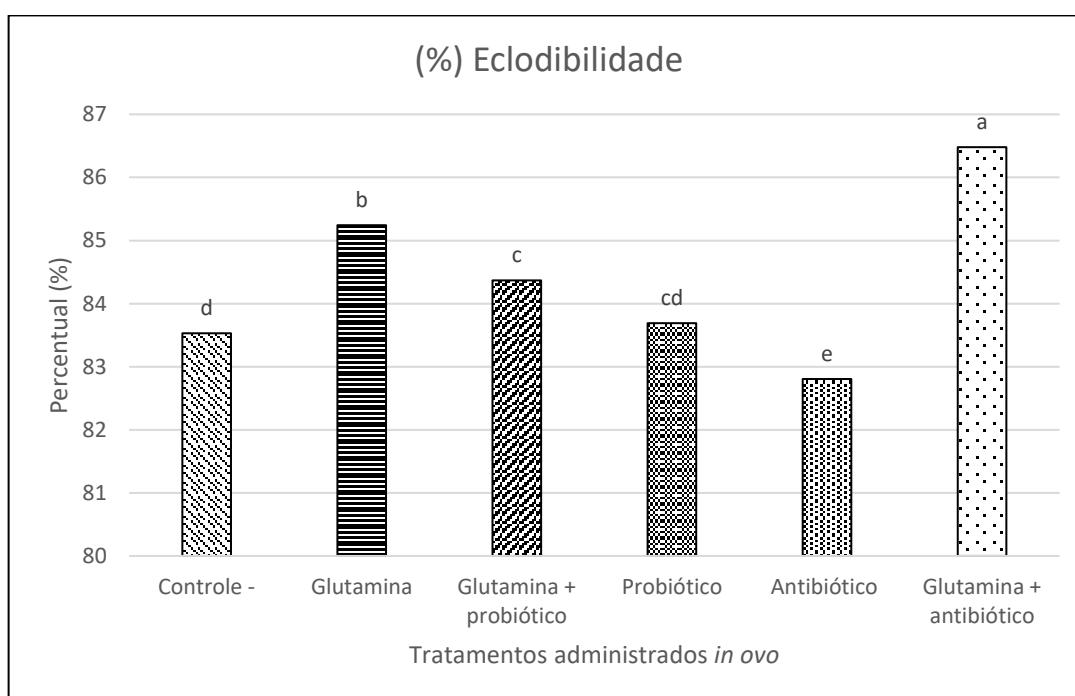


Figura 3. Percentual de eclodibilidade de aves tratadas *in ovo*.

^{a-e} Duas médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, não diferem entre si ($p > 0,05$).

Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos em relação à quantidade relativa de bactérias totais do conteúdo digestório de embriões na primeira colheita (antes da inoculação *in ovo* dos tratamentos; tab. 2). Porém, houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos em relação a quantidade relativa de bactérias totais do conteúdo digestório de embriões na segunda colheita (48 horas após a inoculação *in ovo* dos tratamentos). O tratamento que recebeu o probiótico + glutamina obteve maior média de DNA bacteriano do que aqueles que receberam antibiótico e antibiótico + glutamina.

Além disso, houve diferença significativa entre as colheitas ($p<0,05$) em relação ao tratamento glutamina + probiótico, onde a maior concentração de DNA bacteriano ocorreu nas amostras do conteúdo digestório de embriões 48 horas após a inoculação *in ovo* dos tratamentos.

Tabela 2. Média e desvio padrão da quantidade de bactérias totais do conteúdo digestório de embriões antes e após administração *in ovo* dos tratamentos. Resultados inversamente proporcionais a quantidade de DNA presente na amostra.

Tratamento	Colheita		Valor de p
	1	2	
Controle -	27,53 (1,51)	26,19 (3,28) ^{ab}	$p>0,05$
Glutamina	28,22 (1,11)	26,19 (3,42) ^{ab}	$p>0,05$
Glutamina + probiótico	28,00 (1,78) ^B	23,68 (3,47) ^{a A}	$p<0,05$
Probiótico	27,95 (2,02)	25,29 (3,56) ^{ab}	$p>0,05$
Antibiótico	28,11 (0,48)	28,07 (1,05) ^b	$p>0,05$
Glutamina + antibiótico	27,69 (1,39)	28,05 (0,82) ^b	$p>0,05$
Valor de p	$p>0,05$	$p<0,05$	

^{a,b}Duas médias seguidas de mesma letra minúscula e na mesma coluna não se diferenciam entre si quanto os tratamentos; ^{A,B}Duas médias seguidas de letras maiúsculas e na mesma linha se diferenciam entre si quanto as colheitas.

¹Colheita do conteúdo digestório imediatamente antes dos tratamentos; ² Colheita do conteúdo digestório 48 horas após a administração dos tratamentos.

Observou-se diferença significativa ($p<0,05$) entre os tratamentos em relação a quantidade de SH nos cecos ao primeiro, terceiro e 14 dias após o desafio com a bactéria (Tabela 3). O tratamento com o probiótico, associado ou não com a glutamina, apresentou menor quantidade de SH quando comparado com os demais tratamentos e o grupo controle, um dia após o desafio com SH.

Tabela 3. Quantidade em log 10 de UFC/mL de *Salmonella* Heidelberg (SH) nos cecos de aves tratadas *in ovo* e experimentalmente desafiadas com SH.

Tratamento	Tempo após desafio com SH (dias)						Valor de p	Efeito
	1	3	7	14	21	37		
Glutamina + antibiótico	6,0 ^{c D}	6,1 ^{a C}	6,1 ^C	6,9 ^{b C}	3,9 ^B	0 ^A	p<0,01	p>0,05
Antibiótico	5,4 ^{c C}	5,4 ^{a C}	5,8 ^C	5,9 ^{ab C}	4,3 ^B	0 ^A	p<0,01	p>0,05
Glutamina	5,0 ^{b BC}	5,8 ^{a C}	5,7 ^C	5,3 ^{a C}	4,6 ^B	0 ^A	p<0,01	Quadrático
Glutamina + probiótico	4,4 ^{a B}	5,1 ^{a BC}	6,0 ^C	5,6 ^{a C}	3,2 ^B	0 ^A	p<0,01	Quadrático
Probiótico	4,0 ^{a B}	5,9 ^{a C}	6,1 ^C	5,8 ^{a C}	3,3 ^B	0 ^A	p<0,01	Quadrático
Controle +	6,2 ^{d C}	7,6 ^{b D}	5,9 ^C	5,7 ^{a C}	4,4 ^B	1 ^A	p<0,01	Linear
Valor de p	p<0,01	p<0,01	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05		

^{a-c}Duas médias seguidas de mesma letra minúscula e na mesma coluna não se diferenciam entre si quanto aos tratamentos.

^{A-C}Duas médias seguidas de mesma letra maiúscula e na mesma linha não se diferenciam entre si quanto aos dias após desafio com SH.

No terceiro dia após o desafio, todos os tratamentos apresentaram menor quantidade de SH, quando comparados com o grupo controle. Após 14 dias do desafio, o tratamento com antibiótico associado à glutamina apresentou maior quantidade de SH nos cecos, quando comparado aos demais tratamentos, incluindo o grupo controle.

Tanto a quantificação de SH nos cecos, quanto no ingluvío (Tabela 4) apresentaram redução de forma significativa (p<0,05), a partir do décimo quarto dia após o desafio com a bactéria.

Tabela 4. Quantidade em log 10 de UFC/mL de *Salmonella* Heidelberg (SH) no ingluvío de aves tratadas *in ovo* e experimentalmente desafiadas com SH.

Tratamento	Tempo após desafio com SH (dias)						Valor de p	Efeito
	1	3	7	14	21	37		
Glutamina + antibiótico	3,4 ^B	4,0 ^B	3,8 ^B	2,8 ^{AB}	1,3 ^A	0 ^A	p<0,01	p>0,05
Antibiótico	3,1 ^A	3,5 ^B	4,4 ^B	2,5 ^A	1,3 ^A	0 ^A	p<0,01	p>0,05
Glutamina	3,4 ^B	3,0 ^A	4,1 ^B	3,0 ^A	1,6 ^A	0 ^A	p<0,01	p>0,05
Glutamina + probiótico	2,8 ^A	3,1 ^A	4,1 ^B	2,1 ^A	1,4 ^A	0 ^A	p<0,01	Quadrático
Probiótico	2,3 ^A	3,7 ^B	4,2 ^B	2,2 ^A	1,6 ^A	0 ^A	p<0,01	Quadrático
Controle +	3,3 ^B	3,4 ^B	4,0 ^C	2,8 ^{AB}	1,6 ^A	1 ^A	p<0,01	Quadrático
Valor de p	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05		

^{A-C}Duas médias seguidas de mesma letra maiúscula e na mesma linha não se diferenciam entre si quanto aos dias após desafio com SH.

Mesmo não ocorrendo diferença significativa entre os tratamentos aos 21 dias após o desafio com SH, os tratamentos que receberam o probiótico também apresentaram menor quantidade da bactéria nos cecos, neste período (Figura 4).

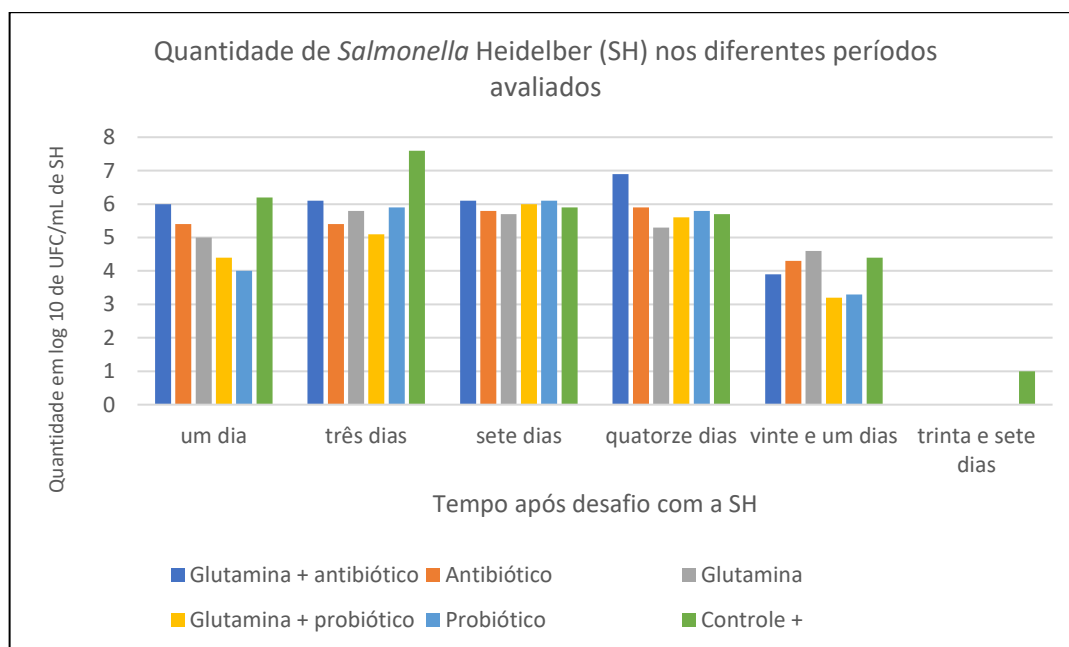


Figura 4. Quantidade de SH nos cecos de aves que receberam os tratamentos in ovo nos diferentes períodos avaliados.

Na análise de regressão, o tratamento com a glutamina e os tratamentos que receberam o probiótico apresentaram efeito quadrático na quantificação de SH nos cecos (Figuras 5, 6 e 7).

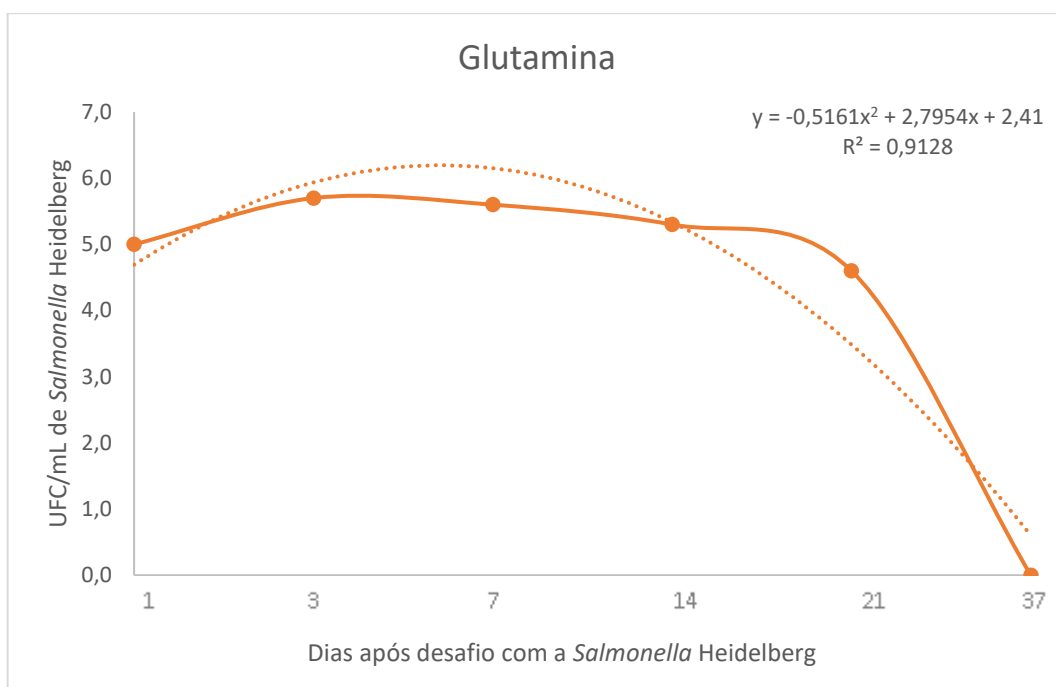


Figura 5. Mediana em log 10 de UFC/mL de *Salmonella* Heidelberg (SH) os cecos de frangos que receberam glutamina *in ovo* conforme os dias após desafio com a SH.

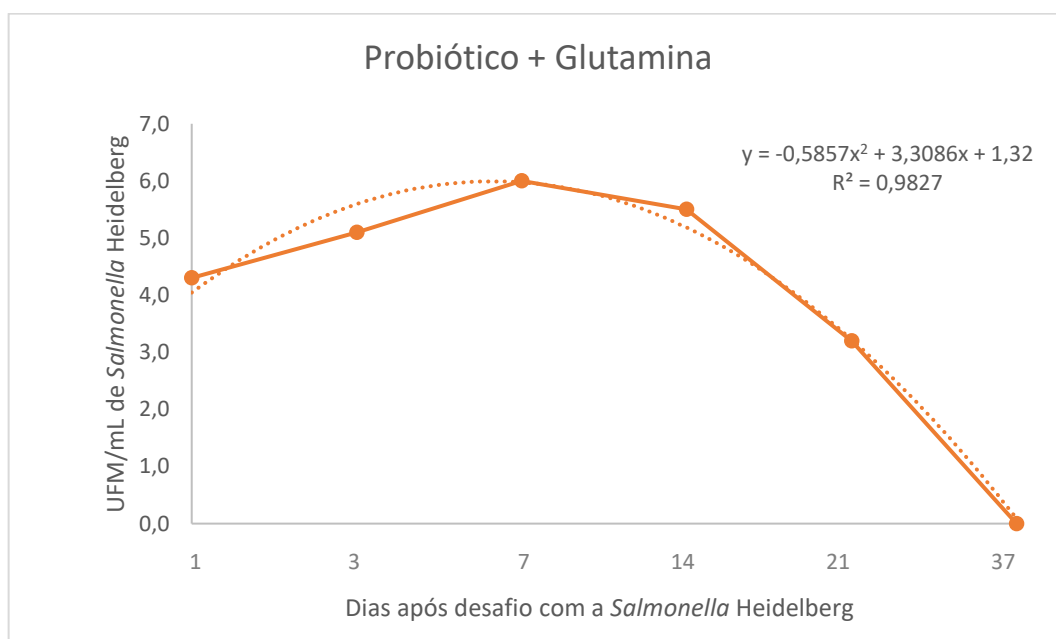


Figura 6. Média em log 10 de UFC/mL de *Salmonella* Heidelberg (SH) nos cecos de frangos que receberam probiótico e glutamina *in ovo* conforme os dias após desafio com a SH.

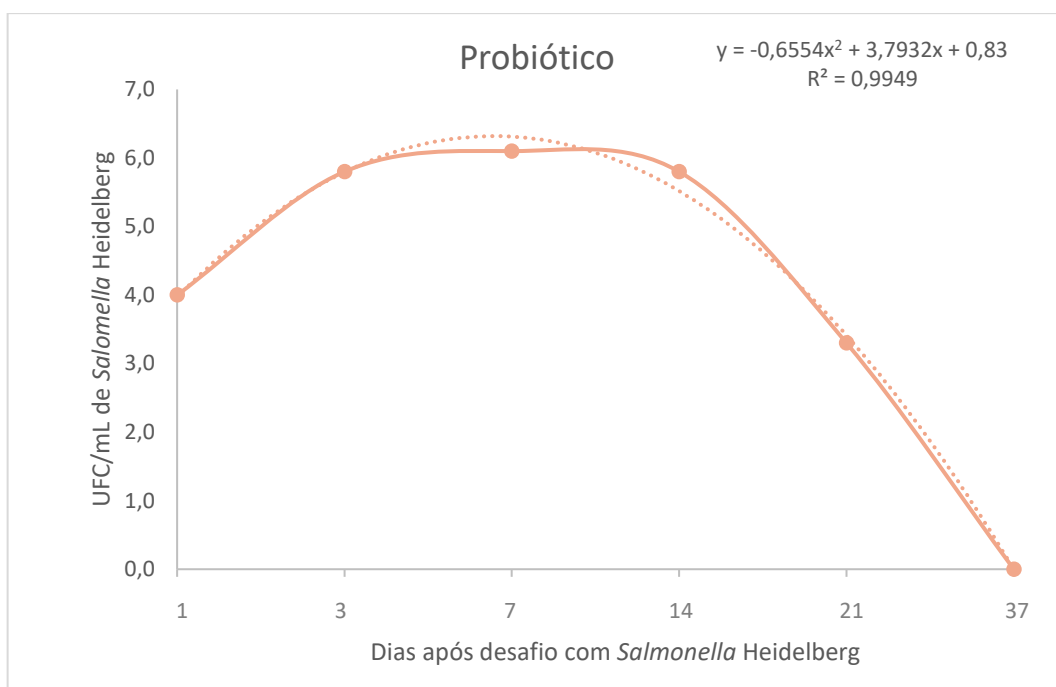


Figura 7. Mediana em log 10 de UFC/mL de *Salmonella* Heidelberg (SH) nos cecos de frangos que receberam probiótico + glutamina *in ovo* conforme os dias após desafio com a SH.

Entretanto, o controle positivo, apresentou efeito linear decrescente na quantificação de SH nos cecos (Figura 8).

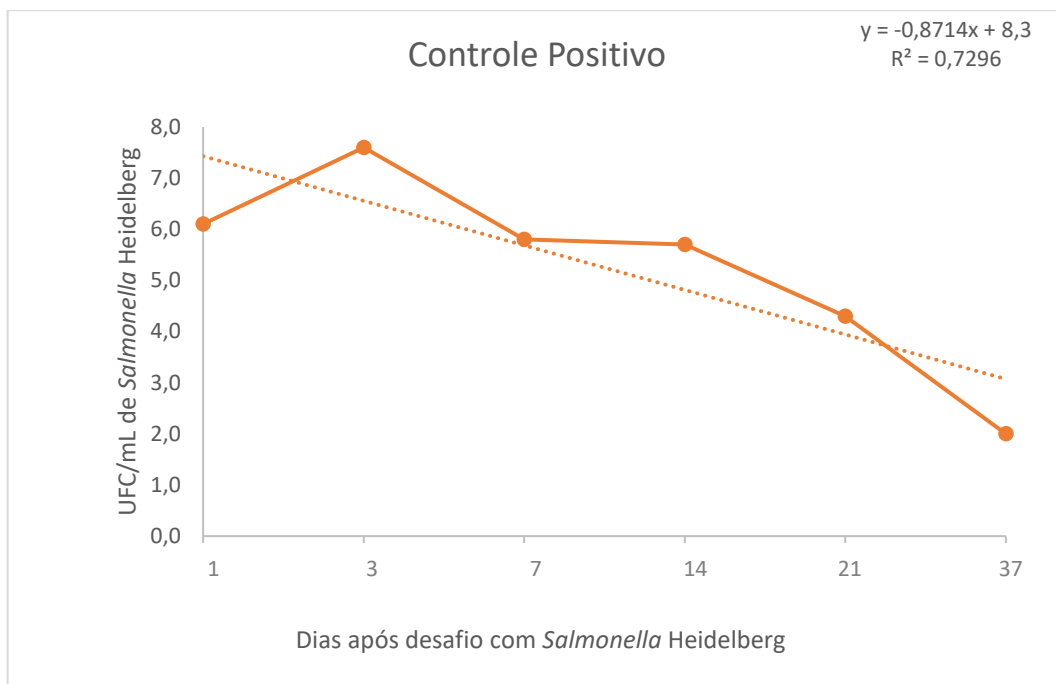


Figura 8. Mediana em log 10 de UFC/mL de *Salmonella* Heidelberg (SH) nos cecos de frangos não tratados *in ovo* conforme os dias após desafio com a SH.

Os tratamentos que receberam probiótico e o controle positivo apresentaram efeito quadrático na quantificação de SH no ingluvío (Figuras 9, 10 e 11).

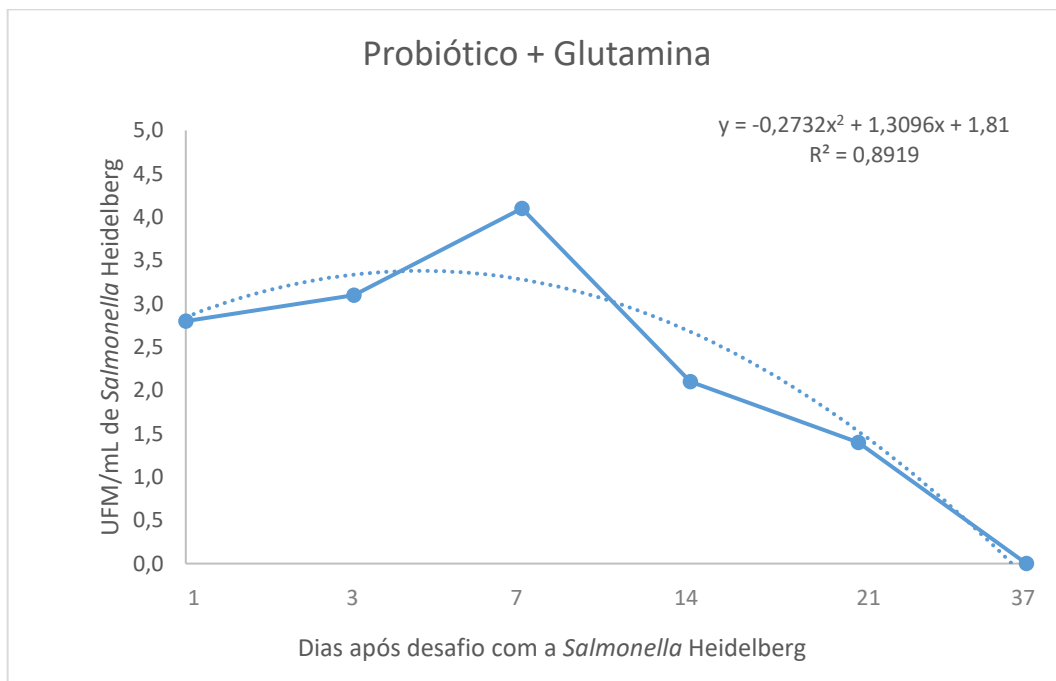


Figura 9. Mediana em log 10 de UFC/mL de *Salmonella* Heidelberg (SH) nos cecos de frangos que não receberam aditivo *in ovo* conforme os dias após desafio com a SH.

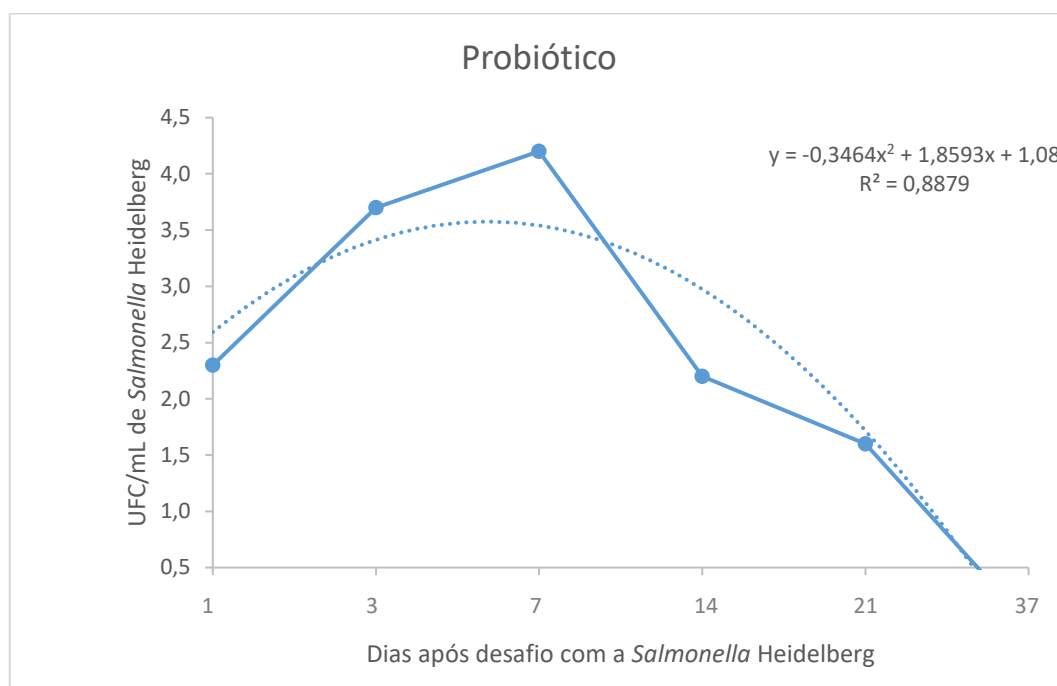


Figura 10. Mediana em log 10 de UFC/mL de *Salmonella* Heidelberg (SH) no inglúvio de frangos que receberam probiótico *in ovo* conforme os dias após o desafio com SH.

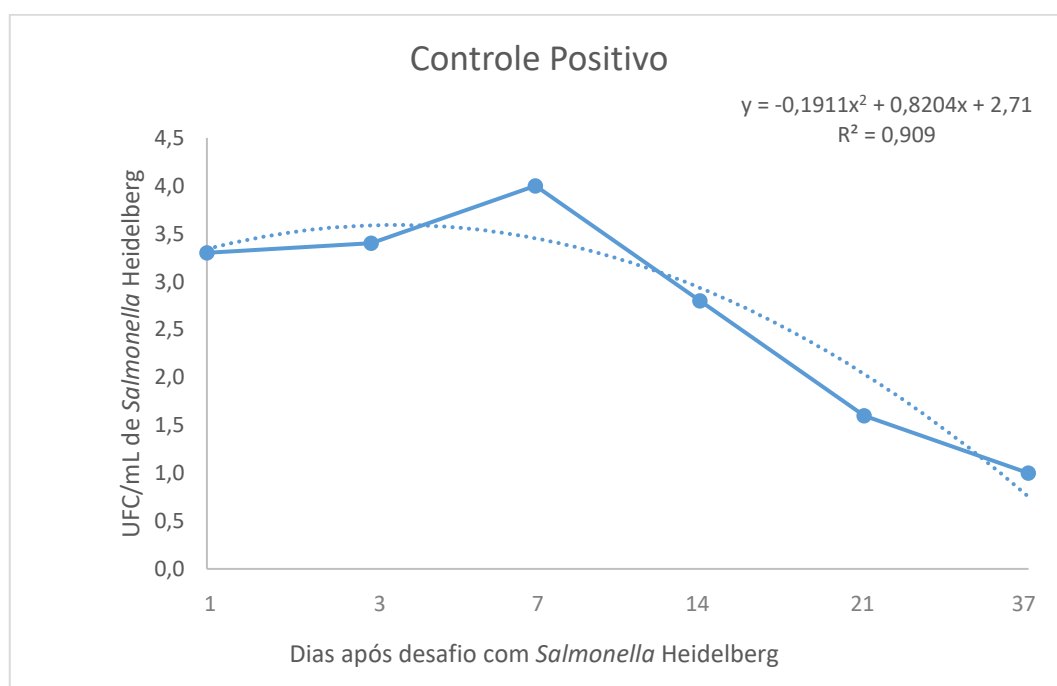


Figura 11. Mediana em log 10 de UFC/mL de *Salmonella* Heidelberg (SH) no inglúvio de frangos não tratados *in ovo* conforme os dias após desafio com a SH.

Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos sobre o peso dos frangos, comprimento relativo e peso relativo do intestino das aves (Tabela 5).

Tabela 5. Média e desvio padrão do peso corporal das aves, comprimento relativo e peso relativo do intestino de aves tratadas *in ovo* e experimentalmente desafiadas com *Salmonella* Heidelberg.

Tratamento	Peso da ave (g)	Comprimento relativo do intestino (cm)	Peso relativo do intestino (g)
Glutamina + antibiótico	1546,75 (193,58)	9,74 (1,43)	3,00 (0,33)
Antibiótico	1556,75 (180,16)	10,37 (0,58)	3,09 (0,22)
Glutamina	1646,00 (172,56)	9,48 (0,92)	3,21 (0,28)
Glutamina + probiótico	1579,25 (283, 47)	9,90 (1,05)	3,45 (1,62)
Probiótico	1657,63 (128,63)	9,21 (0,68)	2,88 (0,42)
Controle +	1625,18 (237,68)	9,54 (1,58)	2,63 (0,37)
Controle -	1642,25 (212,35)	9,97 (1,08)	2,82 (0,24)
Valor de p	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

Houve diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) sobre a morfologia intestinal (Tabela 6) nas duas variáveis avaliadas (altura de vilo e profundidade de cripta) no terceiro dia após desafio com SH.

No duodeno, os tratamentos que receberam o antibiótico + glutamina, probiótico e controle negativo apresentaram maior altura de vilo em comparação aos que receberam antibiótico e o controle positivo. No jejuno, o tratamento com probiótico apresentou maior altura de vilo do que os demais tratamentos, incluindo os controles. Já no íleo, o tratamento com probiótico apresentou maior média de altura de vilo em relação às aves que receberam antibiótico e glutamina sem associação.

O tratamento com probiótico também resultou em maior profundidade de cripta no duodeno, quando comparado com os controles. No Jejuno a profundidade de cripta foi maior no tratamento com antibiótico + glutamina em comparação aos que receberam o probiótico + glutamina e o controle positivo. Contudo no íleo, o tratamento com probiótico apresentou maior profundidade de cripta do que os tratamentos que receberam o antibiótico e o controle negativo.

Tabela 6. Média e desvio padrão da altura dos vilos e profundidade das criptas, em micrômetros, no duodeno, jejuno e íleo de aves tratadas *in ovo* após três do desafio experimental com *Salmonella* Heidelberg (SH).

Três dias após o desafio com SH						
Tratamento	Vilo			Cripta		
	Duodeno	Jejuno	Íleo	Duodeno	Jejuno	Íleo
Glutamina + antibiótico	921, 02 (34,50) ^{ab}	531, 76 (65,92) ^{bc}	394,42 (29,41) ^{ab}	61,34 (9,07) ^{ab}	65,10 (13,28) ^a	54,42 (7,40) ^{ab}
Antibiótico	797,20 (53,80) ^d	450,64 (62,22) ^c	329,81 (55,89) ^b	54,19 (4,68) ^{ab}	57,57 (8,10) ^{ab}	48,87 (7,96) ^b
Glutamina	895,94 (58,08) ^c	478,77 (55,06) ^{bc}	355,99 (46,31) ^b	59,39 (8,29) ^{ab}	57,49 (6,30) ^{ab}	54,01 (5,32) ^{ab}
Glutamina + probiótico	892, 61 (71, 96) ^c	532,28 (43,42) ^{bc}	391,83 (68,15) ^{ab}	54,57 (3,51) ^{ab}	54,20 (4,38) ^b	52,20 (4,69) ^{ab}
Probiótico	1017,92 (62,33) ^a	635,78 (82,88) ^a	461,73 (70,82) ^a	63,25 (7,93) ^a	64,39 (3,71) ^{ab}	58,33 (3,69) ^a
Controle +	926,94 (34,26) ^{cd}	555,42 (50,45) ^{ab}	368,82 (29,46) ^{ab}	53,58 (2,71) ^b	53,92 (5,34) ^b	51,14 (5,10) ^{ab}
Controle -	987,92(19,43) ^{ab}	561,25 (38,89) ^{ab}	402,79 (33,78) ^{ab}	51,73 (4,56) ^b	56,00 (3,52) ^{ab}	47,92 (3,26) ^b
Valor de p	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,05	p<0,01	p<0,01

^{a-d} Duas médias seguidas de mesma letra não se diferenciam entre si quanto os tratamentos.

Já em relação a morfologia intestinal no 21° dia após o desafio com SH (Tabela 7), houve diferença significativa ($p<0,05$) em relação à altura de vilo somente no íleo, sendo que o controle positivo apresentou maior altura de vilo que o tratamento com probiótico + glutamina.

Ocorreu também diferença significativa entre os tratamentos ($p<0,05$) em relação a profundidade de cripta no duodeno e íleo. O tratamento com glutamina resultou em menor profundidade de cripta do que os demais tratamentos no duodeno. E no íleo, o tratamento com glutamina apresentou menor profundidade de cripta do que os controles.

Tabela 7. Média e desvio padrão da altura dos vilos e profundidade das criptas, em micrômetros, no duodeno, jejuno e íleo de aves tratadas *in ovo* após 21 do desafio experimental com *Salmonella* Heidelberg (SH).

21 dias após o desafio com SH						
Tratamento	Vilo			Cripta		
	Duodeno	Jejuno	Íleo	Duodeno	Jejuno	Íleo
Glutamina + antibiótico	1298,55 (174,16)	952,19 (86,45)	644,61 (33,07) ^{ab}	65,25 (5,25) ^a	65,41 (5,07)	59,52 (5,33) ^{ab}
Antibiótico	1298,62 (81,70)	985,92 (92,22)	632,66 (68,88) ^{ab}	62,41 (4,34) ^{ab}	62,15 (4,67)	56,14 (3,00) ^{ab}
Glutamina	1306,93 (116,46)	912,98 (136,26)	643,93 (63,33) ^{ab}	54,26 (5,33) ^b	57,60 (4,76)	53,65 (4,88) ^b
Glutamina + probiótico	1287,43 (158,46)	981,26 (114,04)	622,58 (45,22) ^b	62,68 (5,22) ^{ab}	65,27 (6,34)	58,35 (5,60) ^{ab}
Probiótico	1427,78 (113,36)	1058,74 (73,89)	714,25 (45,57) ^{ab}	70,09 (7,59) ^a	65,98 (9,29)	62,96 (4,41) ^{ab}
Controle +	1238,29 (140,43)	954,71 (129,14)	729,60 (135,95) ^a	65,77 (6,40) ^a	66,96 (6,97)	65,66 (6,14) ^a
Controle -	1276,87 (200,10)	1000,75 (128,81)	657,26 (90,54) ^{ab}	65,60 (5,72) ^a	66,83 (8,47)	64,50 (10,90) ^a
Valor de p	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05	p<0,05

^{a,b} Duas médias seguidas de mesma letra não se diferenciam entre si quanto os tratamentos.

Em relação a quantificação relativa de *Lactobacillus* spp. do conteúdo cecal, houve diferença significativa ($p<0,05$) entre os tratamentos com um e 37 dias após o desafio com SH (Tabela 8). Com um dia após o desafio o tratamento com antibiótico + glutamina apresentou maior concentração de *Lactobacillus* spp. do que o tratamento com glutamina + probiótico. Na segunda colheita os tratamentos que receberam antibiótico + glutamina e somente glutamina resultaram em maior quantidade de *Lactobacillus* spp. do que os tratamentos com glutamina + probiótico e probiótico isoladamente.

Houve também diferença significativa em relação aos períodos após o desafio com SH ($p<0,05$), e todos os tratamentos, 37 dias após o desafio com SH, resultaram no aumento de *Lactobacillus* spp.

Tabela 8. Média e desvio padrão da quantidade de *Lactobacillus* spp. nos cecos de aves tratadas *in ovo* e experimentalmente desafiadas com *Salmonella* Heidelberg (SH).

Tratamento	Tempo após desafio com <i>Salmonella</i> Heidelberg (dias)		Valor de p
	1	37	
Glutamina + antibiótico	20,16 (6,65) ^{a B}	13,64 (2,45) ^{a A}	p<0,05
Antibiótico	26,45 (2,64) ^{ab B}	15,70 (4,07) ^{ab A}	p<0,01
Glutamina	26,55 (2,97) ^{ab B}	13,05 (3,13) ^{a A}	p<0,01
Glutamina + probiótico	27,15 (3,24) ^{b B}	20,61 (7,73) ^{b A}	p<0,05
Probiótico	23,85 (2,83) ^{ab B}	19,21 (2,57) ^{b A}	p<0,01
Controle +	24,25 (3,05) ^{ab B}	16,81 (1,07) ^{ab A}	p<0,01
Controle -	23,95 (3,58) ^{ab B}	15,97 (2,22) ^{ab A}	p<0,01
Valor de p	p<0,05	p<0,05	

^{a,b} Duas médias seguidas de mesma letra minúscula e mesma coluna não se diferenciam entre si quanto os tratamentos.

^{A,B} Duas médias seguidas de mesma letra maiúscula e mesma linha não se diferenciam entre si quanto aos dias após desafio com SH.

DISCUSSÃO

A aplicação *in ovo* de bactérias probióticas pertencentes a microbiota intestinal de frangos já demonstrou ser eficaz no controle de patógenos importantes para a cadeia avícola como a *Salmonella* spp. (TEAGUE et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2014). Porém, alguns estudos relataram a diminuição da eclodibilidade quando utilizado o probiótico *in ovo* (ANDREATTI FILHO et al., 2006; YAMAWAKI et al., 2013). No presente estudo, não houve diminuição da eclodibilidade nos tratamentos que receberam o probiótico em relação ao grupo controle, como no estudo realizado por Silva et al. (2017). Muitos fatores podem estar relacionados com a diminuição da eclodibilidade quando aplicado probiótico *in ovo*. Dentre eles, a fase de desenvolvimento embrionário, diversidade e concentração das bactérias probióticas, dose e manejos, que se diferem entre os estudos.

Todos os tratamentos contento glutamina apresentaram melhor eclodibilidade que o grupo controle neste estudo. Rufino et al. (2019) também relataram melhora na eclosão quando utilizada a glutamina na concentração de 0,5%. A glutamina é um nutriente energético (potencial para gerar 30 moles de

ATP), que disponibiliza fonte de carbono para a gliconeogênese através do glutamato DH (CHEN, et al., 2009). Essa fonte energética é importante quando fornecida *in ovo*, devido à alta taxa metabólica necessária para eclosão e desenvolvimento intestinal (GONÇALVES et al., 2013).

Apesar do probiótico não ter influenciado negativamente na eclodibilidade, a aplicação *in ovo* do antibiótico resultou em menor eclodibilidade, provavelmente devido à dificuldade que o embrião possui para metabolizar esse aditivo nessa fase do desenvolvimento, além do possível desequilíbrio hidroeletrolítico e ácido básico em resposta a osmolaridade do antibiótico (FERKET et al., 2005).

Em relação à quantificação de bactérias totais por meio do PCR em tempo real, Pedroso *et al.* (2006c, 2008) demonstraram também por meio de análises moleculares que bactérias colonizam o intestino de embriões antes do nascimento, mesmo em incubação industrial com ambiente controlado. No presente estudo, também se observou a presença de bactérias no sistema digestório de embriões, porém, não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação à quantidade relativa de bactérias totais do conteúdo digestório de embriões antes da inoculação *in ovo* dos tratamentos, possivelmente devido a mesma origem, condições ambientais e de manejo dos ovos durante a realização do experimento.

Contudo, houve diferença significativa entre os tratamentos em relação à quantidade relativa de bactérias totais do conteúdo digestório de embriões 48 horas após a inoculação *in ovo* e, as aves que receberam o probiótico + glutamina apresentaram maior média de bactérias totais comparado às que receberam antibiótico e antibiótico + glutamina. Oliveira et al. (2014) também observaram aumento de bactérias na moela e cecos de embriões, 48 horas após a inoculação de probiótico *in ovo* por meio do isolamento em meio de cultura, demonstrando também a viabilidade dessas bactérias. Além disso, na análise estatística realizada entre as colheitas, o tratamento com glutamina + probiótico foi o único que apresentou aumento significativo na quantidade de bactérias totais na segunda colheita, demonstrando a possível maior eficiência na colonização das bactérias probióticas no intestino das aves que receberam esse tratamento.

Já em relação a quantidade de *Salmonella* Heidelberg (SH) no presente estudo, houve redução de SH nos cecos de pintainhos após 24 horas do desafio quando administradas cepas de *Lactobacillus reuteri in ovo*. Edens et al. (1997), relataram que a aplicação *in ovo* de *Lactobacillus reuteri* também reduziu a quantidade de *Salmonella* spp. Barros et al. (2009) isolaram estirpes de *L. reuteri* nos cecos e inglúvio de aves e observaram a inibição *in vitro* da *S. Typhimurium* por meio da técnica *spot-on-the-lawn*.

No terceiro dia após o desafio, todos os tratamentos apresentaram significativamente ($p < 0,05$) menor quantidade de SH, quando comparados com o grupo controle. Silva et al. (2017), observaram que as bactérias probióticas administradas *in ovo* possuem efeito contra a SH até quatro dias após a eclosão. Já Leandro et al. (2004) relataram que houve diminuição de *Salmonella* Enteritidis aos 21 dias de idade das aves quando utilizado probiótico *in ovo*, demonstrando o efeito prolongado desta via de aplicação. As aves que receberam o probiótico no presente estudo, apresentaram efeito quadrático em relação a quantificação de SH nos ceco e inglúvio, ou seja, apresentaram maior efeito preventivo no início e no final da vida do frango de corte.

Desta forma, hipotetizamos que mais um tratamento com *Lactobacillus reuteri* nos primeiros dias de vida das aves que já receberam o probiótico *in ovo*, ou até mesmo o fornecimento contínuo na alimentação, poderia garantir maior eficiência na redução de SH durante toda a criação do frango.

No período de 14 dias após o desafio, o tratamento com antibiótico associado à glutamina apresentou maior quantidade de SH nos cecos, quando comparado com os demais tratamentos, incluindo o grupo controle. Bailey & Line (2001) e Edens et al. (1997) utilizaram *Gentamicina in ovo* e observaram eficiente redução de *Salmonella* spp. somente quando, logo após o nascimento, foi fornecido também um probiótico.

Tanto a quantificação de SH nos cecos (Tabela 5), quanto no inglúvio (Tabela 6) apresentaram redução de forma significativa ($p < 0,05$), a partir do décimo quarto dia após o desafio com a bactéria. Segundo Stanley et al. (2014) a colonização da microbiota intestinal começa a se estabilizar de forma tardia, próximo a idade de abate, provavelmente devido ao aumento da competitividade entre as bactérias por sítios de ligação no intestino. Além disso, no presente estudo, o controle positivo resultou em diminuição da quantidade de SH nos

cecos com o aumento da idade das aves, demonstrando que inicialmente a bactéria consegue colonizar o ceco, mas, ao longo do tempo tende a diminuir, provavelmente, devido a competição e interação com outras bactérias.

Amit-Romach et al. (2004) demonstraram por meio de uma análise de biologia molecular, maior quantidade de *Salmonella* spp. em frangos de corte até os quatro dias de idade. Portanto, o probiótico *in ovo* testado pode ter contribuído na redução da *Salmonella* spp. na fase inicial, o que refletiu na redução da bactéria na fase final. Além disso, mesmo não ocorrendo diferença significativa entre os tratamentos, aos 21 dias após o desafio com SH, os tratamentos que receberam o probiótico também apresentaram menor quantidade da bactéria nos cecos, demonstrando que, mesmo podendo ocorrer a recontaminação, o probiótico auxilia na redução da *Salmonella* spp. também na fase final, onde a negatividade do lote é importante para o sucesso do abate e comercialização do produto.

Em relação à avaliação biométrica do intestino das aves, não houve diferença significativa entre os tratamentos *in ovo* em relação ao peso do frango, peso e comprimento relativo do intestino. Entretanto, a maior média de peso relativo do intestino foi do tratamento que recebeu o probiótico + glutamina e, a maior média de peso das aves foi do tratamento que recebeu o probiótico.

A avaliação biométrica do intestino neste estudo foi realizada somente próxima a idade de abate dos frangos (39 dias de idade), quando a microbiota está praticamente estabelecida. Salmanzadeh et al. (2016) também observaram que não houve diferença significativa no peso relativo do intestino de frangos que foram suplementados com glutamina *in ovo* aos 42 dias de idade. Porém, Wu et al. (2019) observaram aumento do peso e comprimento relativo do intestino delgado de aves aos 14 dias quando suplementadas com glutamina na ração.

Desta forma, os tratamentos testados no presente estudo podem ter efeito sobre a avaliação biométrica do intestino em outras fases do desenvolvimento do frango de corte que não foram avaliadas. Principalmente porque, embora a oxidação da glutamina seja limitada nos enterócitos de aves adultas (causado por baixos níveis de RNAm para transcrição do gene da glutaminase e a baixa atividade desta enzima comparada aos mamíferos), estudos recentes demonstram que seu fornecimento precoce resulta em melhora na morfologia da

mucosa intestinal, decorrente do exponencial desenvolvimento do intestino das aves na fase inicial de vida (YI et al., 2005; BARTELL & BATAL, 2007; MURAKAMI et al., 2007; TAVASSOLI et al., 2011; SALMANZADEH et al., 2016).

Entretanto, na avaliação morfológica da mucosa intestinal no duodeno, três dias após o desafio, os tratamentos que receberam o antibiótico + glutamina, probiótico e controle negativo apresentaram maior altura de vilo em comparação aos que receberam antibiótico e o controle positivo. Além disso, no Jejuno a profundidade de cripta foi maior no tratamento com antibiótico + glutamina em comparação aos que receberam o probiótico + glutamina e o controle positivo. Os antibióticos demandam alta energia para metabolização, principalmente em embriões que ainda estão em desenvolvimento. Essa energia pode ser necessária para o desenvolvimento intestinal e para acelerar a rotatividade celular das criptas (PELICANO et al., 2007). Desta forma, a glutamina pode ter sido a fonte de energia necessária para a reposição de enterócitos no tratamento que recebeu antibiótico + glutamina.

No jejuno, o tratamento com probiótico apresentou maior altura de vilo quando comparado com os demais tratamentos, incluindo os controles. Awad et al. (2009) e Beski et al. (2015) relataram que a suplementação da dieta com simbióticos melhorou a morfologia intestinal. Vineetha et al. (2016) também observaram maior altura de vilo e profundidade de cripta em aves suplementadas com probióticos, em comparação ao antimicrobiano químico testado (*Bacitracin methylene Disalicylate* – BMD).

Jozefiak et al. (2004) relataram que bactérias probióticas também podem agir produzindo enzimas amilolíticas, celulolíticas, proteolíticas e lipolíticas que melhoram a digestibilidade dos nutrientes fornecendo mais energia para o desenvolvimento da mucosa intestinal. Neste estudo, o tratamento com probiótico também resultou em maior profundidade de cripta no duodeno, quando comparado com os controles. Desta forma, a administração do probiótico *in ovo* pode ter auxiliado no desenvolvimento e renovação dos enterócitos nas aves, o que por sua vez ajudou a manter a integridade da mucosa intestinal e possibilitou mais sítios de ligação para bactérias benéficas resultando em menor quantidade de SH nos cecos.

No íleo, o tratamento com probiótico apresentou maior média de altura de vilo em relação às aves que receberam antibiótico e glutamina sem associação. Ainda, o tratamento com probiótico apresentou maior profundidade de cripta do que os tratamentos que receberam o antibiótico e o controle negativo. A diminuição da altura dos vilos em aves que receberam o antibiótico pode estar relacionada a eliminação de bactérias importantes para a extração de nutrientes ou até mesmo relacionada ao gasto energético para metabolização do antibiótico, como já mencionado anteriormente. Miles et al. (2006) e Vineetha et al. (2016) também relataram menor altura de vilo em frangos que receberam antimicrobianos na ração. Contudo, existem poucos estudos sobre o efeito dos antibióticos na morfologia intestinal de frangos (UNI et al., 1999; GEYRA et al., 2001).

Já em relação a morfologia intestinal no 21º dia após o desafio com SH, houve diferença significativa em relação à altura de vilo somente no íleo, sendo que o controle positivo apresentou maior altura de vilo que o tratamento com probiótico + glutamina. O tratamento com glutamina resultou em menor profundidade de cripta do que os demais tratamentos no duodeno e, no íleo tratamento com glutamina apresentou menor profundidade de cripta do que os controles.

Em situações em que o desenvolvimento e a manutenção da mucosa intestinal estão ocorrendo de forma eficiente, a glutamina pode não ocasionar benefício adicional, como ocorreu neste estudo, onde a glutamina só contribuiu no desenvolvimento da mucosa intestinal em aves que receberam também o antibiótico, principalmente na fase inicial.

Em relação a quantificação de *Lactobacillus* spp. do conteúdo cecal, um dia após o desafio, o tratamento que recebeu antibiótico + glutamina apresentou maior concentração de *Lactobacillus* spp. do que o tratamento com glutamina + probiótico. Após 37 dias do desafio, todos os tratamentos tiveram aumento de *Lactobacillus* spp. e os tratamentos que receberam antibiótico + glutamina e somente glutamina resultaram em maior quantidade de *Lactobacillus* spp. do que os tratamentos com glutamina + probiótico e probiótico isoladamente.

Diante desse resultado, o mecanismo de ação das cepas de *Lactobacillus reuteri* pode não ser somente a exclusão competitiva por sítios de ligação e nutrientes, como já descrito por Corcionivoschi et al. (2010). É possível que o

aumento do comprimento de vilo e o *quórum sensing* (REIS et al., 2019), possibilite a maior colonização e multiplicação de outras espécies benéficas, além da produção de metabólitos que podem ter inibido direta ou indiretamente a SH. A modulação imunológica, também pode ter contribuído para maior eficiência no controle da SH mesmo com a menor quantidade de *Lactobacillus* spp nos tratamentos que receberam o probiótico (BARBOSA et al., 2010).

Ainda, como a análise molecular realizada foi para a quantificação do gênero e não da espécie presente no probiótico (*Lactobacillus reuteri*), ou seja, provavelmente o resultado teve interferência da colonização natural por outras espécies de *Lactobacillus* spp. presentes no ambiente. Pedroso et al. (2005) compararam a microbiota de embriões e pintainhos antes do alojamento nos aviários e observaram que, há intensa colonização por diversas espécies de bactérias durante esse período.

Além disso, os antibióticos modulam a microbiota, ou seja, reduzem algumas bactérias para proporcionar o desenvolvimento de outras (SOARES, 1996), e quando associados a um agente trófico como a glutamina, pode possibilitar maior colonização por *Lactobacillus* spp. presentes no ambiente, como ocorrido neste estudo.

Contudo, a utilização de antibióticos, sem reposição da microbiota controlada por meio de probióticos comerciais, pode facilitar a infecção por enterobactérias patogênicas, podendo favorecer também, a expressão de genes de resistência a antimicrobianos facilmente transmitidos entre bactérias não probióticas. A exemplo do antibiótico utilizado neste estudo, que já foi relatado como responsável pela resistência de *Escherichia coli* em pintainhos de um dia (SARAIVA et al., 2018), além de estar entre os antimicrobianos de maior importância para a saúde humana (COLLIGNON et al., 2016), representando um risco para a saúde única.

CONCLUSÕES

Os *Lactobacillus reuteri* colonizam efetivamente o sistema digestório de embriões, quando fornecidos *in ovo*.

A glutamina *in ovo* melhora a eclodibilidade, enquanto que o antibiótico *in ovo* reduz a eclodibilidade.

A inoculação de probiótico *in ovo*, além de não afetar a eclodibilidade, mostrou-se eficaz na redução de *Salmonella* Heidelberg em frangos.

O probiótico *in ovo* aumenta o comprimento do vilo e a profundidade da cripta, enquanto que o antibiótico causa encurtamento dos vilos, à exceção quando associado com a glutamina.

Por fim, a maior concentração de *Lactobacillus spp.* nos cecos não está associada a maior proteção contra *Salmonella* Heidelberg, sendo importante considerar outros possíveis mecanismos de ação dos *Lactobacillus reuteri*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNI, Z. Microflora Ecology of the Chicken Intestine Using 16S Ribosomal DNA Primers. *Poultry Science*, v. 83, p.1093-1098, 2004.
- ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; MARTÍNEZ, M. A. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.45, p. 91-95, 2006.
- ANDREATTI FILHO, R. L.; SILVA, E. N.; CURI, P. R. Ácidos orgânicos e microbiota cecal anaeróbia no controle da infecção experimental de frangos por *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.49, p.661-672, 1997.
- ANDREATTI FILHO, R. L.; MESTRINEL, J. R. P.; SAMPAIO, H. M.; CROCCI, A. J. Efeito da vacina contra coccidiose sobre a colonização de *Salmonella* Enteritidis em aves inoculadas com microbiota cecal anaeróbica. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.51, p.311-316, 1999.
- ANDREATTI FILHO, R. L.; SAMPAIO, H. M. C. Probióticos e prebióticos. *Avicultura Industrial*, n.1078, p.16-32, 2000.
- ANDREATTI FILHO, R. L. Sorovares de *Salmonella* isolados de materiais avícolas no período de 1994 a 1999. *Revista de Educação Continuada - Conselho Regional de Medicina Veterinária (CRMV-SP)*, v. 4, p. 90-101, 2001.
- ANDREATTI FILHO R. L.; SILVA E. N. Probióticos e correlatos na produção avícola. In: PALERMO NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC S. L. *Farmacologia aplicada à avicultura*. São Paulo: Roca, 2005. Cap.15, p.225-248.
- ANDREATTI FILHO, R. L.; OKAMOTO, A. S.; LIMA, E. T.; GRATAO, 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. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.58, n. 4, p. 467-471, 2006.

ANDREATTI FILHO, R.L. *Saúde Aviária e Doenças*. São Paulo: Roca, 2007. 41-51p.

BAILEY J. S.; LINE E. *In ovo* Gentamicin and Mucosal Starter Culture to Control *Salmonella* in Broiler Production. *Journal of Applied Poultry Research*, v. 10, p.376-379, 2001.

BARBOSA, F. H. F.; MARTINS, F. S.; BARBOSA, L. P. J. L.; NICOLI, J. R. Microbiota indígena do trato gastrointestinal. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 10, n.1, p. 78-93, 2010.

BARROS, M. R.; ANDREATTI, R. L.; LIMA, E. T. ; CROCCI, J. A. Avaliação in vitro da atividade inibitória de *Lactobacillus* spp., isolados do ingluvío e cecos de aves sobre *Salmonella*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, n. 4, p. 863-868, 2009.

BARTELL, S. M.; BATAL, A. B. The effect of supplemental glutamine on growth performance, development of the gastrointestinal tract, and humoral immune response of broiler. *Poultry Science*, v. 86, p. 1940–1947, 2007.

BEAL, R. K.; POWERS, C.; DAVISON, T.F.; SMITH, A.L. Immunological development of the avian gut in: PERRY, G.C. *Avian Gut Function in Health and Disease*, *Cab International Wallingford*, v. 28, cap. 6, p. 85-103, 2006.

BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FABIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. 2 ed. *Doenças das aves*. Campinas: FACTA, 2009, 391-429p.

BESKI, S. S. M.; AL-SARDARY, S. Y. T. Effects of dietary supplementation of probiotic and symbiotic on broiler chicken's hematology and intestinal integrity. *International Journal of Poultry Science*, v. 14, p. 31-36, 2015.

BORGES, I.; BONATO, M. Relação Entre a Microbiota Intestinal e Sistema Imune Inato: O papel da Parede Celular de Levedura neste Processo. *O Presente Rural*, v. 168, p. 38-39, 2019.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. *Salmonella* na segurança dos alimentos. *O Biológico*, v.70, n.1, p.11-13, 2008.

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

CHEN, W.; WANG, R.; WAN, H. F.; XIONG, X. L.; PENG, P.; PENG, J. Influence of *in ovo* injection of glutamine and carbohydrates on digestive organs and pectoralis muscle mass in the duck. *British Poultry Science*, v. 50, n. 4, p. 436-442, 2009.

COLLIGNON, P. C.; CONLY, J. M.; ANDREMONT, A.; MCEWEN, S. A.; AIDARA-KANE, A.; AGERSO, Y.; NINH, T. D.; DONADO-GODOY, P.; FEDORKA-CRAY, P.; FERNANDEZ, H.; GALAS, M.; IRWIN, R.; KARP, B.; MATAR, G.; MCDERMOTT, P.; MITEMA, E.; REID-SMITH, R.; SCOTT, H. M.; SINGH, R. World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies to control antimicrobial resistance from food animal production. *Clinical Infectious Disease*, v.63, p.1087–1093, 2016.

CORCIONIVOSCHI, N.; DRINCEANU, D.; POP, I. M.; STACK, D.; STEF, L.; JULEAN, C.; BOURKE, B. The effect of probiotics on animal health. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, n. 43, p.35-41, 2010.

CORRY, J. E. L.; ALLEN, V. M.; HUDSON, W. R.; BRESLIN, M. F.; DAVIES R. H. Sources of *Salmonella* on broiler carcasses during transportation and processing: modes of contamination and methods of control. *Journal of Applied Microbiology*, v. 92, p. 424–432, 2002.

DIANIN, K. C. S. *Indicadores de higiene e pesquisa de Salmonella spp. Em linha de abate e processamento de frango de corte*. 2016. 62f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Palotina.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. 1997. *Tratado de Anatomia Veterinária*. 2ª ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1997. 663p.

EDENS, F. W.; PARKHURST, C. R.; CASAS, I. A.; DOBROGOSZ, W. J. Principles of *ex ovo* competitive exclusion and *in ovo* administration of *Lactobacillus reuteri*. *Poultry Science*, v.76, p.179–196, 1997.

FERKET, P.; DE, J.; GHANE, A.; UNI, Z. Effects of in ovo feeding solution osmolality on hatching turkey, *Poultry Science*, n. 84, p.117–121, 2005.

FERNANDES, J. I. M.; PROKOSKI, K.; OLIVEIRA, B. C.; ORO, C. S.; ORO, P. J.; FERNANDES, N. L. M. Evaluation of Incubation Yield, Vaccine Response, and Performance of Broilers Submitted to In-Ovo Vaccination at Different Embryonic Ages. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v.18, p.55-63, 2016.

FORSHYTE, S. J. *Microbiologia da segurança dos alimentos*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 607p.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. In: SIMPÓSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MATRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO, 5., 2004. *Anais...* Balneário Camboriú: UNESP, 2004. p. 6-28.

GEYRA, A., UNI, Z.; SKLAN, D. Enterocyte dynamics and mucosal development in the post hatch chick. *Poultry Science*, v. 80, p. 776–782, 2001.

GIVISIEZ, P. E.N.; MOREIRA FILHO, A. L.B.; SANTOS, M. R.B.; OLIVEIRA, H. B.; FERKET, P. R.; OLIVEIRA, C.J.B.; MALHEIROS, R. D. Chicken embryo development: metabolic and morphological basis for *in ovo* feeding technology. *Poultry Science*, v. 99, n.12, p. 6774–6782, 2020.

GOLDER, H. M., GEIER, M. S., FORDER, R. E. A., HYND, P. I.; HUGHES, R. J. Effects of ecrotic enteritis challenge on intestinal micro-architecture and mucin profile. *British Poultry Science*, v.52, n.4, p. 500-506, 2011.

GONG, J.; SI, W.; FORSTER, R. J.; HUANG, R.; YU, H.; YIN, Y.; YANG, C.; HAN, Y. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts from crops to ceca. *Microbiological Ecology*, v. 59, p.147–157, 2007.

GONZALES, E.; MELLO, H. H. C; CAFÉ, M. B. Uso de Antibióticos Promotores de Crescimento na Alimentação e Produção Animal. *Revista UFG*, n.13, p. 48-53, 2012.

GONZALEZ-MIRET, M. L.; ESCUDERO-GILETE, M. L.; HEREDIA, F. J. The establishment of critical control points at the washing and air chilling stages in poultry meat production using multivariate statistic. *Food Control Reading*, v.17, p. 935-945, 2006.

GRIMONT, P.A.D; WEILL, WHO, F. *Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella. Antigenic formulas of the Salmonella serovars*. 9 ed. Paris: Institute Pasteur, 2007.7-9p.

GONÇALVES, F. M.; SANTOS, V. L; CONTREIRA, C. L.; FARINA, G.; KREUZ, B. S.; GENTILINI, F. P.; ANCIUTI, M. A.; RUTZ, F. Nutrição in ovo: estratégia para nutrição de precisão em sistemas de produção avícola. *Archivos de Zootecnia*, v. 62, p. 46 -55, 2013.

HUYGHEBAERT, G. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Veterinary Journal*, v.187, p.182-188, 2011.

JÓZEFIK, D. RUTKOWSKI, A.; MARTIN, S. A. Carbohydrate fermentation in the avian ceca: a review. *Animal Feed Science and Technology*, v. 113, n. 1-15, 2004.

KURITZA, L. N.; WESTPHAL, P.; SANTIN, E.; Probióticos na avicultura. *Ciência Rural*, v.44, n.8, p.1457-1465, 2014.

LEANDRO, N. S. M.; OLIVEIRA, A. S. C.; ANDRADE, M. A.; STRINGHINE, J. H., ANDRADE, L; CHAVES, L.; SILVA, T. R. Efeito de probiótico inoculado via ovo sobre o desempenho e colonização do trato gastrointestinal por “*Salmonella Enteritidis*” de pintos desafiados. In: 41º REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. 2004. Campo Grande. Resumos... Campo Grande: SBZ, 2004.

LEE, K.; LILLEHOJ, H.; SIRAGUSA, G. R. 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.; OKAMOTO, A. S.; NOUJAIM, J. C.; BARROS, M. R.; CROCCI, A. J. Evaluation in vitro of the antagonistic

substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 71, n. 2, p. 103–107, 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.

LU, J.; IDRIS, U.; HARMON, B.; HOFACRE, C.; MAURER, J. J.; LEE, M. D. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p.6816-6824, 2003.

MACARI, M.; LUNEDO, R.; PEDROSO, A. A.; Microbiota intestinal das aves. In MACARI, M.; MENTEN, J. F. M.; MENDES, A. A.; NAAS, I. A. *Produção de Frangos de Corte*, 2ª ed. São Paulo: FACTA, 2014. Chap. 15. p.3-22.

MADEJ, J. P; SKONIECZNA, J.; SIWEK, M.; KOWALCZYK, A.; ŁUKASZEWICZ, E.; SLAWINSKA, A. Genotype-dependent development of cellular and humoral immunity in the spleen and cecal tonsils of chickens stimulated *in ovo* with bioactive compounds, *Poultry Science*, v.99, p. 4343-4350, 2020.

MAIORKA, A.; SANTIN, E.; SUGETA, S. M. ALMEIDA, J. G.; MACARI, M. Utilização de Probióticos, Probióticos ou Simbióticos em Dietas para Frangos. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.3, n.1, 2001.

MAIORKA, A. SILVA, A.V.F.; SANTIN, S.; BORGES, S. A.; BOLELI, I. C.; MACARI, M. Efeito da Idade da Matriz, do jejum, da energia da ração e da glutamina sobre o desenvolvimento da mucosa intestinal e atividade enzimática do pâncreas de pintos de corte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, n.5, 2002.

MAIORKA, A. Impacto Da Saúde Intestinal Na Produtividade Avícola. In: V SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 2004. *Anais...* Chapecó, 2004. p. 119-129.

MALLINSON, E.T.; SNOEYENBOS, G. H. Salmonellosis. In: PURCHASE, H. G.; ARP, L. H.; DOMERMUTH, C. H.; PEARSON, J. E. *A laboratory manual for*

the isolation and identification of avian pathogens. 3rd ed. Pennsylvania: American Association of Avian Pathologists. 1989.

MANEEWAN, B; YAMAUCHI, K. Recovery of duodenal villi and cells in chickens refed protein, carbohydrate, and fat. *British Poultry Science*, v. 46, p.415-423, 2005.

MILES, R. D.; BUTCHER, G. D.; HENRY, P. R.; LITTELL, R. C. Effect of antibiotic growth promoters on broiler performance, intestinal growth parameters, and quantitative morphology. *Poultry Science*, v. 85, n.3, p. 476–485, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual técnico de Normas de Diagnóstico da Salmonella spp.* 1^a ed. Brasília: Ministério da saúde, 2011. 5-13p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim especial de doenças negligenciadas. 2021. 30-31p.

MOTA, R. A.; DA SILVA, K. P. C.; DE FREITAS, M. F. L.; PORTO, W. J.; DA SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição à multirresistência bacteriana. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 42, n. 6, 2005.

MORAES, A. C. I. *Avaliação do mecanismo de quórum sensing entre Lactobacillus spp. contra a Salmonella Heidelberg em frangos de corte. Indicadores de higiene e pesquisa de Salmonella spp.* 2019. 62f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

MURAKAMI, A. E.; SAKAMOTO, M. I.; NATALI, M. R. M.; SOUZA, L. M. G.; FRANCO, J. R. G. Supplementation of glutamine and vitamin E on the morphometry of the intestinal mucosa in broiler chickens. *Poultry Science*, v. 86, p. 488–495, 2007.

NAKPHAICHIT, M.; THANOMWONGWATTANA, S.; PHRAEPHAISARN, C.; SAKAMOTO, N.; KEAWSOMPONG, S.; NAKAYAMA, J.; NITISINPRASERT, S. The effect of including *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 during post-hatch feeding on the growth and ileum microbiota of broiler chickens. *Poultry Science*, v. 90, p. 2753- 2765, 2011.

OAKLEY, B.B.; LILLEHOJ, H. S.; KOGUT, M. H.; KIM, W. K.; MAURER, J. J.; PEDROSO, A. A., LEE, M. D.; COLLETT, S. R.; JOHNSON, T. J.; COX, N. A. The chicken gastrointestinal microbiome. *Microbiology Letters*, v. 360, n. 2, p. 100–112, 2014.

OGAWA, V. A.; SHAH, C. M.; HUGHES, J. M.; KING, L. J. Prioritizing a One Health Approach in the Immediate Fight Against Antimicrobial Resistance. *Eco Health*, v.16, p. 410–413, 2019.

OHIMAIN, E. I.; OFONGO, R. T. S. The Effect of Probiotic and Prebiotic Feed Supplementation on Chicken Health and Gut Microflora: A Review. *International Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 4, n. 2, p.135 – 143, 2012.

OHTA, Y.; YOSHIDA, T.; TSUSHIMA, N. Comparison between broilers and layers for growth and protein use by embryos. *Poultry Science*, v.83, n.5, p.783-787, 2004.

OHTA, Y.; KIDD, M.T. Optimum site for *in ovo* amino acid injection in broiler breeder eggs. *Poultry Science*, v.80, n.10, p.1425-1429, 2001.

OLIVEIRA, J. E.; VAN DER HOEVEN-HANGOOR, E.; VAN DE LINDE, I.B.; MONTIJN, R. C.; VAN DER VOSSEN, J. M. B. M. *In ovo* inoculation of chicken embryos with probiotic bacteria and its effect on post hatch *Salmonella* susceptibility. *Poultry Science*, v. 93, n. 4, p. 818–829, 2014.

ORO, C. S.; DE SOUZA, F. E. Z.; RODRIGUES, W. C.; ORO, J. S.; GUIRRO, E. C. B. P. Evaluation of the Relationship Between the Breeder's Age, Breed and the Incubator Types on Quality and Animal Welfare in the Hatchery. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v.21, n.3, 2019.

ORO, S C.; OKAMOTO, A. S.; DOS SANTOS, C. B. T.; DE SANTANA, E. H. A. S.; RIBEIRO, G. C.; GUIRRO, E. C. B. P. Causas de perdas em abatedouro de frango de corte relacionadas ao manejo pré-abate. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 27, n.4, 2020.

PEDROSO, A.A.; MENTEN, J.F.M.; LAMBAIS, M.R. The Structure of Bacterial Community in the Intestines of Newly Hatched Chicks. *Journal of Applied Poultry Research*, v.14, iss. 2, p. 232-237, 2005.

PEDROSO, A.A.; CHAVES, L.S.; LOPES, K.L.A.M. CAFÉ, M.B.; LEANDRO, N.S.M.; STRINGHINI, J.H. Inoculação de nutrientes em ovos de matrizes pesadas. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.35, n.5, p.2018-2026, 2006a.

PEDROSO, A. A.; CHAVES, L. S.; LOPES, K. L. A. M.; LEANDRO, N. S. M.; CAFÉ, M. B.; STRINGHINI, J. H. Inoculação de nutrientes em ovos de matrizes pesadas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 35, n.5, p.2018-2026, 2006b.

PEDROSO, A. A.; MENTEN, J. F. M.; LAMBAIS, M. R.; RACANICCI, A. M. C.; LONGO, F. A.; SORBARA, J. O. B. Intestinal bacterial community and growth performance of chickens fed diets containing antibiotics. *Poultry Science*, v. 85, p.747-752, 2006c.

PEDROSO, A.A. J. J.; MAURER, D.; DLUGOLENSKI, M. D. LEE. Embryonic chicks may possess an intestinal bacterial community within the egg. In: GENERAL MEETING AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 108., *Abstracts...* Washington: American Society for Microbiology, 2008.

PELICANO, E. R. L.; SOUZA, P. A.; SOUZA, P. A.; FIGUEIREDO, D. F.; BOIAGO, M. M.; CARVALHO, S. R.; BORDON, V. F. Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v. 7, p.221– 229, 2005.

PELICANO, E. R. L.; SOUZA, P. A.; SOUZA, H. B. A.; FIGUEIREDO, D. F.; AMARAL, C. M. C. Morphometry and ultra-structure of the intestinal mucosa of broilers fed different additives. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v.9, n.3, p.173-180, 2007.

PULIDO-LANDÍNEZ, M.; SÁNCHEZ-INGUNZA, R. GUARD, J.; PINHEIRO DO NASCIMENTO. V. Assignment of serotype to *Salmonella enterica* isolates obtained from poultry and their environment in southern Brazil. *Applied Microbiology*, v. 5, issue 4, 288-294, 2013.

RETES, P. L.; CLEMENTE, A. H. S.; NEVES, D. G.; ESPÓSITO, M.; MAKIYAMA, L.; ALVARENGA, R. R.; PEREIRA, L. J.; ZANGERONIMO, M. G.

In ovo feeding of carbophydrates for broilers – a systamatic review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 102, p. 361–369, 2018.

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. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 6, n. 4, 2016.

ROCHA, T. S. BAPTISTA, A. A. S.; DONATO, T. C.; MILBRADT, E. L.; OKAMOTO, A. S.; RODRIGUES, J. C. Z.; COPPOLA, M. P.; ANDREATTI FILHO, R. L. Avaliação da adesão in vitro e in vivo e efeito imunomodulador de linhagens de espécies de *Lactobacillus* isoladas de galinhas. *Poultry Science*, v. 91, ed. 2, p. 362–369, 2012.

ROCHA, T. P. MESQUITA, A. J.; ANDRADE, M. A.; LOULY, P. R.; NASCIMENTO, M.N. *Salmonella* spp. em forros de caixa de transporte e órgãos de pintos de um dia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.55, n.6, p.672-676, 2003.

RODRIGUES, A. C. A. Pontos críticos de controle de *Salmonella* spp. no abate de frangos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, n.2, 2009.

RUFINO, J. P. F.; CRUZ, F. G. G.; FARIAS, T. M.; MELO, L. D. Uso de aminoácidos na alimentação *in ovo*. *Revista Científica de Avicultura e Suinocultura*, v. 4, n. 2, 2018.

SALMANZADEH, M.; EBRAHIMNEZHAD, Y.; AGHDAM SHAHRYAR, H.; GHIASI GHALEH-KANDI, J. The effects of *in ovo* feeding of glutamine in broiler breeder eggs on hatchability, development of the gastrointestinal tract, growth performance and carcass characteristics of broiler chickens, *Archives Animal Breeding*, v. 59, p. 235–242, 2016.

SARAIVA, M. M. S. MOREIRA FILHO, A. L. B. FREITAS NETO, O. C. SILVA, N. M. V. GIVISIEZ, P. E. N. GEBREYES, W. A.; OLIVEIRA, C. J. B. Off-label

use of ceftiofur in one-day chicks triggers a short-term increase of ESBL-producing *E. coli* in the gut. *PLoS One*, v. 13, n. 9, p. e0203158, 2018.

SILVA, E. N.; ANDREATTI FILHO, R. L. Probióticos e prebióticos na avicultura. In: SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA, 2., 2000, Santa Maria. *Anais...* Santa Maria: UFSM, 2000. p. 45-55.

SILVA I. G. O.; VELLANO IHB.; MORAES AC.; LEE IM.; ALVARENGA B.; MILBRADT EL.; HATAKA A.; OKAMOTO AS.; ANDREATTI FILHO RLI. Evaluation of a Probiotic and a Competitive Exclusion Product Inoculated *In ovo* on Broiler Chickens Challenged with *Salmonella* Heidelberg. *Brazilian Journal of Poultry Science*. v.19, n.1, 019-026, 2017.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos: Salmonella*. 3.ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 253-285p.

SOARES, L.L.P. Restrições e uso de aditivos (promotores de crescimento) em ração de aves. Visão do fabricante. Curitiba, PR, 1996. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 1996, Anais... Curitiba: Apinco, 1996, p.27-36.

STANLEY, D.; HUGHES, R. J.; MOORE, R. J. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract, productivity, and disease. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.98, n.10, p.4301-4310, 2014.

SUINOCULTURA INDUSTRIAL. Pesquisa do USDA apoia glutamina como alternativa para antibióticos. 2018. Disponível em: <https://www.suinoculturaindustrial.com.br/imprensa/pesquisa-do-usda-apoia-glutamina-como-alternativa-para-antibioticos/20180201-151250-x403>.

Acessado em: 15 abr. 2019.

TAVASSOLI, M.; MOUSAVI, S. N.; ABEDINI, M. R. Effects in ovo feeding of glutamine on performance, small intestine morphology, and immune response of broiler chicks. *Journal of Animal Environment*, v. 3, n. 2, 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.

UNI, Z.; NOY, Y.; D. SKLAN. Post hatch development of small intestinal function in the poult. *Poultry Science*, v. 78, p.215–222, 1999.

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, 2003.

UNI, Z.; FERKET, P. R.; TAKO, E.; KEDAR, O. *In ovo* feeding improves energy status of late-term chicken embryos. *Poultry Science*, v. 84, p. 764-770, 2005.

UNI, Z.; YADGARY, L.; YAIR, R. *Journal Applied of Poultry Research*, v. 21, p. 175-184, 2012.

VIEIRA, S. L.; MORAN, E. T. Eggs and chicks from broiler breeders of extremely different age. *Journal of Applied Poultry Research*, v.7, n.2, p.372-376, 1998.

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.

VON RÜCKERT, D. A. S; PINTO, P. S. A; SANTOS, B. M; MOREIRA; M. A. S;

YAMAWAKI, R. A.; MILBRADT, E. L.; COPPOLA, M. P.; RODRIGUES, J. C. Z.; ANDREATTI FILHO, R. L.; PADOVANI, C. R.; OKAMOTO, A. S. Effect of

immersion and inoculation *in ovo* of *Lactobacillus* spp. in embryonated chicken eggs in the prevention of *Salmonella* Enteritidis after hatch. *Poultry Science*, v.92, n.6, p.1560-1563, 2013.

YI, G. F.; ALLEE, G. L.; KNIGHT, C. D.; DIBNER, J. J. Impact of glutamine and Oasis hatchling supplement on growth performance, small intestinal morphology, and immune response of broilers vaccinated and challenged with *Eimeria maxima*. *Poultry Science*, v. 84, p.283–293, 2005.

WISE, M. G.; SIRAGUSA, G. R. Quantitative analysis of the intestinal bacterial community of one- to three-week-old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic-free vegetable-based diets. *Journal of Applied Microbiology*, v. 102, p. 1138– 1149, 2007.

WU, Q. J.; JIAO, C.; LIU, Z. H.; LI, S. W.; ZHU, D. D.; MA, W. F.; WANG, Y. Q.; WANG, Y.; WU, X. H. Effect of glutamine on the intestinal function and health of broilers challenged with *Salmonella* Pullorum. *Indian Journal of Animal Research*, v. 53, Issue 9, 2019.

ZAR, J. H. Biostatistical analysis. Sed. New Jersey: Prentice-Hall, 2009.

TRABALHO CIENTÍFICO

Submissão realizada para a revista “*JOURNAL OF APPLIED POULTRY RESEARCH*”

PROBIOTIC AND GLUTAMINE IN OVO - EVALUATION OF EXPOSED BROILERS TO *SALMONELLA* HEIDELBERG

Camila de Souza Oro^{*,1}, Caio Cesar dos Ouros †, Gabriella Costa Ribeiro*, Cauê Bastos Tertuliano dos Santos*, Adriano Sakai Okamoto*, Alessandre Hataka*, Gustavo Nunes de Moraes*, Elisane Lenita Milbradt*, Raphael Lúcio Andreatti Filho*

****Department of Clinical Veterinary Medicine Animal, College of Veterinary Medicine and Animal Sciences, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil;***

†Department of Animal Production, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil;

SUMMARY

Salmonella Heidelberg (SH) is a bacterium that causes great economic damage to Brazilian poultry production. The indiscriminate use of antibiotics in poultry farming induces resistance to this microorganism. In this way, natural products are alternatives for replacing antibiotics, also contributing to the maintenance of the intestinal health of birds. Thus, the objective of the experiment was to evaluate the effect of probiotic and

glutamine *in ovo* in broiler chickens exposed to SH. The experimental design was completely randomized with seven treatments. The *in ovo* treatments evaluated (probiotic, glutamine, and an antibiotic) were mixed with the vaccine against Marek and Gumboro disease. The exposure to SH occurred 24 hours after chick placement. Data was subjected to analysis of variance, Tukey, and Dunn test, with a significance level of 5%. All treatments that received glutamine *in ovo* showed better ability to hatch. Embryos that received the treatment with probiotic + glutamine had a greater number of total bacteria in the digestive tract than those that received antibiotics. The treatment with the probiotic, associated or not, with glutamine, showed a lower amount of SH when compared to the other treatments. Three days after exposure, the treatment that received the probiotic showed greater villus height and greater crypt depth in the duodenum, jejunum, and ileum compared to the treatment that received the antibiotic. Therefore, glutamine *in ovo* improves the hatchability and probiotic *in ovo* reduces the amount of *Salmonella* Heidelberg, in addition to increasing the villus height and crypt depth in broilers.

Key words: broiler, gut health, hatching, salmonellosis.

DESCRIPTION OF PROBLEM

Salmonella spp. it is a bacterium that is difficult to control and frequently found in Brazilian poultry industry (Guard et al., 2018), resulting in great economic loss due to embargoes on exports, elimination of poultry and product disposal (Pandini et al., 2015), in addition to some serotypes, such as *Salmonella* Heidelberg (SH), representing a risk to public health because they result in food-borne illness (DTA) (Andreatti Filho, 2001).

In Brazil, food outbreaks are still under-diagnosed, those that affect many people or when symptoms last longer are usually reported (Santos et al., 2020). During the years 2007 - 2019, over 9.030 outbreaks of DTA were reported in Brazil and, of these reported outbreaks, 3.275 (36.27%) had the identification of an etiological agent, with *Salmonella* spp. being responsible for 24.8% of the cases (Brazilian Ministry of Health, 2021).

To prevent and control contamination by enteric pathogens, such as *Salmonella* spp., poultry companies frequently use chemical antimicrobials (Lorenço et al., 2007; Kumar et al., 2019), however, their non-rational use facilitates the resistance of these microorganisms (Velasquez et al., 2018; Borges and Bonato, 2019).

In this context, natural products emerged as a valuable alternative for replacing chemical antimicrobials in poultry, through the maintenance of intestinal health (Patterson and Burkholder, 2003; Syngai et al., 2016). Therefore, this study aimed to evaluate the ability to hatch and prophylactic effect of probiotic and glutamine *in ovo* in chickens exposed to *Salmonella* Heidelberg.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals on Experimentation and Research at the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science at UNESP/Botucatu, under protocol number: 0101/2019.

A total of 7.056 eggs of the Cobb breed were used, originating from the same production nucleus of a commercial hatchery free of *Salmonella* spp., coming from 60-week-old breeding stock.

The experiment was divided into two stages:

- Step A, the assessment was carried out in the hatchery.
- In step B, the evaluation was carried out at the infectious laboratory.

Experimental design fase A

The experimental design was completely randomized, with the same number of eggs for each treatment, except for the negative control, where twice as many eggs were incubated, later separated in the second stage of the experiment. In total there were six treatments with four replications. In the egg reception room, before incubation, the trays were selected, identified, and placed in the same positions on the different carts. Each egg cart received a treatment.

For real-time PCR analysis, two fertilized eggs per repetition were used. For the evaluation of the ability to hatch, the total number of fertilized eggs present in the hatcher box was used (168 fertilized eggs), bringing to a total of 672 fertilized eggs per treatment.

Eggs and facilities

In the hatchery, the eggs were stored for two days at a temperature of 18°C before being incubated. Eggs were placed in single-stage incubators (Jamesway). A pre-heating of 8 hours was carried out in an increasing and linear fashion, inside the incubator itself, until reaching the recommended initial temperature (38°C). The parameters used in the incubation during the experiment were:

- Incubator: temperature between 38.0°C to 36.3°C, 70% to 40% relative humidity and 10000 to 3500 ppm of CO₂.

- Birthing Incubator: temperature between 36.8°C to 35.6°C, 68% to 40% relative humidity and 4000 to 3200 ppm of CO₂.

Before automatic transfer to the hatchers, with 18 days and 6 hours of embryonic development, the eggs were vaccinated *in ovo* (Embrex - Zoetis) with the vaccines: Gumboro (Cevac Transmune IBD - Ceva) and Marek (Poultvac CVI-HVT - Zoetis), at a dose of 0.05 mL/egg.

In ovo vaccination was performed using a double needle system, with a built-in disinfection system with sodium hypochlorite. The internal needle was adjusted to reach the amniotic fluid.

Each additive, according to the treatments, was included together with the vaccine diluent, a 400 mL bag with a capacity to inoculate eight thousand eggs. For better control, a dye was alternately added to the vaccine diluent to indicate a change in treatment. In addition, eggs that were not part of the experiment were interspersed between treatments, to avoid any traces of the previous additive.

The treatments used were negative control (not exposed and did not receive additive *in ovo*), glutamine (10% concentration), probiotic (with five strains of *Lactobacillus reuteri* 10¹⁰ UFC/mL) associated with glutamine, only the probiotic, Antibiotic (ceftiofur hydrochloride at a dose of 0.2 mg/mL) and, finally, antibiotic associated with glutamine.

While at the hatcher, during incubation, every eight hours a device released formaldehyde to reduce the level of contamination at the time of birth. In all, 2.7 litres of formaldehyde were used in the hatcher (7 mL per egg).

Já no nascedouro, durante a incubação, de oito em oito horas um dispositivo liberou formaldeído para reduzir o nível de contaminação no momento do nascimento. Ao todo foram utilizados 2,7 litros de formaldeído no nascedouro (7 mL por ovo).

Parameters evaluated in step A

Hatchability

At the time of transferring the eggs from the incubator to the hatcher, candling was performed with the aid of a vaccination machine. Infertile eggs counted and removed. Post-hatching, hatched eggs have been counted, and hatchability was calculated (dividing the number of hatched eggs by the number of fertile eggs incubated in the hatcher) according to the methodology carried out by Fernandes et al. (2016).

Molecular quantification of total bacteria

Sample collection was performed according to the methodology of Oliveira et al. (2014). A random collection of the contents of the gizzard, small and large intestine, and caecum from 48 embryos at 18 days and 6 hours of embryonic development and the contents of the intestine and cecum 48 hours after the first collection was carried out.

The samples were placed in a cryogenic tube (DNase and RNase-Free) of 2 mL and stored in liquid nitrogen.

Extracting DNA using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions.

The relative quantification of total bacteria was obtained through the quantitative real-time PCR technique, using the Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The amplification reactions were performed using (SYBR Green - Promega) adjusting the final volume of each reaction to 10µL of which: 5µL of SYBR Green, 4µM of each

oligonucleotide (5' - 3': 16s-UniF CGAAAGCGTGGGGAGCAAA and 16s-UniR GTTCGTACTCCCCAGGCGG), 1 μ L of DNA extracted, mixing with DNase and RNase-Free water, until reaching the final volume of the reaction. The conditions used in the long-term amplification model for quantification were initial denaturation at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles consisting of a denaturation step at 94°C for 15 seconds, an annealing and extension step at 60°C for 1 minute, followed by dissociation curve from 95°C to 60°C with fluorescence reading every 0.1°C.

To evaluate DNA concentrations the CT (cycle threshold) comparative method was performed, and an endogenous control was used to assess the efficiency of the reaction. Thus, the results represented the cutoff point where the emitted fluorescence characterized the sample as positive and was inversely proportional to the amount of DNA since the shorter the time required for detection, the fewer duplication cycles were performed and consequently the greater the amount of desirable genetic material present in the sample.

Experimental design phase B

For step B, 426 chicks originated from the first step were used. In the harvests, 336 birds were evaluated, 56 birds per harvest, a total of seven treatments, with four repetitions each, and two birds per repetition.

Experimental animals and housing

After hatching, the chicks were transported to the Infection sector of the Laboratory of Ornithological Pathologies, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP, Campus de Botucatu-SP.

Before housing, one bird from each treatment was euthanized by cervical dislocation, and the cecum and liver were collected for analysis of the presence/absence of *Salmonella spp.* through the methodology advocated by Mallinson and Snoeyenbos (1989).

Each room, previously cleaned and disinfected, housed 60 birds from each treatment, the rooms are strategically separated to avoid cross-contamination. In each treatment, birds were placed in four cages with 15 birds (repetition).

The birds were kept at an ideal comfort temperature for their age, with water and feed *ad libitum*, free of growth-promoting antimicrobials and coccidiostat.

Salmonella Heidelberg strain and experimental challenge

The strain of *Salmonella* Heidelberg used in the inoculum came from the Ornithology Lab Bacteria Library - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science at UNESP (State University of São Paulo Júlio de Mesquita Filho). This strain was previously labelled with resistance to Nalidixic Acid (Nal) and Rifampicin (Rif). Therefore, successive passages were performed in liquid media Agar Infusion of Brain and Heart (BHI) and solid Bright Green Agar (BVA), gradually increasing the antibiotics up to a concentration of 100 µg/mL, according to the methodology recommended by Andreatti Filho et al. (1997).

The number of CFU was determined by decimal dilutions in a buffer solution (phosphate-buffered saline - PBS) at pH 7.2. All bacterial determinations were performed by plating 0.1 mL of the suspensions (BHI) and respective decimal dilutions (PBS) on AVB plates (Nal/Rif). The reading was taken after incubation at 40°C for 24 hours.

Exposure to SH occurred 24 hours after housing the birds. The inoculum was administered directly into the crop through gavage. Each bird received 0.5 mL of inoculum with SH containing 4×10^6 CFU/mL. The negative control birds received 0.5 mL of PBS.

Parameters evaluated in step B

The evaluated parameters and the sampling periods are described in table 1. In each collection, 56 birds were euthanized by cervical dislocation to obtain the samples.

Microbiological analysis - Quantification of Salmonella Heidelberg colonies

Aseptically, the right cecum and crop of each bird were collected. The organs were placed separately in sterile plastic bags, where they were weighed and macerated with the aid of a spatula. According to the organ weight and content, the amount of PBS to be added was determined to reach the ratio of 1:10, obtaining a 10^{-1} dilution. After homogenizing the content, 0.1 mL was removed to make the other dilutions up to a 10^{-7} dilution, in micro-tubes containing 0.9 mL of PBS. For plating, 0.1 mL of each dilution was added to Petri dishes containing AVB Nal/Rif, then cultivated for 24 hours at a temperature of 40°C, determining the number of CFU/mL according to the methodology used by Andreatti Filho et al. (1997).

Biometric analysis of the intestine

The length of the duodenum to the end of the ileum was measured, which was limited by the opening of the cecum. The length measurement was performed using a millimeter metric ruler under the distended organ. The measurement of bird and intestine weight was performed by weighing those on a digital scale according to the methodology of Salmanzadeh et al. (2016).

Morphological analysis of the intestinal mucosa - Measurement of villi and crypts

The intestines of each bird were collected, stapled to paper by the ends after being washed with 10% formalin and, with the aid of a needle attached to a syringe, they were filled with 10% formalin.

The intestinal segments were divided according to Dyce et al. (1997):

- Duodenum: portion between the pylorus and the distal part of the duodenal loop;
- Jejunum: from the distal part of the duodenal loop to the Meckel's diverticulum;
- Ileum: from the Meckel's diverticulum to the insertion of the cecum.

After 24 hours of fixation and 24 hours under running water, each segment of the intestine was cleaved into six smaller segments of the same size (with the aid of a ruler), except for the duodenum, which was cleaved into four smaller segments. After cleavage, the segments were stored in 70% alcohol.

Afterwards, the samples were again cleaved and placed in histological cassettes. Tissues were subjected to dehydration followed by embedding in histological paraffin. The microtomy was performed with the aid of an automatic microtome (RM-2145, Leica Microsystems) obtaining 4µm slices in serial sequence. The staining used were

Hematoxylin and Eosin according to the methodology recommended by Behmer et al. (1976).

The measures of the height of the villi and depth of the crypts were obtained by analysing the images of the histological sections performed with the aid of a computerised image capture system (Qwin Lite 3.0, Leica Microsystems). Measurements of the height of 10 villi and 10 crypts of each harvested segment were performed.

Molecular quantification of Lactobacillus spp

Sample collection was performed according to Wise and Saragusa (2007) standards. The left cecum of each bird was opened longitudinally to remove the content, which was stored in a 2 mL DNase and RNase-Free plastic tube at -20°C.

The bacterial strain used as a positive control was *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356), cultivated in De Man Rugosa Sharpe broth (MRS) at 37°C, in anaerobic conditions for 48 hours. For colony isolation, 0.1mL of broth was striated on a plate containing MRS agar, incubated again under the same conditions.

DNA was extracted using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions.

The relative quantification of *Lactobacillus spp.* was obtained through the technique of quantitative real-time PCR, using the Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The amplification reactions were performed using (SYBR Green - Promega) adjusting the final volume of each reaction to 10µL of which: 5µL of SYBR Green, 4µM of each oligonucleotide (Sequence (5' - 3'), LacF CACCGCTACACATGGAG and LacR AGCAGTAGGGAATCTTCCA), 1µL of DNA

extracted and made up with DNase and RNase–Free water, until reaching the final volume of the reaction.

The conditions used in the long-term amplification model for quantification were: initial denaturation at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles consisting of a denaturation step at 94°C for 15 seconds, an annealing and extension step at 60°C for 1 minute, followed by dissociation curve from 95°C to 60°C with fluorescence reading every 0.1°C.

To evaluate the DNA concentrations, the CT (cycle threshold) comparative method was performed, using an endogenous control to assess the efficiency of the reaction. Thus, the results represented the cutoff point where the emitted fluorescence characterized the sample as positive and was inversely proportional to the amount of DNA since the shorter the time required for detection, the fewer duplication cycles were performed and consequently the greater the amount of desirable genetic material present in the sample.

Statistical analysis

Analysis of variance was performed, complemented by Tukey's test of multiple comparisons (Zar, 2009), considering the 5% level of significance. As for the quantification of SH in the bronchus and cecum, a regression analysis was performed, and it was observed that the data were better disposed in a non-parametric way. Therefore, we also chose to perform the non-parametric analysis of variance technique complemented with Dunn's multiple comparisons test (Zar, 2009), considering the 5% significance level.

RESULTS AND DISCUSSION

The *in ovo* application of probiotic bacteria belonging to the intestinal microbiota of chickens has already been shown to be effective in controlling important pathogens for the poultry chain, such as *Salmonella spp.* (Teague et al., 2017; Oliveira et al., 2014). However, some studies have reported a decrease in hatchability when using the probiotic *in ovo* (Andreatti Filho et al., 2006; Yamawaki et al., 2013). In the present study, there was a significant difference between treatments ($p < 0.05$) in hatchability and there was no decrease in hatchability in treatments that received the probiotic compared to the control group (Figure 1), as in the study by Silva et al. (2017). Many factors may be related to the decrease in hatchability when probiotic is applied *in ovo*. Among them, the stage of embryonic development, diversity and concentration of probiotic bacteria, dose and management, which differ between studies.

All treatments containing glutamine showed better hatchability than the control group. Rufino et al. (2019) also reported an improvement in hatching when glutamine was used at a concentration of 0.5%. Glutamine is an energy nutrient (potential to generate 30 moles of ATP), which provides a carbon source for gluconeogenesis through DH glutamate (CHEN, et al., 2009). This energy source is important when provided *in ovo*, due to the high metabolic rate required for intestinal hatching and development (GONÇALVES et al., 2013).

Although the probiotic did not negatively influence hatchability, the *in ovo* application of the antibiotic resulted in lower ability to hatch, probably related to the difficulty that the embryo has to metabolize this additive at this stage of development, in addition to the possible hydroelectrolyte and basic acid imbalance in response to the osmolarity of the antibiotic (Ferket et al., 2005).

Regarding the quantification of total bacteria using real-time PCR, Pedroso et al. (2006, 2008) demonstrated that through molecular analysis bacteria colonize the intestine of embryos before birth, even in a controlled environment industrial incubator. In the present study, it was observed the presence of bacteria in the digestive system of embryos, however, there was no significant effect ($p>0.05$) between treatments concerning the relative amount of total bacteria in the digestive content of embryos before *in ovo* inoculation on trial (Table 2), possibly due to the same origin, environmental conditions and egg handling during the experiment.

Nevertheless, there was a significant effect ($p>0.05$) between treatments concerning the relative number of total bacteria in the digestive content of embryos 48 hours after the *in ovo* inoculation of the treatments, and the birds that received the probiotic + glutamine had a higher average of total bacteria compared to those receiving antibiotic and antibiotic + glutamine. Oliveira et al. (2014) also observed an increase in the number of bacteria in the gizzard and cecum of embryos 48 hours after inoculation of probiotic *in ovo* through isolation in culture medium, also demonstrating the viability of these bacteria. In addition, in the statistical analysis carried out between harvests, the treatment with glutamine + probiotic was the only one that showed a significant increase in the number of total bacteria in the second harvest, demonstrating the possible greater efficiency in the colonization of probiotic bacteria in the intestine of birds that received this treatment.

There was a significant difference ($p<0.05$) between treatments regarding the amount of SH in the cecum on the 1st, 3rd and 14th days after the exposure to the bacteria (Table 3). The treatment with the probiotic, associated or not with glutamine, presented a lower amount of SH when compared to the other treatments and the control group, one day after exposure to SH. Edens et al. (1997), reported that the *in ovo* application of

Lactobacillus reuteri also reduced the amount of *Salmonella spp.* In Barros et al. (2009) isolated strains of *L. reuteri* in the cecum and brood of birds and observed the in vitro inhibition of *S. Typhimurium* using the spot-on-the-lawn technique.

On the third day after exposure, all treatments presented a significantly ($p < 0.05$) lower amount of SH when compared to the control group. Silva et al. (2017) observed that probiotic bacteria administered *in ovo* have an effect against SH up to four days after hatching. Leandro et al. (2004) reported that there was a decrease in *Salmonella Enteritidis* at 21 days of age in birds when using probiotic *in ovo*, demonstrating the prolonged effect of this route of application.

Therefore, we hypothesize that one more treatment with *Lactobacillus reuteri* in the first days of life of birds that have already received the probiotic *in ovo*, or even continuous feeding could guarantee greater efficiency in reducing SH during the entire chicken rearing.

After 14 days of exposure, the treatment of antibiotic-associated with glutamine showed a greater amount of SH in the cecum when compared to the other treatments, including the control group. Bailey and Line (2001) and Edens et al. (1997) used Gentamicin® *in ovo* and observed an efficient reduction of *Salmonella spp.* only when, soon after birth, a probiotic was also provided.

Both the quantification of SH in the cecum (Table 3) and the engorgement (Table 4) showed a significant reduction ($p < 0.05$) from the fourteenth day after exposing it to the bacteria. According to Stanley et al. (2014), the colonization of the intestinal microbiota begins to stabilize late, close to the slaughter age, probably due to the increased competitiveness between bacteria for binding sites in the intestine. In addition, in the positive control, the amount of SH in the cecum decreased with increasing age of

the bird, demonstrating that initially the bacteria can colonize the cecum, but over time it tends to decrease, probably due to competition and interaction with other bacteria.

Amit-Romach et al. (2004) demonstrated that the chick can be a carrier and an important source of infection of some serotypes of *Salmonella spp.*, through a molecular biology analysis, which showed a greater amount of *Salmonella spp.* in broilers up to four days of age. Therefore, the tested *in ovo* probiotic can contribute to reducing the positivity of this bacteria in the initial phase and consequently in other phases. In addition, even though there was no significant difference between treatments, at 21 days after exposure to SH, the treatments that received the probiotic also had a lower amount of SH in the cecum, demonstrating that even though recontamination may occur, the probiotic helps to reduce *Salmonella spp.* also in the final phase, where batch negativity is important for the successful slaughter and marketing of the product.

There was no significant difference ($p < 0.05$) between the *in ovo* treatments on broiler weight, relative length and intestine weight of birds (Table 5). However, the highest mean relative weight of the intestine was the treatment that received the probiotic + glutamine and the highest mean weight of birds was the treatment that received the probiotic.

The biometric evaluation of the intestines of the birds in this study was carried out close to the slaughter age of the chickens (39 days old) when the microbiota is practically established. Salmanzadeh et al. (2016) also found that there was no significant effect on the relative gut-weight of chickens that were supplemented with glutamine *in ovo* at 42 days of age. However, Wu et al. (2019) observed an increase in weight and relative length of the small intestine of birds at 14 days when supplemented with glutamine in the feed.

Thus, the treatments tested in this study may affect the biometric evaluation of the intestine in other stages of broiler development that were not evaluated. Mainly because,

although glutamine oxidation is limited in adult bird enterocytes (caused by low levels of mRNA for transcription of the glutaminase gene and the low activity of this enzyme compared to mammals), recent studies show that its early supply results in an improvement in the morphology of the intestinal mucosa, resulting from the exponential development of the intestine of birds in the early stages of life (Yi et al., 2005; Bartell & Batal, 2007; Murakami et al., 2007; Tavassoli et al., 2011; Salmanzadeh et al., 2016).

During the study, there was a significant difference between treatments ($p < 0.05$) on intestinal morphology (Table 6) in the two variables evaluated (villus height and crypt depth) on the third day after exposure to SH.

In the duodenum, treatments that received antibiotic + glutamine, probiotic and negative control had higher villus height compared to those that received antibiotic and positive control. Antibiotics require great energy for metabolism, especially in embryos that are still developing. This energy may be necessary for intestinal development and to accelerate cell turnover in crypts, especially in the face of a sanitary challenge as in the present study (Pelicano et al., 2007). Consequently, glutamine may have been the necessary energy source for the replacement of enterocytes in the treatment that received antibiotic + glutamine, since, in the jejunum, the crypt depth was greater in the treatment with antibiotic + glutamine compared to those who received the probiotic + glutamine and the positive control.

Glutamine is a non-essential amino acid that has trophic action by stimulating the transcription of protein kinase genes that activates mitogenesis in cells with a high mitotic index, in addition to providing a carbon source for gluconeogenesis and amine grouping for the formation of new proteins (Chen et al., 2009).

In the jejunum, the treatment with probiotic presented higher villus height when compared to the other treatments, including controls. Awad et al. (2009) and Beski et al.

(2015) reported that supplementing the diet with symbiotics improved intestinal morphology. Vineetha et al. (2016) also observed greater villus height and crypt depth in birds supplemented with probiotics compared to the chemical antimicrobial tested (Bacitracin methylene Disalicylate – BMD®).

Jozefiak et al. (2004) reported that probiotic bacteria can act by producing amylolytic, cellulolytic, proteolytic and lipolytic enzymes that improve nutrient digestibility by providing more energy for the development of the intestinal mucosa. Probiotic treatment also resulted in greater crypt depth in the duodenum when compared to controls. Thus, the administration of the probiotic *in ovo* may have helped in the development and renewal of enterocytes in birds, which in turn helped to maintain the integrity of the intestinal mucosa and, enabled more binding sites for probiotic bacteria and, therefore, resulting in a smaller amount of SH in the cecum.

In the ileum, treatment with probiotic showed a higher average of villus height compared to birds that received antibiotics and glutamine without association. Furthermore, the treatment with probiotics showed greater crypt depth than the treatments that received the antibiotic and the negative control. The reduction in the height of the villi in birds that received the antibiotic may be related to the elimination of important bacteria for the extraction of nutrients, as mentioned above. Miles et al. (2006) and Vineetha et al. (2016) also reported lower villus height in chickens that received antimicrobials in their feed. The use of chemical antimicrobials is a common practice for disease prevention and performance improvement in broilers. However, there are few studies on the effect of antibiotics on the intestinal morphology of chickens (Uni et al., 1999; Geyra et al., 2001).

In relation to intestinal morphology on the 21st day after exposure to SH (Table 7), there was a significant difference ($p < 0.05$) concerning villus height only in the ileum,

with the positive control showing greater villus height than treatment with probiotic + glutamine. There was also a significant difference between treatments ($p < 0.05$) between crypt depth in the duodenum and ileum. The glutamine treatment resulted in a lower crypt depth than the other treatments in the duodenum. And in the ileum, the treatment with glutamine showed a lower crypt depth than the controls.

In situations where the development and maintenance of the intestinal mucosa are taking place efficiently, glutamine may not bring additional benefit, as in this study, that glutamine only contributed to the development of the intestinal mucosa in birds that also received the antibiotic, especially in the initial phase.

Regarding the relative quantification of *Lactobacillus spp.* of cecal content, there was a significant difference ($p < 0.05$) between treatments at one and 37 days after exposure to SH (Table 8). One day after exposure, the antibiotic + glutamine treatment had a higher concentration of *Lactobacillus spp.* than the treatment with glutamine + probiotic. After 37 days of exposure, all treatments had an increase in *Lactobacillus spp.* and treatments that received antibiotic + glutamine and only glutamine resulted in a greater amount of *Lactobacillus spp.* than the treatments with glutamine + probiotic and probiotic alone.

Given this result, the mechanism of action of *Lactobacillus reuteri* may not only be competitive exclusion of binding sites in the intestine and nutrients, as already described by Corcionivoschi et al. (2010). It is possible that the increase in villus length and intra- and inter-species bacterial communication, also known as quorum sensing (Reis et al., 2019), allows for greater colonization and multiplication of other beneficial species, in addition to the production of metabolites that may have directly or indirectly inhibited SH. Immunological modulation may also have contributed to greater efficiency

in controlling SH even with the lower amount of *Lactobacillus spp.* in treatments that received the probiotic (Barbosa et al., 2010).

Also, as the molecular analysis performed was to quantify the genus, and not the species present in the probiotic (*Lactobacillus reuteri*), the result probably had interference from the natural colonization by another *Lactobacillus spp.* present in the environment. Pedroso et al. (2005) compared the microbiota of embryos and chicks before housing in aviaries and observed that there is intense colonization by different species of bacteria during this period.

In addition, antibiotics modulate the microbiota, that is, they reduce some bacteria to promote the development of others (Soares, 1996), and when associated with a trophic agent such as glutamine, it can enable greater colonization by *Lactobacillus spp.* present in the environment, as occurred in this study.

Nonetheless, the use of antibiotics, without replacement of the controlled microbiota, through commercial probiotics, can facilitate infection by pathogenic enterobacteria, and may also favour the expression of antimicrobial resistance genes easily transmitted between non-probiotic bacteria. As an example of the antibiotic used in this study, which has already been reported to be responsible for the resistance of *Escherichia coli* in day-old chicks (Saraiva et al., 2018), in addition to being among the most important antimicrobials for human health (Collignon et al., 2016), representing a unique health risk.

CONCLUSIONS AND APPLICATIONS

Glutamine improves hatchability *when given in ovo*. *In ovo* probiotic inoculation was effective in reducing *Salmonella* Heidelberg in chickens, in addition to not affecting

hatchability, showing through the integrity of villi and enterocyte renewal. In ovo inoculation of probiotic therefore becomes a viable alternative to chemical antimicrobials, thus contributing to public health

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

DISCLOSURES

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Amit-Romach, E. Sklan, D.; Uni, Z. 2004. Microflora Ecology of the Chicken Intestine Using 16S Ribosomal DNA Primers. *Poult. Sci.* 83:1093-1098.
- Andreatti Filho, R. L. Silva, E. N. and P. R. Curi. 1997. Ácidos orgânicos e microbiota cecal anaeróbia no controle da infecção experimental de frangos por *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis. *Arq. Brasileiro de Med. Vet. e Zootec.* 49:661-672.
- Andreatti Filho, R. L. Sorovares de *Salmonella* isolados de materiais avícolas no período de 1994 a 1999. 2001. *Revista de Educação Continuada - Conselho Regional de Medicina Veterinária (CRMV-SP)*. 4:90-101.
- Andreatti Filho, R. L. Okamoto, A. S. Lima, E. T. Gratao, P. R. and S. R. Del bem. 2006. Effect of cecal microflora and *Lactobacillus salivarius* in ovo administration used on chicken previously challenged with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Arq. Brasileiro de Med. Vet. e Zootecnia.* 58:467-471.
- Awad, W. A. Gharee, K. Abdel-Raheem, B. S. and J. Bohm. 2009. Effects of dietary inclusion of Probiotic and Synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poult. Sci.* 88:49– 55.
- Bailey, J. S. and E. Line. 2001. In ovo Gentamicin and Mucosal Starter Culture to Control *Salmonella* in Broiler Production. *J. of Appl. Poult. Research.* 10:376-379.
- Barbosa, F. H. F. Martins, F. S. Barbosa, L. P. J. L. and Nicoli, J. R. 2010. Microbiota indígena do trato gastrintestinal. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 10(1):78-93.
- Barros, M. R. Andreatti Filho, R. L. Lima, E. T. and J. A. Crocci. 2009. Avaliação in vitro da atividade inibitória de *Lactobacillus* spp., isolados do inglúvio e cecos de aves sobre *Salmonella*. *Arq. Brasileiro de Med. Vet. e Zootec.* 61:863-868.
- Behmer A. O. Tolosa, E. M. C. and A. G. Freitas Neto. 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. EDUSPE, São Paulo, SP.

Beski, S. S. M. and S. Y. T. Al-Sardary. 2015. Effects of dietary supplementation of probiotic and synbiotic on broiler chicken's hematology and intestinal integrity. *International J. Poult. Sci.*14:31-36.

Borges, L. and M. Bonato. 2019 Relação Entre a Microbiota Intestinal e Sistema Imune Inato: O papel da Parede Celular de Levedura neste Processo. *O Presente Rural.* 168:38-39.

Chen, W. Wang, R. Wan, H. F. Xiong, X. L. Peng, P. and J. Peng. 2009. Influence of *in ovo* injection of glutamine and carbohydrates on digestive organs and pectoralis muscle mass in the duck. *British Poult. Sci.*50:436-442.

Collignon PC, Conly JM, Andremon A, McEwen SA, Aidara-Kane A, Agerso Y, et al. 2016. World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies to control antimicrobial resistance from food animal production. *Clin Infect Dis.* 63:1087–1093.

Corcionivoschi, N. Drinceanu, D. Pop, I. M. Stack, D. Ștef, L. Julean, C. and B. Bourke. 2010. The effect of probiotics on animal health. *Scientific Papers Animal Sci. and Biot.* 43:35-41.

Dyce, K. M. Sack, W. O. and C. J. Wensing. 1997. *Tratado de Anatomia Veterinária.* 2^{sd} ed. GUANABARA KOOGAN, Rio de Janeiro, RJ.

Edens, F. W. Parkhurst, C. R. Casas, I. A. and W. J. Dobrogosz. 1997. Principles of ex ovo competitive exclusion and *in ovo* administration of *Lactobacillus reuteri*. *Poult. Sci.* 76:179–196.

Ferket, P. De, J. Ghane, A. And Uni, Z. 2005. Effects of in ovo feeding solution osmolality on hatching turkey, *Poult. Sci.* 84:117–121.

Fernandes, J. I. M. Prokoski, K. Oliveira, B. C. Oro, C. S. Oro, P. J. and N. I. M. Fernandes. 2016. Evaluation of Incubation Yield, Vaccine Response, and Performance of Broilers Submitted to In-Ovo Vaccination at Different Embryonic Ages. *Brazilian J. of Poult. Sci.*18:55-63.

Geyra, A. Uni, Z. and D. Sklan. 2001. Enterocyte dynamics and mucosal development in the posthatch chick. *Poult. Sci.* 80:776–782.

Gonçalves, F. M. Santos, V. L. Contreira, C. L. Farina, G. Kreuz, B. S. Gentilini, F. P. Anciuti, M. A. and F. Rutz. 2013. Nutrição in ovo: estratégia para nutrição de precisão em sistemas de produção avícola. *Arch. of Zootec.* 62:46 -55.

Guard, J. Henzler, D.J. Ramadan, H. Jones, D. R. Gast, R. K. Davison, S. and M. Allard. 2018. Serotyping of *Salmonella* enterica isolated from mice caught on US poultry farms 1995 through 1998. *Food Safety.* 6:44-50.

Józefiak, D. Rutkowski, A. and S. A. Martin. 2004. Carbohydrate fermentation in the avian ceca: a review. *Animal Feed Sci. and Tec.* 113:1-15.

Kumar, D. Pornsukarom, S. and S. Thakur. 2019. Antibiotic Usage in Poultry Production and Antimicrobial-Resistant *Salmonella* in Poultry. In: Venkitanarayanan K. Thakur S. and S. Ricke (eds) *Food Safety in Poultry Meat Production. Food Microbiology and Food Safety.* Springer, Cham.

Leandro, N. S. M. Oliveira, A. S. C. Andrade, M. A. Stringhine, J. H. Andrade, L. Chaves, L. and T. R. Silva. 2004. Efeito de probiótico inoculado via ovo sobre o desempenho e colonização do trato gastrointestinal por “*Salmonella* Enteritidis” de pintos desafiados. In: *41º Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia.* Campo Grande, MS. (Abstract).

Lorenço, L. Nunes, R. V. N. Pozza, P. C. Pozza, M. S. S. Appelt, M. D. and W. M. S. Silva. 2007. Utilização de promotores de crescimento para frangos de corte em rações fareladas e peletizadas. *Acta Agriculture Scandinavica, Section A – Animal Sci.* 29:151-158.

Maiorka, A. Silva, A.V.F. Santin, S. Borges, S. A. Boleli, I. C. and M. Macari. 2002. Efeito da Idade da Matriz, do jejum, da energia da ração e da glutamina sobre o desenvolvimento da mucosa intestinal e atividade enzimática do pâncreas de pintos de corte. *Arq. Brasileiro de Med. Vet. Zootec.* 52:487-490.

Mallinson, E.T. Snoeyenbos, G. H. Salmonellosis. In: Purchase, H. G. Arp, L.H. Domermuth, C. H. and J.E. Pearson. 1989. *A laboratory manual for the isolation and*

identification of avian pathogens. 3rd ed. Pennsylvania: American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania, KENNETT SQUARE, PA.

Miles, R. D. Butcher, G. D. Henry, P. R. and R. C. Littell. 2006. Effect of antibiotic growth promoters on broiler performance, intestinal growth parameters, and quantitative morphology. *Poult. Sci.* 85:476–485.

Ministério da Saúde. 2021. Boletim especial de doenças negligenciadas. 30-31p. (accessed last on 19 January 2021) https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/media/pdf/2021/marco/3/boletim_especial_doencas_negligenciadas.pdf.

Murakami, A. E. Sakamoto, M. I. Natali, M. R. M. Souza, L. M. G. and J. R. G. Franco. 2007. Supplementation of glutamine and vitamin E on the morphometry of the intestinal mucosa in broiler chickens. *Poult. Sci.* 86:488–495.

Oliveira, J. E. Van der Hoeven-Hangoor, E. van de Linde, I. B. Montijn, R. C. and J. M. B. M. Van der Vossen. 2014. In ovo inoculation of chicken embryos with probiotic bacteria and its effect on posthatch *Salmonella* susceptibility. *Poult. Sci.* 93 :818–829.

Pandini, J. A. Pinto, F. G. S. Muller, J. M. Weber, L. D. and A. C. Moura. 2015. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. *Arquivo do Instituto Biológico.* 82:1-6.

Patterson, J. A. and K. M. Burkholder. 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult. Sci.* 82:627-631.

Pedroso, A.A., Maurer, J.J., Dlugolenski, D. and M. D. Lee. 2008. Embryonic chicks may possess an intestinal bacterial community within the egg. In: *American Society for Microbiology General Meeting*, Toronto, Canada.

Pedroso, A. A. Menten, J. F. M. Lambais, M. R. Racanicci, A. M. C. Longo, F. A. and J. O. B. Sorbara. 2006. Intestinal bacterial community and growth performance of chickens fed diets containing antibiotics. *Poult. Sci.* 85: 747-752.

Pelicano, E. R. L. Souza, P. A. Souza, H. B. A. Figueiredo, D. F. and C. M. C. Amaral. 2007. Morphometry and ultra-structure of the intestinal mucosa of broilers fed different additives. *Brazil J. Poult. Sci.* 9:173-180.

Reis T. L. and F. M. Vieites. 2019. Antibiótico, prebiótico, probiótico e simbiótico em rações de frangos de corte e galinhas poedeiras. *Ciência Animal*. 29:133-147.

Rufino, J. P. F. Cruz, F. G. G. Farias, T. M.; Melo, L. D. Uso de aminoácidos na alimentação in ovo. *Revista Científica de Avicultura e Suinocultura*, 4 (2) 2018.

Salmanzadeh, M. Ebrahimnezhad, Y. Shahryar, H. A. and J. G. Ghaleh-Kandi. 2016. The effects of in ovo feeding of glutamine in broiler breeder eggs on hatchability, development of the gastrointestinal tract, growth performance and carcass characteristics of broiler chickens. *Arch. Anim. Breed.* 59:235–242.

Santos, K. P. O.; Faria, A. C. S. R.; Silva, D. P. A.; Lisboa, P. F.; Costa, A. P.; Knackfuss, F. B. 2020. *Salmonella* spp. como agente causal em Doenças Transmitidas por Alimentos e sua importância na saúde pública (Revisão). *PUBVET*. 14(10):1-9.

Saraiva, M. M. S. Moreira Filho, A. L. B. Freitas Neto, O. C. Silva, N. M. V. Givisiez, P. E. N. Gebreyes, W. A. and C. J. B. Oliveira. 2018. Off-label use of ceftiofur in one-day chicks triggers a short-term increase of ESBL-producing *E. coli* in the gut. *PLoS One*. 13(9): e0203158.

Silva, E. N. and R. L. Andreatti Filho. 2000. Probióticos e prebióticos na avicultura. In: *Simpósio de Sanidade Avícola*, 2., 2000, Santa Maria. *Anais...* Santa Maria: UFSM. 45-55.

Silva, I. G. O. Vellano, I. H. B. Moraes, A. C. Lee, I. M. Alvarenga, B. Milbradt, E. L. Hataka, A. Okamoto, A. S. and R. L. Andreatti Filho. 2017. Evaluation of a Probiotic and a Competitive Exclusion Product Inoculated in ovo on Broiler Chickens Challenged with *Salmonella* Heidelberg. *Brazilian J. of Poult. Sci.* 19:019-026.

Soares, L.L.P. 1996. Restrições e uso de aditivos (promotores de crescimento) em ração de aves. Visão do fabricante. In: *Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola*, 1996, *Anais...* Curitiba: Apinco, p.27-36, 1996.

Stanley, D. Hughes, R. J. and R. J. Moore. 2014. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract, productivity and disease. *Appl. Microbiol. and Biotec.* 98:4301-4310.

Syngai, G. G. Gopi, R. Bharali, R. Dey, S. Lakshmanan, A. G. M. and Ahmed, G. 2016. Probiotics - the versatile functional food ingredients. J. of Food Sci. and Tec. 53:921–933.

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. and G. Tellez. 2017. 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. Poult. Sci. 96:2074– 2082.

Uni, Z. Noy, Y. and D. Sklan. 1999. Posthatch development of small intestinal function in the poult. Poult. Sci. 78:215–222.

Uni, Z. Ferket, P. R. Tako, E. and O. Kedar, 2005. In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. Poult. Sci. 84:764-770.

Velasquez, C. G. Macklin, K. S. Kumar, S. Bailey, M. Ebner, P. E. Oliver, H. F. Martin-Gonzalez, F. S. and M. Singh. 2018. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* isolated from poultry farms in southeastern United States. Poult. Sci. 97:2144–2152.

Vineetha, P.G. Tomar, S. Saxena, V. K. Kapgate, M. Suvarna, A. and K. Adil. 2017. 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. J. of Animal Physiology and Animal Nutrition. 101:362–370.

Yamawaki RA, Milbradt EL, Coppola MP, Rodrigues JCZ, Andreatti Filho RL, Padovani CR, and A. S. Okamoto. 2013. Effect of immersion and inoculation in ovo of *Lactobacillus* spp. in embryonated chicken eggs in the prevention of *Salmonella* Enteritidis after hatch. Poult. Sci. 92:1560-1563.

Yi, G. F. Allee, G. L. Knight, C. D. and J. J. Dibner. 2005. Impact of glutamine and Oasis hatchling supplement on growth performance, small intestinal morphology, and immune response of broilers vaccinated and challenged with *Eimeria maxima*. Poult. Sci. 84:283–293.

Wise, M.G. and Siragusa, G.R. 2007. Quantitative analysis of the intestinal bacterial community of one- to three-week-old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic-free vegetable-based diets. J. Appl. Microbiol. 102:1138–1149.

Wu, Q.J. Jiao, C. Liu, Z.H. Li, S.W. Zhu, D.D. Ma, W.F. Wang, Y.Q. Wang, Y. and X. H. Wu. 2019. Effect of glutamine on the intestinal function and health of broilers challenged with *Salmonella Pullorum*. Indian J. of Animal Research. 53:1210-1216.

Zar, J. H. 2009. Bioestatistical analysis. SED. PRENTICE-HALL. New Jersey, USA.

TABLES

Table 1. Parameters evaluated after *in ovo* treatments and exposure to *Salmonella* Heidelberg (SH).

Harvest	Time after exposure to SH (days)	Parameters
1°	1	Quantification of SH in the crop and cecum, and molecular quantification of <i>Lactobacillus</i> spp. in the cecum.
2°	3	Quantification of SH in the crop and cecum, and intestinal morphology.
3°	7	Quantification of SH in the crop and cecum.
4°	14	Quantification of SH in the crop and cecum.
5°	21	Quantification of SH in the crop and cecum, and intestinal morphology.
6°	37	Quantification of SH in the crop and cecum, molecular quantification of <i>Lactobacillus</i> spp. in the cecum and; intestinal biometric analysis.

Table 2. Mean and standard deviation of the relative number of total bacteria in the digestive content of embryos before and after *in ovo* administration of treatments. Results are inversely proportional to the amount of DNA present in the sample.

Treatment	Harvest		p value
	1	2	
Control -	27,53 (1,51)	26,19 (3,28) ^{ab}	p>0,05
Glutamine	28,22 (1,11)	26,19 (3,42) ^{ab}	p>0,05
Glutamine + probiotic	28,00 (1,78) ^B	23,68 (3,47) ^{a A}	p<0,05
Probiotic	27,95 (2,02)	25,29 (3,56) ^{ab}	p>0,05
Antibiotic	28,11 (0,48)	28,07 (1,05) ^b	p>0,05
Glutamine + probiotic	27,69 (1,39)	28,05 (0,82) ^b	p>0,05
p value	p>0,05	p<0,05	

^{a,b} Two mediums followed by the same lowercase letter and in the same column do not differ from each other in terms of treatments.

^{A,B} Two mediums followed by capital letters and on the same line differ from each other in terms of harvests.

¹ Collection of digestive content immediately before treatments.

² Collection of digestive contents 48 hours after treatment administration.

Table 3. Mean of the amount in log 10 of CFU/mL of *Salmonella* Heidelberg (SH) in the cecum of birds treated *in ovo* and experimentally challenged with SH.

Treatment	Time after exposure to SH (days)						p value	Effect
	1	3	7	14	21	37		
Glutamine + antibiotic	6,0 ^{cD}	6 ^{aC}	6,1 ^C	6,9 ^{bC}	3,9 ^B	0 ^A	p<0,001	p>0,05
Antibiotic	5,4 ^{cC}	5,4 ^{aC}	5,8 ^C	5,9 ^{abC}	4,3 ^B	0 ^A	p<0,001	p>0,05
Glutamine	5 ^{bBC}	5,8 ^{aC}	5,7 ^C	5,3 ^{aC}	4,6 ^B	0 ^A	p<0,001	Quadratic
Glutamine + probiotic	4,4 ^{aB}	5,1 ^{aBC}	6,0 ^C	5,6 ^{aC}	3,2 ^B	0 ^A	p<0,001	Quadratic
Probiotic	4 ^{aB}	5,9 ^{aC}	6,1 ^C	5,8 ^{aC}	3,3 ^B	0 ^A	p<0,001	Quadratic
Control +	6,2 ^{dC}	7,6 ^{bD}	5,9 ^C	5,7 ^{aC}	4,4 ^B	1 ^A	p<0,001	Linear
p value	p<0,001	p<0,001	p>0,005	p<0,005	p<0,005	p>0,005		

^{a,c} Two mediums followed by the same lowercase letter and in the same column do not differ from each other in terms of treatments;

^{A,C} Two mediums followed by capital letters and on the same line differ from each other in terms of exposure to SH.

Table 4. Mean of the amount in log10 of CFU/mL of *Salmonella* Heidelberg (SH) in the broth of birds treated *in ovo* and experimentally exposed to SH.

Treatment	Time after exposure to SH (days)						p value	Effect
	1	3	7	14	21	37		
Glutamine + antibiotic	3,4 ^B	4,0 ^B	3,8 ^B	2,8 ^{AB}	1,3 ^A	0 ^A	p<0,001	p>0,05
Antibiotic	3,1 ^A	3,5 ^B	4,4 ^B	2,5 ^A	1,3 ^A	0 ^A	p<0,001	p>0,05
Glutamine	3,4 ^B	3,0 ^A	4,1 ^B	3,0 ^A	1,6 ^A	0 ^A	p<0,001	p>0,05
Probiotic + glutamine	2,8 ^A	3,1 ^A	4,1 ^B	2,1 ^A	1,4 ^A	0 ^A	p<0,001	Quadratic
Probiotic	2,3 ^A	3,7 ^B	4,2 ^B	2,2 ^A	1,6 ^A	0 ^A	p<0,001	Quadratic
Control +	3,3 ^B	3,4 ^B	4,0 ^C	2,8 ^{AB}	1,6 ^A	1 ^A	p<0,001	Quadratic
p value	p>0,005	p>0,005	p>0,005	p>0,005	p>0,005	p>0,005		

^{A-C} Two mediums followed by the same capital letter and on the same line do not differ in terms of days after exposure to SH.

Table 5. Mean and standard deviation of bird body weight, relative length and relative gut weight of birds treated *in ovo* and experimentally challenged exposed to *Salmonella* Heidelberg.

Treatment	Bird weight (g)	Bowel relative length (cm)	Bowel relative weight (g)
Glutamine + antibiotic	1546,75 (193,58)	9,74 (1,43)	3,00 (0,33)
Antibiotic	1556,75 (180,16)	10,37 (0,58)	3,09 (0,22)
Glutamine	1646,00 (172,56)	9,48 (0,92)	3,21 (0,28)
Glutamine + probiotic	1579,25 (283, 47)	9,90 (1,05)	3,45 (1,62)
Probiotic	1657,63 (128,63)	9,21 (0,68)	2,88 (0,42)
Control +	1625,18 (237,68)	9,54 (1,58)	2,63 (0,37)
Control -	1642,25 (212,35)	9,97 (1,08)	2,82 (0,24)
p value	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Table 6. Mean and standard deviation (μ) of villi height and crypt depth, in micrometers, in the duodenum, jejunum and ileum of birds treated *in ovo* after three of experimental exposure to *Salmonella* Heidelberg (SH).

Three days after exposure to SH						
Treatment	Villi			Crypt		
	Duodenum	Jejunum	Ilium	Duodenum	Jejunum	Ilium
Glutamine + antibiotic	921, 02 (34,50) ^{ab}	531, 76 (65,92) ^{bc}	394,42 (29,41) ^{ab}	61,34 (9,07) ^{ab}	65,10 (13,28) ^a	54,42 (7,40) ^{ab}
Antibiotic	797,20 (53,80) ^d	450,64 (62,22) ^c	329,81 (55,89) ^b	54,19 (4,68) ^{ab}	57,57 (8,10) ^{ab}	48,87 (7,96) ^b
Glutamine	895,94 (58,08) ^c	478,77 (55,06) ^{bc}	355,99 (46,31) ^b	59,39 (8,29) ^{ab}	57,49 (6,30) ^{ab}	54,01 (5,32) ^{ab}
Glutamine + probiotic	892, 61 (71, 96) ^c	532,28 (43,42) ^{bc}	391,83 (68,15) ^{ab}	54,57 (3,51) ^{ab}	54,20 (4,38) ^b	52,20 (4,69) ^{ab}
Probiotic	1017,92 (62,33) ^a	635,78 (82,88) ^a	461,73 (70,82) ^a	63,25 (7,93) ^a	64,39 (3,71) ^{ab}	58,33 (3,69) ^a
Control +	926,94 (34,26) ^{cd}	555,42 (50,45) ^{ab}	368,82 (29,46) ^{ab}	53,58 (2,71) ^b	53,92 (5,34) ^b	51,14 (5,10) ^{ab}
Control -	987,92(19,43) ^{ab}	561,25 (38,89) ^{ab}	402,79 (33,78) ^{ab}	51,73 (4,56) ^b	56,00 (3,52) ^{ab}	47,92 (3,26) ^b
p value	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,005	p<0,001	p<0,001

^{a,b} Two mediums followed by the same lowercase letter and in the same column do not differ from each other in terms of treatments.

Table 7. Mean and standard deviation (μ) of villi height and crypt depth, in micrometers, in the duodenum, jejunum and ileum of birds treated *in ovo* after 21st of the experimental exposure to *Salmonella* Heidelberg (SH).

21 after exposure to SH						
	Vilo			Cripta		
Treatment	Duodenum	Jejunum	Ilium	Duodenum	Jejunum	Ilium
Glutamine + antibiotic	1298,55 (174,16)	952,19 (86,45)	644,61 (33,07) ^{ab}	65,25 (5,25) ^a	65,41 (5,07)	59,52 (5,33) ^{ab}
Antibiotic	1298,62 (81,70)	985,92 (92,22)	632,66 (68,88) ^{ab}	62,41 (4,34) ^{ab}	62,15 (4,67)	56,14 (3,00) ^{ab}
Glutamine	1306,93 (116,46)	912,98 (136,26)	643,93 (63,33) ^{ab}	54,26 (5,33) ^b	57,60 (4,76)	53,65 (4,88) ^b
Glutamine + probiotic	1287,43 (158,46)	981,26 (114,04)	622,58 (45,22) ^b	62,68 (5,22) ^{ab}	65,27 (6,34)	58,35 (5,60) ^{ab}
Probiotic	1427,78 (113,36)	1058,74 (73,89)	714,25 (45,57) ^{ab}	70,09 (7,59) ^a	65,98 (9,29)	62,96 (4,41) ^{ab}
Control +	1238,29 (140,43)	954,71 (129,14)	729,60 (135,95) ^a	65,77 (6,40) ^a	66,96 (6,97)	65,66 (6,14) ^a
Control -	1276,87 (200,10)	1000,75 (128,81)	657,26 (90,54) ^{ab}	65,60 (5,72) ^a	66,83 (8,47)	64,50 (10,90) ^a
p value	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05	p<0,05

^{a,b} Two mediums followed by the same lowercase letter and in the same column do not differ from each other in terms of treatments.

Table 8. Mean and standard deviation of the amount of *Lactobacillus spp.* in the cecum of birds treated *in ovo* and experimentally exposed to *Salmonella* Heidelberg (SH).

Time after exposure to SH (days)			
Treatment	1	37	p value
Glutamine + antibiotic	20,16 (6,65) ^{a B}	13,64 (2,45) ^{a A}	p<0,05
Antibiotic	26,45 (2,64) ^{ab B}	15,70 (4,07) ^{ab A}	p<0,01
Glutamine	26,55 (2,97) ^{ab B}	13,05 (3,13) ^{a A}	p<0,01
Glutamine + probiotic	27,15 (3,24) ^{b B}	20,61 (7,73) ^{b A}	p<0,05
Probiotic	23,85 (2,83) ^{ab B}	19,21 (2,57) ^{b A}	p<0,01
Control +	24,25 (3,05) ^{ab B}	16,81 (1,07) ^{ab A}	p<0,01
Control -	23,95 (3,58) ^{ab B}	15,97 (2,22) ^{ab A}	p<0,01
p value	p<0,05	p<0,05	

^{a,b} Two mediums followed by the same lowercase letter and in the same column do not differ from each other in terms of treatments.

^{A-B} Two mediums followed by the same capital letter and on the same line do not differ in terms of days after exposure to SH.