

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Uso de Prebiótico e Probiótico em Frangos de Corte Infectados
Experimentalmente com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis e
Detecção de Genes Codificadores de Bacteriocinas em
*Lactobacillus salivarius***

EDNA TEREZA DE LIMA

**BOTUCATU - SP
Janeiro - 2008**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Uso de Prebiótico e Probiótico em Frangos de Corte Infectados
Experimentalmente com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis e
Detecção de Genes Codificadores de Bacteriocinas em
*Lactobacillus salivarius***

EDNA TEREZA DE LIMA

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", *Campus* de Botucatu, para obtenção do Título de Doutor em Medicina Veterinária. Área de Patologia Aviária.

ORIENTADOR: Profº Ass. Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho

**BOTUCATU - SP
Janeiro - 2008**

Composição da Banca Examinadora:

EDNA TEREZA DE LIMA

**Uso de Prebiótico e Probiótico em Frangos de Corte Infectados
Experimentalmente com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis e Detecção de
Genes Codificadores de Bacteriocinas em *Lactobacillus salivarius***

Comissão examinadora:

1. Orientador:

Profº Raphael Lucio Andreatti Fliho
(FMVZ - UNESP, Botucatu)

2. Membros:

Profº Edir Nepomuceno da Silva
(UNICAMP - Campinas)

Profº Paulo Lourenço da Silva
(FMV - UFU, Uberlândia)

Profº José Paes de Almeida Nogueira Pinto
(FMVZ - UNESP, Botucatu)

Profº Julio Lopes Sequeira
(FMVZ - UNESP, Botucatu)

Botucatu, 23 de janeiro de 2008.

Sumário

Lista de figuras.....	
Lista de Tabelas.....	
Resumo.....	
Abstract.....	
1. Introdução.....	
2. Revisão de literatura.....	
2.1. Aditivos.....	
2.2. Microbiota intestinal das aves.....	
2.3. Salmonelose e saúde pública.....	
2.4. Exclusão competitiva – probióticos.....	
2.5. Prebiótico.....	
2.6. Bactérias ácido lácticas (<i>Lactobacillus</i> spp.).....	
2.7. Bacteriocinas.....	
2.8. Estrutura genética das bacteriocinas.....	
3. Objetivos.....	
4. Material e métodos.....	
4.1. Detecção dos genes de bacteriocinas utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	
4.2. Extração do DNA bacteriano.....	
4.2.1. Quantificação do DNA.....	
4.2.2. Normalização das amostras.....	
4.2.3. Amplificação das amostras.....	
4.2.4. Eletroforese em gel de agarose.....	
4.3. Avaliação da capacidade de proteção de <i>Lactobacillus</i>	
4.3.1. Local.....	
4.3.2. Aves.....	
4.3.3. Delineamento experimental.....	
4.3.4. Probióticos.....	
4.3.5. Amostras de <i>Lactobacillus</i>	
4.3.6. Inóculo de <i>Lactobacillus</i>	
4.3.7. Amostras de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	
4.3.8. Inoculo de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	
4.3.9. Enxágüe e cultivo das carcaças.....	
4.3.10. Cultivo microbiológico.....	
1. Fígado.....	
2. Suabe cloacal.....	
3. Cecos e ingluvios.....	
4.4. Morfometria das criptas duodenais.....	
4.5. Análise estatística.....	

Sumário

5. Resultados.....	
5.1. Amplificação do DNA bacteriano utilizando PCR.....	
5.2. Avaliação da capacidade de proteção dos diferentes tratamentos.....	
5.2.1. Índice de aves infectadas.....	
5.2.2. Contagem bacteriana – ingluvío.....	
5.2.3. Contagem bacteriana – cecos.....	
5.3. Medidas das criptas intestinais.....	
6. Discussão.....	
6.1. Biologia molecular.....	
6.2. Probióticos e prebióticos.....	
7. Conclusões.....	
8. Referências.....	

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Galpão experimental – aves alojadas em boxes compostos por um comedouro e um bebedouro.....

FIGURA 2. Eletroforese em gel de agarose dos produtos correspondentes ao DNA extraído das amostras de *Lactobacillus salivarius*.....

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizados para amplificação dos genes *abp 118 alpha* e *Sal B*.....

TABELA 2. Reação da PCR para amplificação das amostras de DNA do gene *abp 118 alpha*.....

TABELA 3. Reação da PCR para amplificação das amostras de DNA do gene *Sal B*.....

TABELA 4. Programa para amplificação das amostras de DNA.....

TABELA 5. Índice de carcaças contaminadas por *Salmonella* Enteritidis. Resultados expressos em número de carcaças contaminadas/número de carcaça total (percentual).....

TABELA 6. Cultivo do fígado de aves desafiadas com *Salmonella* Enteritidis. Resultados expressos em número de fígados contaminados/número de fígados total (percentual).....

TABELA 7. Contagens de *Salmonella* Enteritidis no ingluvío. Medianas das unidades formadoras de colônias (UFC/ingluvío) em cada tratamento.

TABELA 8. Contagens de *Salmonella* Enteritidis nos cecos. Medianas das unidades formadoras de colônias (UFC/cecos) em cada tratamento....

TABELA 9. Medida da profundidade das criptas do duodeno (μm) das aves. Médias da profundidade das criptas em cada tratamento.....

LIMA, E.T. **Uso de prebiótico e probiótico em frangos de corte infectados experimentalmente com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis e detecção de genes codificadores de bacteriocinas em *Lactobacillus salivarius***: 2008, p.66. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Resumo

O presente trabalho teve por objetivos detectar genes (*abp 118 alpha* e *Sal B*) codificadores de bacteriocinas das cepas de *Lactobacillus salivarius* e avaliar a capacidade protetora de prebiótico e *Lactobacillus* spp. como probiótico em carcaças e órgãos de frangos de corte desafiados com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SE), observando-se também alterações na morfologia da mucosa intestinal. Os produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) de 25 cepas de *Lactobacillus salivarius* isoladas do inglúvio e cecos de matrizes pesadas de linhagem comercial não apresentaram bandas em gel de agarose correspondente à amplificação do segmento genômico codificador dos produtos de bacteriocinas. Para capacidade de proteção, 150 pintos de corte foram divididos em cinco grupos de 30 aves para os diferentes tratamentos (T1 = controle negativo, T2 = controle positivo, T3 = *pool* de *Lactobacillus*, T4 = *pool* de *Lactobacillus* + prebiótico e T5 = prebiótico). Nos períodos de 1, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de vida, as aves dos grupos 3 e 4 foram tratadas via oral com *pool* de *Lactobacillus* spp. Os tratamentos com prebióticos (T4 e T5) foram realizados via ração desde o primeiro dia de vida até 42 dias. Dezoito horas antes do abate as aves foram desafiadas com SE (T2, T3, T4 e T5). Os cultivos microbiológicos das carcaças e fígados apresentaram crescimento bacteriano de SE para todos os tratamentos T2, T3, T4 e T5, exceto o T1, o qual também não apresentou contagem bacteriana para os inglúvios e cecos. Os tratamentos T2, T3, T4 e T5, apresentaram contagem de SE nos inglúvios, embora o T5 tenha apresentado significativamente ($P<0,05$) maior quantidade bacteriana quando comparado com os demais tratamentos. Nos cecos, os tratamentos T2 e T5, apresentaram significativamente ($P<0,05$) maior quantidade bacteriana. quando comparado com os T1, T3 e T4. Não foi observado efeito significativo ($P>0,05$) sobre profundidade de criptas das aves que receberam os tratamentos T4 e T5, estes apresentaram menor relação profundidade de criptas ($P<0,05$) quando

comparados aos T1 e T2. O uso de probiótico associado ou não ao prebiótico mostrou uma diminuição significativa de SE nos cecos das aves. Entretanto, para o ingluvío não foram observados efeitos significativos.

Palavras-chave: Aves, Bacteriocinas, *Lactobacillus*; Probiótico, *Salmonella*.

LIMA, E.T. **Use of prebiotic and probiotic in broiler chickens infected experimentally with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and detection of encoding genes of bacteriocins in *Lactobacillus salivarius***: 2008, p.66. Doctoral Thesis in Veterinary Medicine – School of Veterinary Medicine and Zootechny – State University of Sao Paulo, Botucatu.

Abstract

The present work aimed to detect genes (*abp 118 alpha* and *Sal B*) encoding bacteriocins of strains of *Lactobacillus salivarius* and to evaluate the protective capacity of prebiotic and *Lactobacillus* spp. as probiotic in carcasses and organs of broiler chickens challenged with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE), observing also the morphology of the alterations intestinal mucosa. The products of the reaction in chain of the polymerase (PCR) of 25 strains of *Lactobacillus salivarius* isolated from the crop and ceca of heavy matrices of commercial lineage did not present bands in agarose gel corresponding to amplification of the encoding genomic segment of bacteriocin producers. For protection capacity, 150 broiler chicks were divided into five groups of 30 birds for the different treatments (T1 = negative control, T2 = positive control, T3 = *pool* of *Lactobacillus*, T4 = *pool* of *Lactobacillus* + prebiotic and T5 = prebiotic). At the ages of 1, 7, 14, 21, 28, 35 and 42 days, the birds of groups 3 and 4 were treated orally with *pool* of *Lactobacillus* spp. The treatments with prebiotics (T4 and T5) were accomplished via ration from the first day of life up to 42 days. Eighteen hours before slaughter the birds were challenged with SE (T2, T3, T4 and T5). The microbiological cultures of carcasses and livers presented bacterial growth of SE for all treatments T2, T3, T4 and T5, except T1, which also did not present a bacterial count for crops or ceca. The treatments T2, T3, T4 and T5, presented SE count in crops, although T5 had shown a significantly ($P<0.05$) higher bacterial quantity compared to the other treatments. In ceca, the treatments T2 and T5, presented significantly ($P<0.05$) more bacteria than T1, T3 and T4. No significant effect was observed ($P>0.05$) on depth of crypts of birds that received treatments T4 and T5, forme of wich displayed lower crypt depth ratio, differing significantly ($P<0.05$) compared to T1 and T2. The use of *Lactobacillus pool* associated or not with

prebiotic showed significant SE diminution in ceca of birds. However, for the crop no significant effects were observed.

Key words: Chickens; Bacteriocins; *Lactobacillus*; Probiotic; *Salmonella*

1. Introdução

A avicultura de corte vem apresentando constante crescimento nos últimos anos. E a existência de um mercado globalizado tem exigido dos produtores rurais a utilização de modernas tecnologias ligadas à produção animal, responsáveis pela melhoria na produtividade e competitividade.

Os promotores de crescimento antibióticos são os principais aditivos de uso na alimentação animal, mas devido ao aumento das restrições desses produtos, principalmente destinados ao mercado externo, alternativas têm sido estudadas e colocadas no mercado. As perspectivas para substituição dos antibióticos como promotores de crescimento estão sendo direcionadas para o uso de prebióticos, probióticos, acidificantes (ácidos orgânicos), enzimas e fitoterápicos.

Com a grande expansão da indústria avícola, a salmonelose tornou-se fator limitante na criação de aves, adquirindo importância relevante, pois as perdas econômicas estão presentes em todas as fases da produção. A necessidade de uma via alternativa à prevenção das salmoneloses nos plantéis avícolas, possibilita o uso de prebióticos na dieta das aves contribuindo assim para saúde e crescimento, uma vez que cria um ecossistema intestinal estável e ainda dificulta a colonização do intestino por bactérias patogênicas

Os suplementos alimentares compostos de culturas definidas ou indefinidas de microrganismos vivos (probióticos) e ingredientes alimentares não absorvidos integralmente pelo hospedeiro (prebiótico), que potencializam os efeitos dos probióticos (prebióticos) têm a capacidade de se instalar e proliferar no trato intestinal, agindo no crescimento e beneficiando a saúde do hospedeiro pelo estímulo às propriedades existentes na microbiota natural.

Com o crescente número de probióticos que atualmente vêm sendo produzidos, faz-se necessário o controle da qualidade e a verificação da eficácia destes produtos. Diversas bactérias como *Lactobacillus*, *Pediococcus*,

Bacterioides, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Enterococcus* são utilizadas como probióticos, associadas ou não.

Bactérias ácido lácticas são as mais conhecidas na indústria avícola, podendo transformar o produto final da fermentação da lactose em ácido lático, e/ou etanol, acetato e dióxido de carbono. Com o aumento do ácido lático é possível ocorrer a diminuição do pH intestinal, impossibilitando a sobrevivência de microrganismos patogênicos. Podem também produzir peróxido de hidrogênio, inibindo o crescimento de certas bactérias anaeróbias, bem como bacteriocinas cuja ação antagônica pode inativar ou matar outras espécies bacterianas.

As bacteriocinas das bactérias ácido lácticas são, em geral, pequenas proteínas catiônicas, heterogêneas, apresentando de 30 a 60 resíduos de aminoácidos, e que variam consideravelmente quanto ao microrganismo produtor, o que se refere ao seu espectro de ação, ao peso molecular e as suas propriedades bioquímicas.

Os objetivos deste trabalho foi verificar a capacidade protetora de substâncias prebióticas (mananoligossacarídeos) e probióticas (*Lactobacillus* spp) em carcaças e órgãos de frangos de corte desafiados com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SE), observando-se também alterações na morfologia da mucosa intestinal. E detectar genes (*abp 118 alpha* e *Sal B*) codificadores de bacteriocinas em 25 cepas de *Lactobacillus salivarius* isoladas do ingluvío e cecos de matrizes pesadas de linhagem comercial.

2. Revisão de literatura

2.1. Aditivos

Devido a grande competitividade na conquista de mercado em relação às demais atividades agropecuárias, a avicultura industrial tem demonstrado nas últimas décadas uma constante evolução técnica, com a obtenção de produtos avícolas de baixo custo, saudáveis e altamente nutritivos (FULLER, 1989).

Por vários anos o setor avícola utiliza aditivos em rações com a finalidade de melhorar o processo digestivo e promover melhor desempenho zootécnico das aves (FURLAN *et al.*, 2004). Entre os aditivos mais empregados para promover o crescimento estão os antibióticos, que são adicionados às dietas com o intuito de controlar os agentes prejudiciais ao processo digestivo e propiciar os efeitos benéficos na absorção de nutrientes (VASSALO *et al.*, 1997).

Nos Estados Unidos, os produtores de animais utilizavam, em 1998, aproximadamente 20 milhões de toneladas de antibióticos para aumentar o desempenho animal (ANTIBIÓTICOS, 1998). A partir da década de 70 e 80, autoridades do órgão internacional de saúde, *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA passaram a se preocupar com as rações animais que continham antibióticos (MENTEN, 2001).

Bactérias potencialmente patogênicas para animais e humanos presentes em produtos de origem animal, assim como o aumento de sua resistência aos antimicrobianos utilizados como suplementos alimentares, levaram as autoridades ao questionamento do uso indiscriminado de antimicrobianos como aditivos (SWANN COMMITTEE, 1969), culminando com a proibição do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento em animais pela União Européia a partir de 2006 (COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION, 2007).

Difícil imaginar a produção animal, nos níveis atuais de tecnificação e produtividade, sem o auxílio de aditivos na prevenção de doenças ou como promotores de crescimento (PATTERSON e BURKHOLDER, 2003; REVINGTON, 2007). As perspectivas para a substituição dos antibióticos como promotores de crescimento estão sendo direcionadas para o uso de prebióticos, probióticos, acidificantes (ácidos orgânicos), enzimas e fitoterápicos (MROZ, 2003), sem causar danos a microbiota intestinal normal e sem deixar resíduos na carcaça dos animais (FULLER, 1989).

A necessidade da qualidade e segurança dos alimentos para a manutenção da saúde é reconhecida internacionalmente, pois as doenças veiculadas representam problemas de saúde pública e uma importante causa de redução da produtividade econômica (DELAZARI, 2001). No Brasil, as infecções humanas por *Salmonelas* constituem a mais importante das doenças transmitidas por alimentos. Essa contaminação torna-se um dos maiores desafios da avicultura industrial mundial devido à perda de produtividade, aumento da mortalidade e à contaminação de produtos de origem avícola para o consumo humano (SANTOS e TURNES, 2005).

2.2. Microbiota intestinal das aves

A microbiota intestinal das aves é composta de inúmeras espécies bacterianas, formando um sistema complexo e dinâmico, responsável por influenciar decisivamente em fatores microbiológicos, imunológicos, fisiológicos e bioquímicos no hospedeiro, podendo ser modulada pela composição da dieta (TANNOCK, 1998).

Em animais saudáveis, esta composição microbiana permanece estável, mas quando se quebra a estabilidade devido a fatores internos (HAVENAAR *et al.*, 1992) ou externos como alteração na dieta (TANNOCK e SAVAGE, 1974), e administração de antibióticos, podendo desestabilizar a microbiota, proporcionando aos microrganismos patogênicos a oportunidade de colonizar o intestino e determinar infecção (HAVENAAR *et al.*, 1992).

Nas aves com microbiota estabelecida, *Lactobacillus salivarius*, *L. fermentum* e *L. reuteri* predominam no ingluvío e intestino delgado, enquanto *L. acidophyllus* é encontrado no ingluvío, cloaca, duodeno, jejuno e cecos, apresentando funções benéficas contra bactérias patogênicas (MACHADO, 2000).

Segundo Cocconcelli (1993), as bactérias da microbiota intestinal, podem produzir uma variedade de substâncias antimicrobianas. As bactérias ácido lácticas são as mais conhecidas na indústria avícola, podendo transformar o produto final da fermentação da lactose em ácido láctico (homofermentativas), e/ou etanol, acetato e dióxido de carbono (heterofermentativas). Com o aumento do ácido láctico é possível ocorrer a diminuição do pH intestinal, impossibilitando a sobrevivência de microrganismos patogênicos. Podem também produzir peróxido de hidrogênio, inibindo o crescimento de certas bactérias anaeróbias, bem como bacteriocinas cuja ação antagônica podem inativar ou matar outras espécies bacterianas (MICHAEL *et al.*, 1997).

Bactérias intestinais, utilizando-se de ingredientes alimentares não absorvidos integralmente pelo hospedeiro (prebiótico), produzem alguns ácidos orgânicos, como o propiônico, acético, butírico e o láctico, além do peróxido de hidrogênio, cujos espectros de ação incluem também a inibição do crescimento de bactérias patogênicas (GIBSON e ROBERFROID, 1995).

De acordo com Loddi *et al.* (2004), as dietas suplementadas com mananoligossacarídeos (MOS) melhoram a conversão alimentar com o incremento da altura e largura dos vilos. A adição de MOS + ácidos orgânicos (acidificantes), aumentou a porcentagem de células basais no duodeno das aves até os 21 dias de idade.

Os prebióticos contendo D-Manose (mananoligossacarídeos), além das suas propriedades convencionais, atuam bloqueando os sítios de aderência, imobilizando e reduzindo a capacidade de fixação de algumas bactérias patogênicas na mucosa intestinal (GIBSON e ROBERFROID, 1995). Outros benefícios dos MOS estão ligados ao fato destes exercerem uma ação imunomoduladora, que pode ser por meio do aumento da concentração de imunoglobulina A (IgA) secretória (KRABBE, 2001).

2.3. *Salmonelose e saúde pública*

A salmonelose aviária é o termo que designa um grande grupo de doenças aviárias agudas ou crônicas, causadas por um ou mais membros do gênero *Salmonella* (GAST, 1997). Estas têm se adaptado em diversas condições ambientais, resistindo às melhorias das práticas sanitárias, tratamentos químicos e drogas antimicrobianas. São introduzidas no ciclo de produção avícola pelo incubatório, ração, galpões, roedores e homem (SHACKELFORD, 1998), acarretando um relevante problema de saúde pública, originado pela ingestão de alimentos contaminados durante o processamento industrial e/ou indevidamente preparados (McGARR *et al.*, 1980).

Segundo Gast (1997) e Tood (1997), a grande incidência de infecção alimentar em humanos se deve à ingestão de produtos de origem aviária contaminados e/ou indevidamente preparados, visto que as aves são reservatórios de *Salmonella* spp. Embora aves adultas sejam relativamente resistentes à invasão sistêmica, pode ocorrer à colonização do trato digestivo na ausência de doença (BARROW, 2000).

Salmonella Enteritidis pode ser transmitida para os ovos em decorrência da infecção do oviduto (DESMIDT *et al.*, 1997). Há também a possibilidade de ovos se tornarem contaminados após a formação da casca pelo contato com fezes contaminadas na cloaca ou mesmo no ambiente (McILROY *et al.*, 1989). Estes microrganismos colonizam o trato intestinal das aves, sendo excretados nas fezes e entrando na cadeia alimentar humana (UNIVERSITY..., 2006). Alguns sorotipos são mais restritos ao trato intestinal, enquanto outros são capazes de invadir a corrente circulatória e desencadear septicemia nas aves (BARROW, 1995).

A invasão do epitélio intestinal das aves ocorre via superfície apical, quando *Salmonella* induz à ruptura e o afastamento das microvilosidades, provocando a endocitose e migrando pela célula. Acredita-se que a invasão ocorra por um receptor mediador de endocitose, embora esses receptores não tenham sido identificados. A complexidade do mecanismo de invasão da

Salmonella mostra sua alta capacidade de invadir diferentes tipos de células (CHADFIELD *et al.*, 2003). Durante a infecção sistêmica elas interagem com macrófagos e fagócitos polimorfonucleares, sendo a habilidade para se multiplicar dentro destas células um pré-requisito para virulência (MASTROENI *et al.*, 1995).

Embora aves adultas sejam relativamente resistentes à multiplicação sistêmica, independente da presença de manifestações clínicas, os sorotipos relacionados com o paratifo aviário estão associados a casos de infecção alimentar no homem (BARROW, 2000).

Salmonella Enteritidis é o sorotipo de maior significância em saúde pública (POPPE, 1999), intrinsecamente relacionado com infecção alimentar por ovos e seus derivados (SMITH, 1989). No Brasil, significativo aumento de *S. Enteritidis* foi detectado a partir de 1993, tornando-se, desde 1994, o sorotipo mais freqüentemente isolado de casos de infecções humanas, e também de materiais de origem não humana, principalmente de alimentos destinados ao consumo humano. O Instituto Adolfo Lutz (IAL) analisou 5.490 cepas de *Salmonella* isoladas de 1991 a 1995, provenientes de infecções humanas (2254 cepas) e de materiais de origem não humana (3236 cepas), evidenciando aumento significativo na participação da SE. Assim, em 1991 este sorotipo correspondeu a 1,2% das cepas de *Salmonella* isoladas, 2% em 1992, 10,1% em 1993, 43,3% em 1994, e 64,9% em 1995. Este aumento verificado a partir de 1993 esteve associado à ocorrência de surtos de diarreia veiculados por alimentos (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS..., 2007). Em muitos casos, a SE determina uma doença auto limitante, mas, particularmente em crianças e idosos, pode ser grave o suficiente para requerer internamento hospitalar, por se tornar invasiva e causar a morte (GREIN *et al.*, 1997). A transmissão de agentes infecciosos dentro de uma população é uma das preocupações em saúde pública (SALMONELLA..., 2006).

2.4. Exclusão competitiva - probióticos

O efeito protetor da microbiota intestinal contra a colonização por

patógenos é conhecido há muitos anos e tem sido amplamente aceito (PARRA, 1994). A habilidade de proteção conhecida como exclusão competitiva (EC), foi primeiramente descrita pelo professor Esko Nurmi na Finlândia, em 1973, relatando que o conteúdo intestinal de aves adultas normais, administrado oralmente às aves com um dia de idade, alterava sua sensibilidade à infecção por *Salmonella* spp, prevenindo o estabelecimento desta no intestino (NURMI e RANTALA, 1973).

De acordo com Sanders (1998) e Tannock (1998), as culturas probióticas propiciam benefícios à saúde por meio da inibição do crescimento de microrganismos patogênicos. Esses produtos contendo bactérias promotoras de benefícios são denominados de probióticos, compostos por microrganismos vivos capazes de promover o equilíbrio da microbiota intestinal, exercendo assim efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro (MILLES, 1993).

O termo probiótico designa suplemento alimentar composto de organismos viáveis, que quando consumidos agem no trato gastrointestinal do hospedeiro, beneficiando-o por meio do estímulo das propriedades existentes na microbiota natural (FULLER, 1989). Segundo Cocconcelli (1993), as bactérias da microbiota intestinal e/ou probióticos, podem produzir uma variedade de substâncias antimicrobianas como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, com ação antimicrobiana, especialmente em relação às bactérias patogênicas.

Produtos probióticos e prebióticos, embora não apresentem todas as ações benéficas dos antibióticos, não determinam resíduos nos produtos de origem animal e não desenvolvem resistência às drogas utilizadas em seres humanos, por serem produtos essencialmente naturais (SILVA e ANDREATTI FILHO, 2000).

Lilly e Stillwell (1965) foram os primeiros a utilizar o termo probiótico, verificando a ação de microrganismos como promotores de crescimento. Desde o início do século passado é conhecido o efeito benéfico de determinados microrganismos sobre a integridade da microbiota intestinal. O cientista Elie Metchnikoff ressaltava a importância da ingestão contínua de produtos lácticos fermentados compostos por *Lactobacillus* para a promoção da saúde, aumentando a longevidade dos camponeses búlgaros que os consumiam (METCHNIKOFF, 1907).

De acordo com Fuller (1989), probiose é a capacidade dos microrganismos do trato intestinal de resistir ao crescimento exagerado de cepas normais e ao estabelecimento de cepas invasivas, enquanto que os probióticos são utilizados para reforçar ou restabelecer esta probiose quando esta for quebrada por fatores adversos.

Andreatti Filho e Sampaio (1999) relataram que os probióticos devem ser utilizados o mais cedo possível nas aves, a fim de que as bactérias presentes nos produtos colonizem e se multipliquem no trato intestinal das aves, iniciando suas atividades benéficas ao hospedeiro antes desse ser contaminado por algum patógeno. Os probióticos podem ser aplicados de várias formas, como: adicionados às rações; na água de bebida; pela pulverização sobre os animais; em cápsulas gelatinosas; por meio da inoculação em ovos embrionados e na cama usada de aves.

Os prováveis mecanismos de ação dos probióticos na melhoria da digestibilidade e, conseqüentemente, na melhora no ganho de peso de frangos de corte podem ser resumidos à redução do pH, resultante da produção de ácidos orgânicos, e ao crescimento e desenvolvimento diferenciados das bactérias, criando-se um ambiente de exclusão competitiva. Os modos de ação pressupostos aos probióticos, segundo Guillot (2000), são enumerados a seguir:

1. Efeito Nutricional - os probióticos atuam produzindo enzimas auxiliares na digestão dos alimentos. A produção de vitaminas e substâncias antimicrobianas melhoraria o status sanitário;

2. Efeito Sanitário - os probióticos aumentariam a resistência à colonização por patógenos do trato gastrointestinal. Acredita-se que os probióticos estimulem as respostas imunológicas das aves.

3. Efeito Microbiológico - há probióticos com diferentes composições de microorganismos e, mesmo aqueles pertencentes à mesma espécie, podem ter diferentes cepas. A eficácia dos produtos é estritamente dependente da quantidade e das características das cepas dos microorganismos utilizados na elaboração do produto a ser usado como aditivo alimentar. É importante que as bactérias sejam hospedeiro-específicas para que a máxima eficácia do produto seja atingida (BUTOLO, 2001).

2.5. Prebiótico

A colonização do epitélio intestinal das aves por microorganismos patogênicos ocorre quando estes proliferam em número suficiente para produzir um quadro clínico de doença. É o caso das *Salmonellas*, que durante o processo de proliferação microbiana aderem às células epiteliais, ligando-se a estas por meio de fímbrias em sítios de ligação específicos ricos em resíduos de manose (MILLES, 1993).

Produtos prebióticos são considerados aqueles ingredientes não digestíveis que estimulam o crescimento e/ou a atividade de um limitado número de microorganismos capazes de proporcionar um ambiente intestinal saudável ao hospedeiro (GIBSON e ROBERFROID, 1995). Segundo Martin (1994), a utilização de carboidratos não digestíveis como parede celular de plantas e leveduras, classificados como complexos de glicomananoproteínas e em particular os mananoligossacarídeos (MOS), são capazes de se ligar a fímbria das bactérias e inibir a colonização do trato gastrointestinal por microorganismos patogênicos.

Alguns prebióticos são obtidos por polimerização direta de oligossacarídeos da parede celular de leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* (BALLOU, 1977). A combinação de probiótico e prebiótico é denominada de simbiótico e constitui um novo conceito na utilização de aditivos em dietas para aves. A ação simbiótica estabiliza o meio intestinal e aumenta o número de bactérias benéficas produtoras de ácido lático, favorecendo a situação de eubiose (FULLER, 1989).

As bactérias probióticas juntamente com os prebióticos têm a capacidade de modulação de respostas imunes sistêmicas, aumentando o número e atividade de células fagocitárias do hospedeiro. Essa ação assume grande importância nas aves, onde o trato intestinal é o órgão de maior desenvolvimento de imunidade geral inespecífica, diferindo de todas as outras espécies animais (SILVA, 2000).

2.6. Bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus* spp)

As bactérias benéficas denominadas de bactérias ácido lácticas são encontradas em alimentos como leite, carne e vegetais, compondo também a microbiota normal da cavidade oral e intestino de aves e mamíferos. Os principais representantes são os gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Vagococcus* e *Streptococcus*, formando um grupo de bactérias com características morfológicas, metabólicas e fisiológicas comuns. As identificações bacterianas com o auxílio das características morfológicas dividem os grupos dessas bactérias em bacilos (*Lactobacillus* e *Carnobacterium*) e cocos (as demais) (AXELSSON, 1993).

Para a identificação dos *Lactobacillus* isolados de carne e outros produtos, Schillinger e Lucke (1987), propuseram um esquema baseado nas diferenças do perfil de fermentação de alguns carboidratos, permitindo assim, uma rápida classificação das espécies. Há muito interesse pela identificação dessas bactérias devido a grande importância econômica para a indústria alimentícia. Os estudos sobre a fisiologia, bioquímica, genética e biologia

molecular desses microrganismos tiveram um avanço significativo, levando à detecção de outros compostos que ocasionam o fenômeno da antibiose, como as bacteriocinas (DAVIDSON e HOOVER, 1993). Os efeitos benéficos para saúde humana ou animal despertaram o interesse dos cientistas desde as primeiras observações de Elie Metchnikoff (1907), pois o uso terapêutico dos *Lactobacillus* na prevenção ou cura de diversas desordens gastrointestinais é conhecido há muito anos (CHAVES *et al.*, 1999).

A eficácia e espectro de ação contra microrganismos patogênicos ocorrem devido uma gama de metabólitos produzidos por essas bactérias, denominadas de substâncias antimicrobianas, as quais incluem os ácidos orgânicos como os ácidos láctico e acético (GILLILAND e SPECK, 1972), o peróxido de hidrogênio que inibe o crescimento de patógenos através de forte efeito oxidante nas células bacterianas (PRICE e LEE, 1970; GILLILAND e SPECK, 1972), ou pela destruição molecular da estrutura básica dos ácidos nucléicos e proteínas celulares (DAHL *et al.*, 1989), e produção de proteínas específicas ou complexo de proteínas denominadas bacteriocinas (TAGG *et al.*, 1976; KLAENHAMMER, 1988), as quais são conhecidas como peptídeos com ação bactericida ou bacteriostática, demonstrando atividade antagônica a microrganismos patogênicos (BRUNO e MONTIVILLE, 1993).

2.7. Bacteriocinas

As primeiras bacteriocinas descobertas por Gratia em 1925 foram as colicinas de *Escherichia coli* (CURSINO *et al.*, 2002). Segundo Tagg *et al.* (1976), o termo bacteriocina referia-se a proteínas que apresentavam estreito espectro de atividade inibitória, presença essencial de uma fração protéica biologicamente ativa, modo de ação bactericida, ligação a receptores celulares específicos e informação genética plasmidial determinante da produção e da imunidade das células alvo da bacteriocina.

Esta definição tinha como base as proteínas do tipo colicinas, as quais foram usadas como sistema modelo para investigar a ecologia geral das bacteriocinas (MOTA-MEIRA *et al.*, 2000). Entretanto, estudos posteriores

demonstraram que poucas substâncias protéicas com ação antagônica, especialmente as produzidas por bactérias ácido lácticas, ajustam-se adequadamente nos moldes da definição clássica para as colicinas (TAGG *et al.*, 1976).

Kaiser e Montville (1996) definiram as bacteriocinas de bactéria ácido lácticas como pequenas proteínas catiônicas, apresentando de 30 a 60 resíduos de aminoácidos, ponto isoelétrico elevado e que variam consideravelmente quanto ao microrganismo produtor, espectro de ação, peso molecular e propriedades bioquímicas.

Klaenhammer (1993) dividiu as bacteriocinas de bactérias ácido lácticas em quatro classes (I, II, III e IV), de acordo com sua estrutura e características bioquímicas. As bacteriocinas da classe I são pequenos peptídeos que agem na membrana e possuem o aminoácido modificado lantionina (chamadas de lantibióticos). De acordo com Dirix *et al.* (2004), bacteriocinas da classe II são peptídeos catiônicos e hidrofóbicos, de 20 a 60 aminoácidos, resistentes ao calor e não modificados pós-traducionalmente, exceto por pontes de dissulfeto.

A classe III é composta por bacteriocinas de maior peso molecular (>30 KDa), sensíveis ao calor e, das quais, se tem pouca ou nenhuma informação sobre seu modo de ação (HÉCHARD e SAHL, 2002). Na classe IV estão inseridos peptídeos complexos, compostos por lipídios ou carboidratos (HU, 2003).

As bacteriocinas são um grupo muito heterogêneo de compostos antimicrobianos protéicos sintetizados pelo ribossomo (DIEP e NES, 2002). Devido a essa diversidade de estrutura, elas estão inseridas em uma grande família de proteínas secretadas por bactérias Gram-positivas, patogênicas e não-patogênicas (CINTAS *et al.*, 1998).

A nisina, produzida por algumas cepas de *Lactococcus lactis*, é a bacteriocina melhor caracterizada atualmente, sendo produzida comercialmente e legalizada para utilização na preservação de alimentos (GARCERÁ *et al.*, 1993), a qual inibe uma série de bactérias patogênicas (CLEVELAND *et al.*, 2001). Também tem sido testada como produto-base em formulações dermatológicas, agindo contra bactérias causadoras de infecções de pele (ERASO e INÊS, 2004). Muitas outras bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas estão sendo ainda caracterizadas (JOOSTEN *et al.*, 1996). Algumas são utilizadas para preservação de alimentos na indústria de carnes e laticínios, como a pediocina, produzida pela bactéria *Pediococcus acidilactici* (HU, 2003).

Na odontologia, uma série de bacteriocinas de bactérias Gram-positivas tem sido testada e acredita-se que, em breve, estarão disponíveis para tratamento e prevenção de cáries causadas por *Streptococcus mutans* (BALAKRISHNAN *et al.*, 2001).

Na medicina veterinária, o potencial terapêutico da bacteriocina purificada de *Lactobacillus plantarum* foi demonstrado em frangos infectados com *Escherichia coli* patogênica, onde as aves tratadas com a bacteriocina foram negativas para colibacilose (OGUNBANWO *et al.*, 2004). Em cães, espécies de *Enterococcus*, produtora de substâncias antagonísticas do tipo bacteriocina foram capazes de inibir bactérias da família *Enterobacteriaceae* que freqüentemente causam infecções intestinais nestes animais (STOMPFOVÁ *et al.*, 2004).

Na avicultura, espécies de *Lactobacillus* utilizadas como probióticos, produzem uma variedade de substâncias antimicrobianas como as bacteriocinas (MICHAEL *et al.*, 1997). *Lactobacillus reuteri* que habita naturalmente o trato gastrointestinal de humanos e animais, incluindo as aves, demonstra capacidade de sintetizar e secretar substâncias antimicrobianas denominadas de reuterina, com ação antagônica contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, leveduras, fungos, protozoários e vírus (AXELSSON, 1998).

Há diversas técnicas para detectar a produção de bacteriocinas, baseadas na inibição do crescimento de microrganismo indicador (sensível) por uma cepa teste (produtora), pela difusão das bacteriocinas em meio de cultura sólido ou semi-sólido (TAGG *et al.*, 1976). A prova de atividade antimicrobiana indireta, por meio do teste de difusão em ágar, visa avaliar se a inibição foi devido à ação de substâncias semelhantes às bacteriocinas ou provocadas por outras substâncias produzidas e liberadas no meio extracelular pelas bactérias lácticas (PRADO *et al.*, 2000).

Lima *et al.* (2007), utilizando o método de difusão em poços, demonstraram que cepas de *Lactobacillus* produtoras de substâncias antimicrobianas apresentaram ação antagônica frente aos microrganismos indicadores dos gêneros *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria* e *Salmonella*.

A atividade de uma bacteriocina pode ser estimada a partir do tamanho das zonas de inibição produzidas em teste de difusão (MONTVILLE e WINKOWSKI, 1997). Lima *et al.* (2007), comparando os diâmetros dos halos de inibição das cepas de *Lactobacillus reuteri* produtoras de substâncias antimicrobianas, constataram maior ação antimicrobiana frente aos microrganismos indicadores do gênero *Salmonella* em comparação ao gênero *Enterococcus*, enquanto as amostras de *Lactobacillus* spp. apresentaram maior ação frente aos microrganismos indicadores do gênero *Enterococcus* quando comparadas as amostras de *L. reuteri*.

2.8. Estrutura genética das bacteriocinas

Devido à importância dos estudos sobre as bacteriocinas, alguns pesquisadores exploraram os métodos utilizados para sua detecção, suas propriedades físico-químicas, genéticas e suas condições de produção (MAYR-HARTING *et al.*, 1972).

Jack *et al.* (1995), demonstraram que a organização genética para produção das bacteriocinas de bactérias Gram-positivas é muito diferente das

colicinas. Há tipicamente oito a doze genes quando comparados à quantidade de dois a três requeridos para colicinas. Por exemplo, a agrupação de genes necessários para a síntese da nisina inclui um gene para o peptídeo (*nisA*), genes para enzimas que modificam aminoácidos (*nisB*, *nisC*), para o rompimento de péptido líder (*nisP*), gene para a secreção (*nisT*), genes para a imunidade (*nisI*, *nisFEG*) e para a regulação da expressão (*nisR*, *nisK*) (ENGELKE *et al.*, 1992; KUIPERS *et al.*, 1993; BUCHMAN *et al.*, 1998). Estes grupos de genes se localizam geralmente em plasmídios, mas ocasionalmente também são encontrados em cromossomos e transposons (DODD *et al.*, 1990).

Os conjuntos gênicos das bacteriocinas podem ser constituídos de até 13 genes. Além dos genes estruturais da bacteriocina e genes de imunidade neste conjunto, também estão presentes genes que controlam as modificações pós-traducionais, os regulatórios e os que codificam o aparato de exportação destas proteínas (RILEY e WERTZ, 2002). Frequentemente, bacteriocinas de uma mesma classe apresentam semelhantes conjuntos gênicos para biossíntese (NES *et al.*, 1996).

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido utilizada para detectar genes responsáveis pela produção de bacteriocinas e regulação das culturas bacterianas produtoras, uma vez que Rodriguez *et al.* (1995), demonstraram o gene estrutural da lactocina S em 75 bp de fragmento de genes e sete cepas bacteriocinogênicas de *Lactobacillus* isolados de salsichas fermentadas. Garde *et al.* (2001) também detectaram o gene para a síntese da lactocina 481 e nisina, utilizando PCR com provas específicas para amostras de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* provenientes do leite.

Poeta *et al.* (2006), também utilizando PCR, estudaram a presença de genes que codificam os fatores de virulência e bacteriocinas (*entA*, *entB*, *entP*, *entQ*, *entAS-48*, *entL50 A/B*, *cyl* e *bac31*) em 76 amostras de *Enterococcus* isoladas de fezes de aves. Os estudos demonstraram a detecção dos genes *entA* e *entB* em nove cepas de *E. faecium* e o gene *cyl* em sete cepas de *E. faecalis*, as quais mostraram atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*.

3 Objetivos

3.1. Geral

3.1.1. Verificar a capacidade protetora de substâncias prebióticas (mananoligossacarídeos) e *Lactobacillus* spp.(probiótico) em carcaças e órgãos de frangos de corte desafiados com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SE), observando-se também alterações na morfologia da mucosa intestinal.

3.1.2. Detectar genes (*abp 118 alpha* e *Sal B*) codificadores de bacteriocinas em 25 cepas de *Lactobacillus salivarius* isoladas do ingluvío e cecos de matrizes pesadas de linhagem comercial.

3.2. Específicos

Frangos de corte tratados com prebióticos e *Lactobacillus reuteri*, *L. salivarius* e *L* spp como probiótico, e desafiadas com SE foram mensuradas individualmente com os seguintes parâmetros:

3.2.1. Cultivo microbiológico de fígado e carcaça para verificar a capacidade de proteção frente a SE.

3.2.2. Contagem bacteriana do ingluvío e cecos para verificar a capacidade de proteção frente a SE.

3.2.3. Mensurar profundidades de criptas da porção proximal do duodeno.

3.2.4. Detectar genes (*abp 118 alpha* e *Sal B*) codificadores de bacteriocinas das cepas de *Lactobacillus salivarius*.

4. Material e métodos

4.1. Detecção dos genes de bacteriocinas utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 1) utilizados para amplificação dos genes foram delineados com base na seqüência de fragmentos dos genes para as 25 cepas de *Lactobacillus salivarius* obtidas a partir do ingluvío

e cecos de aves, no Laboratório de Ornitopatologia, FMVZ – UNESP campus de Botucatu. O protocolo de extração de DNA foi realizado segundo a metodologia descrita por Oliveira *et al.* (2002).

TABELA 1. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizados para amplificação dos genes *abp 118 alpha* e *Sal B*.

Gene-alvo	Seqüência Primer	Tamanho do fragmento
<i>abp 118 alpha</i>	S 5' TAC ACT ACT TTA CTT ATT AGA CT 3'	411 pb
	A 5' TGA ACC CAG CGA TTT CCA CTA 3'	
<i>Sal B</i>	S 5' AAT CGC TAA ACT CAT AAC CT 3'	312 pb
	A 5' CCC AGC GAT TTC CAC TAC CA 3'	

(S = sense; A = antisense; pb = pares de bases)

4.2. Extração do DNA bacteriano

Ao microtubo que continha 250µL da suspensão bacteriana proveniente do caldo DeMan-Rugosa-Sharpe (MRS - OXOID), foi adicionado 100µL de cloreto de sódio (NaCl) 5M e 100µL de cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) pré-aquecido a 65°C.

O microtubo, contendo a suspensão, foi agitado por 10 segundos até obter aspecto leitoso e posteriormente incubado por 10 minutos a 65°C. Após este período foram adicionados ao mesmo, 750µL de clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1), agitado por 10 segundos com movimentos leves e em seguida centrifugado em temperatura ambiente por cinco minutos a 20.800 x g.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 450 µL de etanol absoluto a - 20°C, incubando-o durante 10 minutos a - 20°C. Em seguida centrifugou-se a 4°C durante 20 minutos a 20.800 x g, eliminando o álcool e acrescentando-se 500µL de etanol a 70% (temperatura ambiente), seguido do mesmo procedimento de centrifugação acima citado. O álcool foi eliminado novamente e o microtubo contendo o pelet foi submetido à secagem a 56°C no banho seco (Termolyne). Após a completa secagem do pelet, adicionou-

se 50µL de tampão de diluição (10mM Tris-HCL, 1mM EDTA) pH 8,0; previamente aquecido a 56°C. As amostras de DNA foram mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos, posteriormente armazenadas a - 20°C até a sua utilização na PCR.

4.2.1. Quantificação do DNA

Foi realizada por meio de espectrofotômetro (Quant Gene II), utilizando 495µL de Tris EDTA (TE) pH 8,0, acrescido de 5µL do DNA molde para avaliação da absorvância (A260), razão (A260/ A280) e concentração de DNA em 50µg/ µL.

4.2.2. Normalização das amostras

Nas amostras que apresentaram concentração de DNA maior do que 0,1µg/µL, realizou-se o cálculo com base nesta concentração, tendo como resultado a quantidade de TE e DNA necessárias para normalização.

4.2.3. Amplificação das amostras

A reação de amplificação com volume total de 25µL foi realizada com dois conjuntos de primers para detecção dos genes (Tabelas 2 e 3).

TABELA 2. Reação da PCR para amplificação das amostras de DNA do gene *abp 118 alpha*.

Constituintes da reação		Inicial	1 x (μL)	Final
Água ultrapura (MiliQ)		-	14,75μL	1,0 x
Tampão para PCR (buffer)		10 x	2,5μL	2,50 mM
Cloreto de Magnésio		50 mM	1,25μL	0,20mM
DNTPs		20 mM	0,25μL	0,40 μM
Primer S	<i>abp 118 alpha 1</i>	10 μM	1,0μL	0,40 μM
Primer A	<i>abp 118 alpha 2</i>	10 μM	1,0μL	0,40 μM
Enzima	Taq DNA	5 U/μL	0,25μL	8,0 ng/μL
Volume da amostra	DNA	0,1μg/μL	4,0μL	-
Volume total		-	25,0μL	

TABELA 3. Reação da PCR para amplificação das amostras de DNA do gene *Sal B*.

Constituintes da reação		Inicial	1 x (μL)	Final
Água ultrapura (Mili-Q)		-	14,75μL	1,0 x
Tampão para PCR (buffer)		10 x	2,5μL	2,50 mM
Cloreto de Magnésio		50 mM	1,25μL	0,20 mM
DNTPs		20 mM	0,25μL	0,40 μM
Primer 1 S	<i>Sal B 1</i>	10 μM	1,0μL	0,40 μM
Primer 2 A	<i>Sal B 2</i>	10 μM	1,0μL	0,40 μM
Enzima	Taq DNA	5 U/μL	0,25μL	8,0 ng/μL
Volume da amostra	DNA	0,1μg/μL	4,0μL	-
Volume total		-	25,0μL	

O programa utilizado para a amplificação das amostras de DNA consistiu de temperatura, tempo e repetições na PCR (Tabela 4). Após o término do programa os tubos foram mantidos sob refrigeração.

TABELA 4. Programa para amplificação das amostras de DNA.

Condições	Temperatura	Tempo	Repetições
Pré – PCR	94°C	5'	1
PCR	94°C	1'	40
	54°C	30"	
	72°C	1'	
Pós – PCR	72°C	7'	1

4.2.4. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão constituído de Tris, ácido bórico e EDTA (TBE) (SAMBROOK e RUSSEL, 2001) contendo brometo de etídio (10mg/mL). As imagens dos géis foram visualizadas mediante exposição do gel à luz UV em transiluminador (UVP – LM/26E). Os fragmentos foram identificados com base na utilização de marcadores de peso molecular (PM) de 50 a 100 pb.

4.3. Avaliação da Capacidade de Proteção de Lactobacillus

4.3.1. Local

Os experimentos foram realizados nas instalações experimentais e no Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, UNESP - Campus de Botucatu, no período de 27 de agosto a 8 de outubro de 2007.

4.3.2. Aves

Foram utilizadas 150 aves de corte, de linhagem comercial, com um dia de idade, não sexadas e livres da administração de quimioterápicos,

provenientes de matrizes com 47 semanas de idade. Os experimentos foram programados para início imediato após a chegada das aves provenientes do incubatório. As aves foram alojadas em galpão experimental contendo 48 boxes de 3,25 x 1,55m, perfazendo 5m² cada (Figura 1). Os boxes foram equipados com uma campânula, um comedouro e um bebedouro pendular. As aves foram divididas em cinco grupos, alojando-se 30 aves por boxe (5 boxes), que receberam seus respectivos tratamentos. Para se comprovar a ausência de *Salmonella* spp., foram adquiridas cinco aves a mais para cada grupo, sendo estas sacrificadas imediatamente após a chegada ao laboratório quando realizou-se procedimento para isolamento de *Salmonella* spp. de acordo com metodologia de Mallinson e Snoeyenbos (1989). Aos 42 dias de idade e imediatamente antes do desafio, 10 aves por grupo escolhidas aleatoriamente foram submetidas à coleta de suabe cloacal, para isolamento de *Salmonella* spp.



FIGURA 1. Galpão experimental – aves alojadas em boxes compostos por um comedouro e um bebedouro pendular.

4.3.3. Delineamento experimental

Cento e cinquenta aves foram divididas em cinco grupos de 30 aves cada. Nos períodos de 1, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de vida, os grupos 3 e 4 foram tratados com *pool* de *Lactobacillus* spp. na concentração de $2,0 \times 10^9$

UFC/mL, via depósito direto no esôfago/inglúvio, com auxílio de pipeta graduada de 1mL. A administração do tratamento com prebiótico mananoligossacarídeos (MOS) para os grupos 4 e 5 foi realizada no período de 1 a 42 dias de vida ininterruptamente, via ração. O desafio com *Salmonella* Enteritidis (SE) foi realizado aos 42 dias de vida das aves 18 horas antes do abate para os grupos 2, 3, 4 e 5, via depósito direto no esôfago/inglúvio na concentração de $3,0 \times 10^6$ UFC/mL.

Tratamentos:

T1 – Aves não tratadas e não desafiadas com SE (controle negativo).

T2 – Aves não tratadas e desafiadas com SE (controle positivo).

T3 – Aves tratadas com *pool* de *Lactobacillus* e desafiadas com SE.

T4 – Aves tratadas com *pool* de *Lactobacillus* spp. e prebiótico (MOS) e desafiadas com SE.

T5 – Aves tratadas com prebiótico (MOS) e desafiadas com SE.

4.3.4. Prebiótico

A administração dos tratamentos para os grupos 4 e 5 foi realizada no período de 1 a 42 dias de vida ininterruptamente, via ração com substâncias prebióticas compostas por mananoligossacarídeos (MOS), forma de pó misturadas a ração, na quantidade de dois Kg por tonelada (BioCamp – Laboratórios Ltda).

4.3.5. Amostras de *Lactobacillus*

Foram utilizadas cinco cepas de *Lactobacillus reuteri*, cinco de *Lactobacillus salivarius* e cinco de *Lactobacillus* spp., isoladas do inglúvio e cecos de matrizes pesadas em produção linhagem comercial, empregando-se cultivo anaeróbio (Anaerobac - PROBAC) em caldo MRS, específico para *Lactobacillus*. As amostras foram identificadas pelo Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Campus de Botucatu, utilizando o teste de hidróxido de potássio, coloração pelo método de Gram, produção de catalase, formação de gás a partir da glicose, teste de fermentação de carboidratos (arabinose, frutose, galactose, glicose, manitol, manose, maltose,

sacarose, salicina e sorbitol), utilização do API 50 CH[®] e Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (multiplex PCR) (LIMA *et al*, 2007).

4.3.6. Inóculo de *Lactobacillus*

As amostras de *Lactobacillus* spp. foram reativadas separadamente em caldo MRS e incubadas a 37°C por 24 horas em anaerobiose. Após o período de incubação, 3mL do cultivo foram retirados de cada tubo, e misturados, formando inóculos na diluição 3:3:3:3:3. O número de unidades formadoras de colônia (UFC) do inóculo ($2,0 \times 10^9$ UFC/mL) foi determinado por diluições decimais em solução tampão de salina fosfatada (PBS) com pH 7,0. Todas as determinações bacterianas foram realizadas pelo plaqueamento de 0,1mL das suspensões (MRS) e respectivas diluições decimais (PBS), em duplicata de ágar MRS. Após o período de incubação a 37°C por 24 horas em condições de anaerobiose, realizou-se a leitura das placas.

Os tratamentos foram realizados nos períodos de 1, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de vida, com administração de 0,5mL do *pool* de *Lactobacillus* spp. por depósito direto no esôfago/inglúvio até 21 dias e 1mL até 42 dias de idade, com o auxílio de pipeta graduada de 1mL. Posteriormente, as aves dos tratamentos T2, T3, T4 e T5 foram desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (0,5mL - esôfago/inglúvio) e após 18 horas do desafio (15 aves por grupo – escolhidas aleatoriamente) foram encaminhadas ao abatedouro. Seguindo os processos de insensibilização (eletroanestesia: imersão em água, durante 1 a 2 segundos: 60V), sangria (2 a 3 minutos), escalda (*Sub scald* - 58-60°C - 30 a 60 segundos) e depenagem. Cada carcaça, constituindo uma única amostra foi embalada em sacos plásticos estéreis, lacrada, identificada e transportada em caixas isotérmicas com gelo ao Laboratório de Ornitopatologia.

4.3.7. Amostra de *Salmonella* Enteritidis

Utilizou-se amostra de *Salmonella enterica* subespécie *enterica*, sorotipo Enteritidis fagotipo 4 (SE), isolada de fígado de matrizes pesadas, sorotipada e fagotipada pelo Instituto Adolfo Lutz em São Paulo-SP, mutante resistente ao ácido nalidíxico (Nal) e rifampicina (Rif), desenvolvida por cultivos

sucessivos em ágar verde brilhante (AVB - OXOID) contendo ácido nalidíxico e rifampicina (100µg/mL de meio), de acordo com Andreatti Filho *et al.* (1997), Weinack *et al.* (1982) e Ziprin *et al.* (1991), para facilitar posterior enumeração bacteriana.

4.3.8. Inóculo de *Salmonella Enteritidis*

Os inóculos foram constituídos de culturas da amostra de SE em caldo infusão de cérebro e coração (BHI - OXOID), incubados a 40°C por 12 horas, e diluído 100 vezes também em BHI no momento do uso. O número de UFC nos inóculos foi determinado por diluições decimais em PBS com pH 7,2. Todas as determinações bacterianas foram realizadas pelo plaqueamento de 0,1mL das suspensões (BHI) e respectivas diluições decimais (PBS), em duplicata de AVB Nal/Rif. A leitura das placas foi realizada após incubação a 40°C por 24 horas, com inóculo de $3,0 \times 10^6$ UFC/mL. Os inóculos foram administrados as aves com 42 dias de idade (grupos 2, 3, 4 e 5) pelo depósito direto no esôfago/inglúvio, com o auxílio de pipeta graduada de 1mL na quantidade de 1mL/ave.

4.3.9. Enxágüe e cultivo das carcaças

Imediatamente após a chegada ao laboratório, realizou-se avaliação microbiológica de 75 carcaças inteiras (15 por grupo) de frango sob refrigeração, utilizando a metodologia recomendada pelo Georgia Poultry Laboratory (1997) e Brasil (1999) com algumas modificações. No preparo das amostras, foi usada 225mL de água peptonada tamponada a 1%, vertidas nas embalagens plásticas, onde cada carcaça estava acondicionada. Procedeu-se à agitação manual vigorosa por um minuto. Os diluentes resultantes do processo de enxágüe foram transferidos, assepticamente, para bolsas estéreis (Nasco - Whirl-Pak®), mantidos em temperatura ambiente por mais 30 minutos e incubados a 37°C por 24 horas. Posteriormente, alíquotas de 1mL de cada amostra foram transferidas para 10mL de caldo seletivo de enriquecimento (tetracionato e selenito cistina) e incubadas a 40°C durante 24 horas. Após a seqüência de enriquecimento, alíquotas dos caldos foram transferidas para placas de Petri contendo ágar MacConkey e AVB, procedendo-se à semeadura em superfície por esgotamento

em estrias, com posterior incubação a 40°C por 24 horas (MALLINSON e SNOEYENBOS, 1989).

4.3.10. Cultivo Microbiológico

1. Fígado

Para pesquisa da SE amostras de fígado das 75 carcaças foram processadas de acordo com a metodologia descrita por Mallinson e Snoeyenbos (1989). As amostras, devidamente identificadas foram transferidas para dois diferentes caldos de enriquecimento seletivo (tetracionato e selenito cistina), na proporção de 1:10. Os tubos foram incubados a 40°C durante 24 horas. Após a sequência de enriquecimento, alíquotas dos caldos foram transferidas para placas de Petri contendo ágar MacConkey e AVB, procedendo-se à semeadura em superfície por esgotamento em estrias. As placas foram incubadas a 40°C por 24 horas.

2. Suabe cloacal

Cinco suabes de cloaca referentes a 10 aves por grupo, foram cultivados visando o isolamento de SE. Após a coleta, os suabes foram acondicionados em tubos estéreis e transportados imediatamente ao laboratório em caixas isotérmicas com gelo. Posteriormente foram cultivados em 10mL de caldo seletivo de enriquecimento (tetracionato e selenito cistina) a 40°C durante 24 horas. Após a sequência de enriquecimento, alíquotas dos caldos foram transferidas para placas de Petri contendo ágar MacConkey e AVB, procedendo-se à semeadura em superfície por esgotamento em estrias. As placas foram incubadas a 40°C por 24 horas (MALLINSON e SNOEYENBOS, 1989).

3. Cecos e ingluvios

Os cecos e ingluvios (75 carcaças de frango) foram removidos assepticamente e transferidos individualmente para bolsas estéreis (Nasco - Whirl-Pak®). Cada amostra devidamente identificada foi macerada, pesada e vertidas em solução de água peptonada tamponada a 1% na proporção de 1:10, obtendo-se diluição 10^{-1} . As amostras foram enxaguadas vigorosamente por 1

minuto e alíquotas de 1mL das culturas do enxágüe foram transferidas para tubos de ensaio contendo 9mL de PBS, realizando-se as demais diluições decimais até 10^{-8} . Todas as determinações bacterianas foram realizadas pelo plaqueamento de 0,1mL das respectivas diluições decimais, em duplicata de AVB Nal/Rif. O inóculo foi espalhado sobre o ágar com auxílio da alça de Drigalski e as placas foram incubadas a 40°C por 24 horas. O número de UFC/mL foi convertido em $\log_{10}$ para a interpretação dos resultados.

4.4. Morfometria das criptas duodenais

Verificou-se a profundidade das criptas da porção proximal do duodeno das 75 carcaças. Amostras individuais de aproximadamente um centímetro de comprimento foram coletadas, abertas pela borda mesentérica, estendidas pela túnica serosa e fixadas em solução de Bouin durante 18 horas. Posteriormente foram recortadas e lavadas em álcool etílico 70%, e desidratadas em série crescente de álcool etílico. Após desidratação, foram diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Em cada lâmina histológica foram colocados seis cortes semi-seriados com 5µm de espessura, sendo que entre estes foram desprezados seis cortes (JUNQUEIRA *et al.*, 2007). Os cortes foram corados segundo a técnica da hematoxilina – eosina (HE), efetuando-se trinta medidas do comprimento das criptas de cada ave para o segmento do duodeno coletado. As medidas foram tomadas a partir da sua base até a região de transcrição cripta/vilosidade. A análise morfométrica do intestino delgado foi realizada em sistema analisador de imagens 414 (Leica) contendo o programa KS-300, através de microscopia de luz, em aumento de 10 vezes.

4.5. Análise Estatística

As análises estatísticas dos dados foram realizadas pelo teste de Goodman para contrastes entre populações binominais dos cultivos microbiológicos das carcaças e fígados (GOODMAN, 1964). Análise de variância não paramétrica para o modelo com um fator (Teste de Kruskal-Wallis) complementar pelo teste de comparações múltiplas de Dann (contagens bacterianas do ingluvío e cecos) e análise de variância paramétrica para o

modelo com um fator complementar pelo teste de comparações múltiplas de Turkey (ZAR, 1999).

5. Resultados

5.1. Amplificação do DNA bacteriano utilizando a PCR

Foram utilizadas seqüências de oligonucleotídeos iniciadores para o gene *Abp* 118 *alpha* baseado no locus AF408405 – 800 bp DNA linear (BCT 24/06/2002 – *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* bacteriocin-like prepeptides *abp* 118 *alpha*) e o gene *Sal* B, locus LSA250831 500 bp DNA linear (BCT 17/11/2004 – *Lactobacillus salivarius* putative *Sal* B de gene for salivaricin B), com o objetivo de detectar os genes codificadores de bacteriocinas das 25 cepas de *Lactobacillus salivarius* utilizados.

As seqüências dos olígos foram desenhadas em programas disponíveis para auxiliar o desenho de *primers*, dentre eles o CODEHOP (ROSE *et al.*, 1998), e outros que podem ser obtidos na Web: <http://alces.med.umn.edu>. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Os produtos da PCR de todas as cepas de *L. salivarius* estudadas foram amplificados usando os olígos dirigidos para a seqüência dos genes *abp* 118 *alpha* e *Sal* B, mas nenhuma banda em gel de agarose correspondente a amplificação do segmento genômico de interesse foi observada neste estudo.

A Figura 2 mostra gel de quantificação de DNA, onde as bandas correspondem ao DNA extraído das amostras de *L. salivarius*.

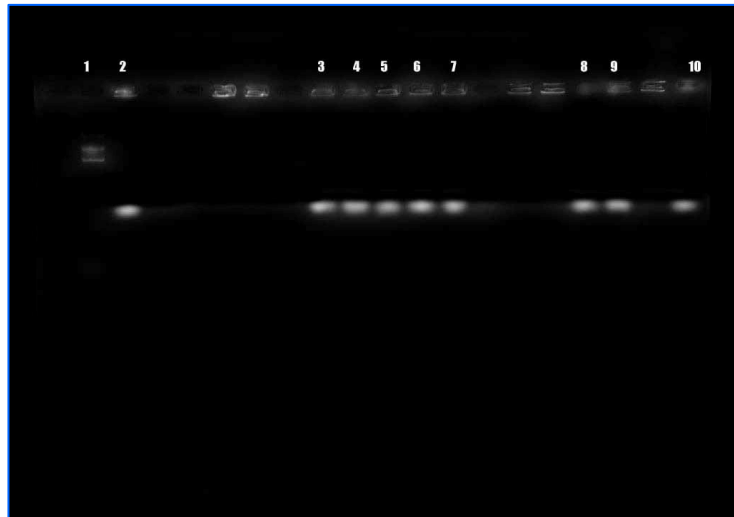


FIGURA 2. Eletroforese em gel de agarose dos produtos correspondentes ao DNA extraído das amostras de *Lactobacillus salivarius* (2 a 10).

5.2. Avaliação da capacidade de proteção dos diferentes tratamentos

5.2.1. Índice de aves infectadas

A quantidade de aves infectadas por *Salmonella* Enteritidis (SE) em cada tratamento esta expressa nas Tabelas 5 e 6, referente ao cultivo microbiológico das carcaças e fígados.

TABELA 5. Índice de carcaças contaminadas por SE. Resultados expressos em número de carcaças contaminadas e não contaminadas/número de carcaça total (percentual).

Tratamentos	Cultivo microbiológico - carcaça	
	Negativo (%)	Positivo (%)
Controle negativo	15/15 (100,0) b	0/15 (0,0) a
Controle positivo	0/15 (0,0) a	15/15 (100,0) b
<i>pool</i> de <i>Lactobacillus</i>	0/15 (0,0) a	15/15 (100,0) b
<i>pool</i> de <i>Lactobacillus</i> + prebiótico	0/15 (0,0) a	15/15 (100,0) b
Prebiótico	0/15 (0,0) a	15/15 (100,0) b

^{a b} Duas proporções seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem significativamente ($P>0,05$) - coluna.

TABELA 6. Cultivo do fígado de aves desafiadas com SE. Resultados expressos em número de fígados contaminados e não contaminados/número de fígado total (percentual).

Tratamentos	Cultivo microbiológico - fígado	
	Negativo (%)	Positivo (%)
Controle negativo	15/15 (100,0) b	0/15 (0,0) a
Controle positivo	3/15 (20,0) a	12/15 (80,0) b
<i>pool</i> de <i>Lactobacillus</i>	6/15 (40,0) a	9/15 (60,0) b
<i>pool</i> de <i>Lactobacillus</i> + prebiótico	4/15 (26,7) a	11/15 (73,3) b
Prebiótico	2/15 (13,3) a	13/15 (86,7) b

^{a b} Duas proporções seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem significativamente ($P>0,05$) - coluna.

Os cultivos microbiológicos das carcaças e fígados para as 15 aves analisadas no controle negativo, apresentaram 100% de negatividade para SE.

Para todos os demais tratamentos, os cultivos das carcaças apresentaram 100% de positividade para SE.

Cultivo microbiológico do fígado demonstrou ao tratamento com prebiótico maior índice de aves infectadas (diferença não significativa), quando comparado com os demais.

5.2.2. Contagem bacteriana - inglúvio

Os resultados das contagens bacterianas de SE em UFC/inglúvio foram representados em medianas (Tabela 7).

TABELA 7. Contagens de SE no inglúvio de aves tratadas com *pool* de *Lactobacillus* e desafiadas com SE. Medianas das unidades formadoras de colônia (UFC/inglúvio) em cada tratamento.

Tratamentos	Medida descritiva – UFC/inglúvio				
	valor mínimo	mediana	valor máximo	média	desvio padrão
Controle negativo	0	0 a	0	0,0	0,0
Controle positivo	7900	15000 b	290000	50354,5	83567,3
<i>pool</i> de <i>Lactobacillus</i>	6000	15000 b	270000	71000,0	101672,0
<i>pool</i> de <i>Lactobacillus</i> + prebiótico	6200	16000 b	260000	61472,7	81315,7
Prebiótico	4500	38000 c	240000	70500,0	83994,3

Medianas seguidas de pelo menos uma letra igual não diferem significativamente ($P>0,05$).

O tratamento controle negativo, relacionado às aves sem desafio com SE, não apresentou a bactéria nos inglúvios.

Todos os grupos tratados e desafiados apresentaram contagem de *Salmonella*, independente do tratamento, sendo que no tratamento com prebiótico houve aumento significativo ($P<0,05$) da quantidade bacteriana quando comparados com os demais.

Nos tratamentos controle positivo, *pool* de *Lactobacillus* e *pool* de *Lactobacillus* + prebiótico não foi observada diferença significativa.

5.2.3. Contagem bacteriana – cecal

Os resultados obtidos nas contagens bacterianas de SE em UFC/cecos foram representados em medianas para os tratamentos T1 – controle negativo, T2 – controle positivo, T3 – *pool* de *Lactobacillus*, T4 – *pool* de *Lactobacillus* + prebiótico e T5 – prebiótico (Tabela 8).

TABELA 8. Contagens de SE nos cecos de aves tratadas com *Lactobacillus* e desafiadas com SE. Medianas das unidades formadoras de colônia (UFC/cecos) em cada tratamento.

Tratamentos	Medida descritiva – UFC/cecos				
	valor mínimo	mediana	valor máximo	média	desvio padrão
Controle negativo	0	0 a	0	0,0	0,0
Controle positivo	0	15000 c	290000	51463,7	90599,9
<i>pool</i> de <i>Lactobacillus</i>	0	8500 b	37000	8590,1	11182,1
<i>pool</i> de <i>Lactobacillus</i> + prébiótico	0	4200 b	19000	19100,0	141298,9
Prebiótico	0	17000 c	450000	69581,2	47131,0

Medianas seguidas de pelo menos uma letra igual não diferem significativamente ($P>0,05$).

O tratamento controle negativo relacionado às aves sem desafio com SE, não apresentou a bactéria nos cecos.

Os grupos tratados e desafiados aos 42 dias de vida apresentaram contagem de *Salmonella*, independente do tratamento.

No grupo apenas desafiado (T2) e o no grupo tratado com prebiótico e desafiado (T5), houve maior quantidade de SE, significativamente diferente ($P<0,05$) da quantidade bacteriana observada nos demais tratamentos.

Nos tratamentos com *pool* de *Lactobacillus* (T3) e *pool* de *Lactobacillus* + prebiótico (T4) não foi observada diferença significativa ($P>0,05$).

5.3. Medida das criptas intestinais

Foram medidas 30 criptas do duodeno em cada ave, obtendo-se a média do comprimento/cripta (Tabela 9).

TABELA 9. Medida da profundidade das criptas do duodeno (μm) de aves tratadas com *pool* de *Lactobacillus* e desafiadas com SE. Médias das criptas em cada tratamento.

Tratamentos	Medida descritiva – criptas				
	valor mínimo	mediana	valor máximo	média	desvio padrão
Controle negativo	99,9	133,1	178,3	142,1 c	26,8
Controle positivo	87,5	121,6	179,4	129,0 bc	25,9
<i>Pool</i> de <i>Lactobacillus</i>	80,5	115,7	137,4	116,6 ab	16,7
<i>pool</i> de <i>Lactobacillus</i> + prebiótico	70,4	93,3	152,0	101,1 a	24,3
Prebiótico	58,8	91,9	134,1	96,1 a	23,2

Médias seguidas de pelo menos uma letra distinta diferem significativamente ($P<0,05$).

A profundidade das criptas apresentou-se maior para os tratamentos controles negativo e positivo (T1 e T2), diferindo significativamente quando comparado aos tratamentos com *pool* de *Lactobacillus* + prebiótico (T4) e probiótico (T5).

Não foi observado efeito significativo ($P>0,05$) sobre profundidade de criptas do duodeno das aves entre os tratamentos controle positivo (T2) e *pool* de *Lactobacillus* (T3).

6. Discussão

6.1. Biologia Molecular

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma das técnicas mais empregadas nas diversas áreas do diagnóstico molecular. Permite a amplificação de uma sequência de interesse contida em uma amostra complexa de DNA e possibilita a adoção de métodos automatizados para a análise do genoma (MOLINA e TOBO, 2004).

No presente estudo foram utilizadas seqüências de oligonucleotídeos iniciadores para o gene *abp 118 alpha* e o gene *Sal B* com o objetivo de detectar os genes codificadores de bacteriocinas de 25 cepas de *Lactobacillus salivarius* isoladas do ingluvío e cecos de aves. Os produtos da PCR de todas as cepas foram amplificados usando os oligos dirigidos para a seqüência dos genes *abp 118 alpha* (sense - 5' TAC ACT ACT TTA CTT ATT AGA CT 3' e anti-sense 5' TGA ACC CAG CGA TTT CCA CTA 3') e do gene *Sal B* (sense 5' AAT CGC TAA ACT CAT AAC CT 3' e anti-sense 5' CCC AGC GAT TTC CAC TAC CA 3'), mas nenhuma banda em gel de agarose correspondente a amplificação do segmento genômico de interesse foi observada neste estudo.

Entretanto, Poeta *et al.* (2006) utilizando-se da PCR, estudaram a presença de genes codificadores de fatores de virulência e bacteriocinas (*entA*, *entB*, *entP*, *entQ*, *entAS-48*, *entL50 A/B*, *cyl* e *bac31*) em 76 amostras de *Enterococcus* isoladas de fezes de aves, demonstrando a detecção dos genes *entA* e *entB* em nove cepas de *Enterococcus faecium* e o gene *cyl* em sete cepas de *Enterococcus faecalis*, as quais mostraram atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*.

Garde *et al.* (2001), detectaram o gene necessário para a síntese da bacteriocina lactocina 481 e nisina, usando PCR com provas específicas para amostras de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* provenientes do leite.

A procura de sequência de DNA e de proteínas nos bancos de dados públicos é uma metodologia eficiente para a obtenção de informações sobre estrutura e função de genes e moléculas (PROSDOMICI *et al.*, 2001), mas o problema da identificação de genes consiste em dada uma sequência de DNA, identificar as regiões codificantes, também chamadas de éxons, nela presente. Essa é não é uma tarefa fácil devido a presença de longos íntrons (regiões não-codificantes) nas seqüências e a falta de um padrão que permita distinguir os éxons das outras partes da seqüência que estão sendo analisadas.

A busca de seqüências de nucleotídeos inicia-se no taxbrowser do NCBI (TAXONOMY..., 2007). Esta ferramenta é usada para se determinar a identificação numeral atribuída, pelo NCBI, ao gênero ou espécie que se deseja estudar. Neste estudo, foi colocado o nome da espécie de interesse e como resultado foi obtido o *Lactobacillus salivarius* subsp *salivarius*. Como existem vários nomes possíveis para uma mesma enzima é importante que todos sejam usados.

Após varias tentativas para o desenho dos primers e mudanças nos protocolos de extração e realização da PCR, nenhuma banda em gel de agarose correspondente a amplificação do segmento genômico de interesse foi observada neste estudo. A quantificação das amostras foi realizada em espectrofotômetro, utilizando Tris EDTA (TE) pH 8,0, acrescido de 5µL do DNA molde para avaliação da absorbância e concentração de DNA em 50µg/µL. A intensidade de fluorescência emitida por amostras de DNA coradas com brometo de etídio é proporcional à massa total de DNA. A quantidade e pureza do DNA extraído foram determinadas por comparação visual de cada amostra com padrões de DNA em gel de 1,5% de agarose (Figura 2).

6.2. Probióticos e prebióticos

A dose de *Salmonella* spp. administrada experimentalmente em pintos de um dia é citada na literatura entre 10^2 a 10^8 UFC/ ave (ZIPRIN *et al.*, 1990). Neste experimento a reprodução da infecção paratífóide (SE) nas aves

com 42 dias, realizada pela inoculação intraesofágica de 10^6 UFC/mL determinou elevado número de aves infectadas, com maior índice de isolamento (100%) nas carcaças de todos os tratamentos, quando comparado ao isolamento no fígado (Tabelas 5 e 6).

Trabalhos preliminares como o conduzido por Suida (1994) avaliou a suplementação do probiótico Calsporin (*Bacillus subtilis*), do antibiótico Nitrovin e de alho (0,3%) nas rações de frangos de corte até os 42 dias de vida. No entanto, não foi observado efeito significativo ($P > 0,05$) da adição do probiótico sobre o desempenho das aves e sobre os valores energéticos das rações experimentais obtidos em ensaio de metabolismo.

No presente estudo, o tratamento semanal com *pool* de *Lactobacillus* até o momento do abate (42 dias), não demonstrou resultado significativo quanto ao índice de aves infectadas por SE. Snoeyenbos *et al.* (1985), descreveram que a colonização do intestino com microbiota intestinal normal, antes do desafio, limita eficazmente a infecção por *Salmonella* spp., mas, não previne totalmente quando o desafio for superior a 10^6 UFC/ave. Segundo Stavric *et al.* (1985), quanto maior a dose desafio, maior será a colonização e infecção por *Salmonella* spp.

Em outro estudo, Zuanon *et al.* (1995) avaliaram o probiótico em substituição ao antibiótico, em diferentes combinações, para avaliar características de desempenho de frangos de corte, no período de 01 a 42 dias de idade. Pelos resultados obtidos os autores verificaram que não ocorreram diferenças significativas para nenhuma das variáveis de desempenho estudadas.

Resultados semelhantes foram obtidos por Vargas Jr. *et al.* (2000), que trabalhando com pintos de corte de 01 a 21 dias, avaliaram a adição de antibiótico, probióticos, prebiótico e suas combinações, não verificando diferença significativa entre os tratamentos para as variáveis ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar.

A ação benéfica dos probióticos de uso em avicultura determina melhores índices zoeconômicos, maior produtividade, aumento no ganho de peso, melhor conversão alimentar e redução da colonização intestinal por patógenos (SILVA, 2000). Embora a dose infectante (10^6 UFC/ave) utilizada neste estudo esteja acima dos níveis de infecção natural, esta não impede a observação da eficácia dos tratamentos com *pool* de *Lactobacillus* e *pool* de *Lactobacillus* + prebiótico, os quais apresentaram menor contagem de SE no inglúvio, quando comparado com o tratamento prebiótico, que demonstrou aumento significativo da quantidade bacteriana em relação aos demais (Tabela 7). Houve maior número de aves infectadas (cultivo fígado) por SE para o tratamento apenas com prebiótico com índice de 86,7%, quando comparado com os demais tratamentos (Tabela 6).

As formas de administração dos probióticos, ou produtos de exclusão competitiva, podem ser por via oral (ANDREATTI FILHO *et al.*, 1997), *in ovo* e *ex ovo* (EDENS *et al.*, 1997), liofilizada em cápsulas (CORRIER *et al.*, 1994a), via cama reutilizada (CORRIER *et al.*, 1992), via cloaca (CORRIER *et al.*, 1994b) e por pulverização (GOREN *et al.*, 1984; SCHNEITZ, 1992). Neste experimento, optou-se pela via oral (inoculação intraesofagiana), visando garantir que cada ave recebesse a dose preconizada.

Dentre os métodos para avaliar a presença da *Salmonella* spp. em aves, inclui-se a contagem e/ou isolamento, a partir da cama do aviário, suabe de arrasto, vísceras, ou similares como baço, fígado, vesícula biliar, gônadas, sangue cardíaco, inglúvio, intestino (cecos, tonsilas cecais, cloaca, reto) e/ou fezes (ANDREATTI FILHO *et al.*, 2000; CORRIER *et al.*, 1991; SNOEYENBOS *et al.*, 1985). Neste experimento procurou-se avaliar o índice de aves infectadas por SE pelos métodos qualitativo e quantitativo, utilizando-se a carcaça e fígado para cultivo bacteriano e o inglúvio e os cecos para contagem.

Na Tabela 7, que expõem as contagens do número de UFC/inglúvio, observa-se menos quantidade de SE para os tratamentos controle positivo, *pool* de *Lactobacillus* e *pool* de *Lactobacillus* + prebiótico, quando comparado com o

tratamento prebiótico, que demonstrou aumento significativo da quantidade de SE em relação aos demais. Para contagem cecal, as aves apenas desafiadas (controle positivo) e as aves tratadas com prebiótico e desafiadas, apresentaram contagem elevada para SE, apresentando diferença significativa ($P < 0,05$) quando comparada com os demais tratamentos (Tabela 8).

O trato gastrointestinal possui característica única entre os diferentes tecidos do frango de corte. Apresenta a mais alta taxa de renovação de todos os tecidos do corpo (MACARI e MAIORKA, 2000). Embora esteja completo anatomicamente à eclosão, possui ainda desenvolvimento pós eclosão, pois a superfície de absorção e a proliferação de enterócitos aumentam (MORAN, 1985, FRIEDMAN *et al.*, 2003) e as funções de absorção e digestão podem ser afetadas (MAIORKA *et al.*, 2002).

Alguns trabalhos têm demonstrado as vantagens em se utilizar probióticos sobre a integridade do trato gastrointestinal das aves. Neste estudo, as alterações na morfologia da mucosa intestinal não apresentaram efeitos significativos ao uso de probióticos e prebióticos, entretanto o grupo controle negativo, difere significativamente ($P < 0,05$) aos demais tratamentos, demonstrando um maior índice a profundidade da cripta. Diferindo de Dobrogosz *et al.* (1991), que ao adicionarem *Lactobacillus reuteri* na ração de aves, observaram maior comprimento e profundidade da cripta, indicando o benefício da utilização de probióticos sobre a integridade da mucosa.

O frango de corte está sujeito a uma série de fatores que podem alterar as características morfofuncionais da mucosa do trato gastrointestinal. Dentre os vários fatores que parecem influenciar a cinética epitelial das mucosas, Fogaça (2001) citou a composição da microbiota bacteriana, a motilidade intestinal, o suprimento vascular, a nutrição e a função imunológica das células imunocompetentes da mucosa.

A Tabela 9 apresenta os valores médios de profundidade de criptas do duodeno de frangos de corte submetidos a dietas contendo probiótico e

prebiótico. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) na profundidade de cripta das aves entre os tratamentos com *pool* de *Lactobacillus* + prebiótico e com prebiótico, mas estes diferiram significativamente ($P<0,05$) em relação aos grupos controle negativo e controle positivo, que apresentaram maior profundidade de criptas.

Pelicano *et al.* (2003) observaram que diferentes probióticos administrados na ração afetaram ($P<0,01$) a profundidade de criptas nos diferentes segmentos intestinais das aves. O probiótico contendo *Saccharomyces cerevisiae* proporcionou as menores profundidades no duodeno, jejuno e íleo em relação aos probióticos contendo *Bacillus subtilis* e a mistura de *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis*, que não diferiram entre si ($P>0,05$). O prebiótico mananoligossacarídeos, é reconhecido por ligar-se às lectinas nas paredes de certas bactérias indesejáveis, dificultando a adesão bacteriana ao epitélio intestinal (SUN, 2004),

Loddi (2003) utilizando 0,1% de mananoligossacarídeos em dieta para frangos, relatou que nessas aves os vilos eram mais altos e com maior perímetro, comparados com aves que consumiram dietas sem aditivos. Porém, ao avaliar o uso de avilamicina e mananoligossacarídeos, entre outros tratamentos, Schwarz *et al.* (2002) não notaram diferença quanto à altura de vilos e profundidade de cripta. Por outro lado, Lima *et al.* (2000), analisando a morfometria do duodeno de frangos de corte, suplementados com probiótico Calsporin-10, observaram aumento na altura da vilosidade e na profundidade da cripta.

De acordo com Pluske *et al.* (1997), o maior valor de profundidade de cripta indica maior atividade proliferativa celular, para garantir adequada taxa de renovação epitelial, compensando as perdas nas alturas das vilosidades, fato este contraditório ao que se observou neste experimento, uma vez que a média de profundidade das criptas apresentou-se maior para o tratamento controle negativo.

7. Conclusões

Cepas de *Lactobacillus salivarius*, *L. reuteri* e *L. spp* (probiótico) associadas ou não com mananoligossacarídeos (prebiótico), reduziram a quantidade de *Salmonella* Enteritidis (SE) nos cecos das aves.

Não foi observado efeito significativo sobre profundidade de criptas das aves para o tratamento com *pool* de *Lactobacillus* + prebiótico e o tratamento com prebiótico.

Com o uso da metodologia CTAB e as seqüências de oligonucleotídeos desenhadas para detecção de genes codificadores de bacteriocinas das cepas de *Lactobacillus salivarius*, verificou-se que não houve amplificação do segmento genômico para os genes *abp 118 alpha* e *Sal B*.

8. Referências^{*1}

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. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.49, p.661-672, 1997.

ANDREATTI FILHO, R.L.; SAMPAIO, H. M. Probióticos e prebióticos: Realidade na avicultura moderna. **Avicult. Ind.**, v.1078, p.16-32, 1999.

ANDREATTI FILHO, R.L.; SILVA, E.N.; RIBEIRO, A.R.; KONDO, N.; CURI, P.R. Use of anaerobic cecal microflora, lactose and acetic acid for the protection of broiler chicks against experimental infection with *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis, **Bras. J. Microbiol.**, v.31, p.107-112, 2000.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2000. 22p. BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

ANTIBIÓTICOS: a resistência já é realidade. **Feeding Times**, v.3, p.9-10, 1998.

AXELSSON, L.T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; VONWRIGHT, A. (Eds) **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Dekker, 1993. p.1-63.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology In: SALMINEN, S.; van WRIGHT, A. **Lactic acid bacteria microbiology and functional aspect**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1998. p.1-72.

BALAKRISHNAN, N.; SIMMONDS, R.S.; TAGG, J.R. Diverse activity spectra of bacteriocin-like inhibitory substances having activity against mutans streptococcus caries. **Research**, v.35, p.75-80, 2001.

BARROW, P. A. Immunity to *Salmonella* and other bacteria. In: DAVISON, T. F.; MORRIS, T. R.; PAYNE, L. N. **Poultry Immunology**. Berkshire: Carfax Publishing Company, 1995. p.243-263 (Poultry Science Symposium Series, v.24).

BARROW, P. A. The paratyphoid salmonellae. **Rev. Scient. Tech. Off. Int. Epizooties**, v.19, p.351-375, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Animal. Coordenação de Laboratório Animal. **Método de Análise Microbiológica para Alimentos**, Brasília, 1999.226 p.

BRUNO, M.E.C.; MONTVILLE, T.J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.59, p.3003-3010, 1993.

BUCHMAN, G.; BANERJEE, S.; HANSEN, Y. J. Structure, expression and evolution of gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. **J. Biol. Chem.**, v.263, p.16260-16266, 1998.

BUTOLO, J.E. Utilização de ingredientes líquidos na alimentação animal. In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2001, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2001. p.295-334.

CHADFIELD, M. S.; BROWN, D.J.; CHRISTENSEN, J.P.; OLSEN, J.E. Comparison of intestinal invasion and macrophage response of *Salmonella* Gallinarum and other host-adapted *Salmonella enterica* serovars in the avian host. **Vet. Microbiol.**, v.92, p.49-64, 2003.

CHAVES, H.A.; SILVA, C.F.J.; PINHEIRO, R.J.A.; CAMPOS, F.O.; VALADARES FILHO, C.S. Isolamento de *Lactobacillus acidophilus* a partir de fezes de bezerros. **Rev. Bras. Zootec.**, v.28, p.1086-1092, 1999.

CINTAS, L.M.; CASAUS, P.; HAVARSTEIN, L.S.; HERNANDEZ, P.E.; NES, I.F. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent-bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. **Appl. Envir. Microbiol.**, v.63, p.4321-4330, 1998.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobiols for food preservation. **Int. J. Food Microbiol.**, v.71, p.1-20, 2001.

COCCONCELLI, P.S. Molecular aspects of *Lactobacillus* bacteriocins. **Ann. Microbiol. Enzimol.**, v.43, p.37-44, 1993.

CORRIER, D.E.; HARGIS, B.M.; HINTON, A.J.R.; LINDSEY, D.; CALDWELL, D.; MANNING, J.; DELOACH, J.R. Effect of anaerobic cecal microflora and dietary lactose on colonization resistance of layer chicks to invasive *Salmonella enteritidis*. **Avian Dis.**, v.35, p.337-343, 1991.

CORRIER, D.E.; HINTON, A.; HARGIS, B.; DELOACH, J.R. Effect of used litter from floor pens of adult broilers on *Salmonella* colonization of broiler chick. **Avian Dis.**, Kennett Square, v.36, p.897-902, 1992.

CORRIER, D.E.; HOLLISTER, A.G.; NISBET, D.J.; SCANLAN, C.M.; BEIER, R.C.; DELOACH, J.R. Competitive Exclusion of *Salmonella enteritidis* in Leghorn Chicks: Comparison of Treatment by Crop Gavage, Drinking Water, Spray, or Lyophilized Alginate Beads. **Avian Dis.**, Kennett Square, v.38, p.297-303, 1994a.

CORRIER, D.E.; NISBET, D.J.; HOLLISTER, A.G.; BEIER, R.C.; SCANLAN, C.M.; HARGIS, B.M.; DELOACH, J.R. Resistance against *Salmonella enteritidis* cecal colonization in leghorn chicks by vent lip application of cecal bacteria culture. **Poult. Scien.**, Champagne, v.73, p.648-652, 1994b.

COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. **Council regulation on the authorisation of the additive avilamycin in feedingstuffs**, 2003. Disponível em: <<http://register.consilium.eu.int/pdf/en/03/st06/st06120en03.pdf>>. Acesso em: 8 jan. 2007.

CURSINO, L.; ARAUJO, W.L.; CAHRTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A.M.A.; AZEVEDO, J.L. Bacteriocins by citrus endophytic bacteria are induced by competition. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 48, 2002, Águas de Lindóia. Resumos... Ribeirão Preto: SBG, 2002.

DAHL, T.A.; MIDDEN, W.R.; HARTMEAN, P.E. comparison of killing of Gram-negative and Gram-positive bacteria by purified singlet oxygen. **J. Bacteriol.**, v.171, p.2188-2194, 1989.

DAVIDSON, P.M.; HOOVER, D.G. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. (Eds). **Lactic acid bacteria**. Marcel Dekker, 1993, p.127-59.

DELAZARI, I. Abate e processamento de carne de aves para garantia da qualidade. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2001, Campinas. **Anais...** Campinas : FACTA, 2001. p.191-203.

DESMIDT, M.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis phage type four after experimental infection of young chickens. **Vet. Microbiol.**, v.56, p.99-109, 1997.

DIEP, D.B.; NES, I.F. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram-positive bacteria. **Curr. Drug. Targets**, v.3, p.107-122, 2002.

DIRIX, G.; MONSIEURS, P.; DOMBRECHT, B.; DANIELS, R.; MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, J. Peptide signal molecules and bacteriocins in Gram-negative bacteria: a genome wide in silico screening for peptides containing a double-glycine leader sequence and their cognate transporters. **Peptides**, v.25, p.1425-1440, 2004.

DOBROGSZ, W. J.; BLACK, B. L.; CASAS, I. A. Delivery of viable *Lactobacillus reuteri* to the gastrointestinal tract of poultry. **Poult. Scien.**, v. 70, p.158, 1991.

DODD, H. M.; HORN, N.; GASSON, Y.M.J. Analysis of the genetic determinant for production of the peptide antibiotic nisin. **J. Gen. Microbiol.**, v.136, p.555-566, 1990.

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*. **Poult. Scien.**, v.76, p.179-196, 1997.

ENGELKE, G.; GUTOWSKI-ECKEL, Z.; HAMMELMAN, M.; ENTIAN, Y.K.D. Biosynthesis of the lantibiotic nisin: genomic organization and membrane localization of the nisb protein. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.58, p.3730-3743, 1992.

ERASO, A.J.; INÊS, A. Bactariocin of *Enterococcus* from lactoserum able to cause oxidative stress in *Staphylococcus aureus*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.314, p.897-901, 2004.

FOGAÇA, H. S. Desnutrição. In: ELIA, C. C.; SOUZA, H. S. P. **Imunologia da mucosa intestinal da bancada ao leito**. São Paulo: Atheneu, v.8, p.159, 2001.

FRIEDMAN, A; BAR-SHIRA, E.; SKLAN, C. Ontogeny of gut associated immune competence in the chick. **Worl. Poult. Scien. J.**, v.59, n. 2, p.209-219, 2003.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, v.66, p.365-78, 1989.

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, S., 2004, Camboriú. **Anais...** Camboriú, 2004. p.6-28.

GARCERÁ, M.J.G.; ELFERINK, M.G.L.; DRIESSEN, A.J.M.; KONINGS, W.N. In vitro poreforming activity of the lantibiotic nisin role of protonmotive force and lipid composition. **Eur. J. Biochem.**, v.212, p.417-422, 1993.

GARDE, S.; RODRÍGUEZ, E.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. PCR detection of the structural genes of nisin Z and lacticin 481 in *Lactococcus lactis subsp. lactis* INIA 415, a strain isolated from raw milk Manchego cheese. **Biotech. Lett.**, v.23, n.2, p.85-89, 2001.

GAST, R.K. Paratyphoid Infections. In: CALNEK, B.W. (Ed.). **Diseases of poultry**. 10 ed. Ames: Iowa State University Press, 1997. p.97-121.

GEORGIA POULTRY LABORATORY. **Monitoring and detection of Salmonella in the poultry and poultry environments.** Oakwood: Georgia Poultry Laboratory, 1997. 293p.

GIBSON G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr.**, v.125, p.1401-1412, 1995.

GILLILAND, S.E.; SPECK, M.L. Interactions of food starter cultures and food borne pathogens: Lactic streptococci versus staphylococci and salmonellae. **J. Milk Food Sechnol.**, v.35, p 307-310, 1972.

GOODMAN, L.A. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinominal populations. **Annals of Mathematical Statistics**, v.35 (2), p.716-725, 1964.

GOREN, E.; JONGWA, D.; DOORNENBAL, P.; KOOPMAN, J.P.; KENNIS, H.M. Protection of chicks against Salmonella infantis infection induced by strict anaerobically cultured intestinal microflora. **Vet. Q.**, Dordrecht, v.6, p.22-26, 1984.

GREIN, T.O.; FLANAGAN, D.; McCARTHY, T.; PRENDERGAST, T. Redução dos riscos de salmonelose originada por ovos. Nota Editorial. **Euro Surveill.**, v.2, p.86-88, 1997.

GUILLOT, J. F. **Feed Mix Special:** alternatives to antibiotics. s.l.:s.n., 2000.

HAVENAAR, R.; BRINK, B.T.; HUISVELD, J.H.; FULLER, R. Selection of Strains for probiotics use. In: FULLER, R. **Probiotics the scientific basis.** London: Chapman and Hall, 1992. p.209-224.

HERCHARD, Y.; SAHL, H.G. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from gram-positive bacteria. **Biochimie**, v.84, p.545-557, 2002.

HU, H. Biochemical and genetic characterization of polymyxin M produced by *Paenibacillus Kobenses* M. Thesis (PhD) – Cornell University, Geneva, 2003. 108p.

JACK, R.W.; TAGG, J.R.; RAY, B. Bacteriocins of Gram positive bacteria. **Microbiol. Rev.**, v.59, n.2, 1995.

JOOSTEN, H.M.L.J.; NUNES, M.; DEVREESE, B.; BEEUMEN, J.; MARUGG, J.D. Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA 4. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.62, n.11, p.4220-4223, 1996.

JUNQUEIRA, O.M.; SILZ, L.Z.T.; LIM, F.R.; MORETTI, A.D.S.; ARAUJO, L.F. **Substituição da proteína do leite em pó desnatado pelo isolado protéico de soja sobre características morfológicas intestinais de leitões no período de 21 a 35 dias de idade.** Jaboticabal, 2002. Disponível em: <<http://www.sian.info.br/porcinos/publicaciones/viencuent/mack.htm>>. Acesso em: 21 maio 2007.

KAISER, A.L.; MONTVILLE, T.J. Purification of bacteriocin bavarium MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.62, p.4525-4535, 1996.

KLAENHAMMER, T.R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochimie**, v.70, p.337-349, 1988.

KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.** , v.12, p.39-86, 1993.

KRABBE, E.L. Alternativas aos promotores de crescimento convencionais Potencial e Viabilidade. In: PRÉ-SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO ANIMAL: AVES E SUÍNOS, 2001, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, RS, 2001. p.61-69.

KUIPERS, O.P.; BEERTHUYZEN, M.M.; SIEZEN, R.J.; DEVOS, Y.W.M. Characterization of the nisin gene-cluster *nisABTCIPR* of *Lactococcus lactis*—requirement of expression of the *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. **Eur. J. Biochem.**, v.216, p.281-291, 1993.

LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v.47, p.747-748, 1965.

LIMA. A.C.F.; HARNICH, F.R.; PIZAURO, J.M.; MALHEIROS, E.B. Suplementação enzimática e/ou probiótica na ração sobre a atividade de enzima e morfometria intestinal de frangos de corte criados no calor. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, n.2, p.52-53, 2000.

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. **Can. J. Vet. Res.**, v.71, p.103-107, 2007.

LODDI, M. M.; MORALES, V. M. B.; NAKAGHI, L. S. O; TUCCI, F. M; HANNAS, M.I.; ARIKI, J. Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries (Reimagining the feed industry). In: SYMPOSIUM ANNUAL ALLTECH, 2004, Lexington, Kentucky. **Proceedings...** Lexington, 2004. p.45.

MACARI, M.; MAIORKA, A. Função gastrintestinal e seu impacto no rendimento avícola. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2000. p.161-174.

MAIORKA, A.; BOLELI, I. C.; MACARI, M. Desenvolvimento e reparo da mucosa intestinal. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. (Ed.) **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/ UNESP, 2002, p.113-123.

MALLINSON, E.T.; SNOEYENBOS, G.H. Salmonellosis. In: PURCHASE, H.G. et al., (Eds). A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 3. ed. Pennsylvania: American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania, 1989. p.3-11.

MARTIN, S.C. Potential for manipulating the gastrointestinal microflora: A review of recent progress. In: BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY OF ANNUAL SYMPOSIUM, 10, 1994. Proceedings...London: Nottingham University Press, p.155-166, 1994.

MASTROENI, P.; SKEPPER, J. N.; HORMAECHE, C. E. Effect of anti-tumor necrosis factor alpha antibodies on histopathology of primary *Salmonella* infections. **Infect. Immun.**, v.63, p.3674-3682, 1995.

MAYR-HARTING, A; HEDGES, A.J.; BERKELEY, C.W. Methods for studying bacteriocins. In: Norris, J.R. Ribbons, D.W. Ed.: **Methods in microbiology**. New York: Academic Press Inc., 1972.

McGARR, C.; MITCHEL, W.R.; CARLSON, H.C.; FISH, N.A. An epidemiological study of *Salmonella* in broiler chicken production. **Can. J. Public.**, v.71, n.1, p.47-57, 1980.

McILROY, S.G.; McCracken, R.M.; NEILL, S.D. Control, prevention and eradication of *Salmonella enteritidis* infection in broiler and broiler breeder flocks. **Vet. Rec.**, v.22, p.545-548, 1989.

MENTEN, J. F. M. Aditivos alternativos na nutrição de aves: Probióticos e prebióticos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38. 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p.178-194.

METCHNIKOFF, I. **Prolongation of life**. New York: Putnam, 1907.

MICHAEL, S.; WEI, S. MACK Dr.: *Escherichia coli* strain 2348/69 in vitro adhrian is reduced in the presence of a *Lactobacillus* species. **Gastroenterol.**, v.112, p.1042, 1997.

MILLES, R.D. Manipulation of the microflora of the gastrointestinal tract, natural ways to prevent colonization by pathogens. In: ALTECH BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY, 1993, Flórida. Proceedings... Flórida, 1993. p.133-150.

MOLINA, A.L.; TOBO, P.R. Uso das Técnicas de Biologia Molecular para Diagnóstico. **Rev. Ciên. Básic.**, Einstein, v.2, n.2, p.139-142, 2004.

MONTVILLE, T.J.; WINKOWSKI, K. Biologically base preservation systems and probiotic bacteria. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food microbial.**, Woshington: Fundantals and fortiersed ASM PRESS, 1997. p.557-577.

MORAN, E. T. Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and events through prenatal development. **J. Nut.**, v.115, p.665-674, 1985.

MOTA-MEIRA, M.; LAPOINTE, G.; LACROIX, C.; LAVOIE, Y.M.C. MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.44, p.24-29, 2000.

MROZ, Z. Substitutes for conventional growth promoters in poultry nutrition. In: REUNIÃO ANNUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40. 2003, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria: SBZ, p.11-17, 2003.

NES, I.F.; DIEP, D.B.; HAVARSTEIN, L.S.; BRURBERG, M.B.; EIJSINK, V.; HOLO, H. Biosynthesis of bacteriocins of lactic acid bacteria. **Antonie Leeuwenhoek**, v.70, p.113-128, 1996.

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

OGUNBANWO, S.T.; SANNI, A.I.; ONILUDE, A.A. Influence of bacteriocin in the control of *Escherichia coli* infection of broiler chickens in Nigeria. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.20, p.51-56, 2004.

OLIVEIRA, D.E. **Infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV) e vírus do papiloma humano (HPV), expressão da proteína e proliferação celular em carcinomas de nasofaringe e laringe.** 2002, 53p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

PARRA, F.E. Eclusion competitiva in Salmonellosis: Revison In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PATOLOGIA AVIAR, 8., 1994, Athens. **Anais...** Athens, 1994. p.433-469.

PATTERSON, J.A.; BURKHOLDER, K.M. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. **Poult. Scien.**, v.82, n.4, p.627-631, 2003.

PELICANO, E. R. L.; SOUZA, P. A.; SOUZA, H. B. A. Effect of different probiotics on broiler carcass and meat quality. **Rev. Bras. Ciên. Av.**, v.5, n.3, p.207-214, 2003.

POETA, P.; COSTA, D.; RODRIGUES, J.; TORRES, C. Detection of genes encoding virulence factors and bacteriocins in fecal Enterococci of poultry in Portugal. **Avian Dis.**, v.50, p.64-68, 2006.

POPPE, C. Epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis In: SAEED, A. M.; GAST, R. K.; POTTER, M. E.; WALL, P. G. ***Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals**. Ames: Iowa State University Press. p.3-18. 1999.

PLUSKE, J.R.; HAMPSON, D.J.E.; WILLIAMS, I.H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livest. Prod. Scien.**, v.51, p.215-236, 1997.

PRADO, S.C.; SANTOS, M.L.W.; CARVALHO, R.C.; MOREIRA, C.E.; COSTA, O.J. Atividade antimicrobiana de bactérias de embutidos curados frente a *Listeria monocytogenes*. **Arq. BrAs. Med. Vet. Zootec.**, v.52, p.417-423, 2000.

PRICE, R.J.; LEE, J.S. Inhibition of Pseudomonas species by hydrogen peroxide producing lactobacilli. **Milk Food Tech.**, v.33, p.13-18, 1970.

PROSDOCIMI F.; CERQUEIRA, G. C.; BINNECK, E. Bioinformática: Manual do usuário. **Biot. Ciên. Desenvol.**, v.29, p.12-25, 2001.

RILEY, M.A.; WERTZ, I.E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. **An. Ver. Microbiol.**, v.56, p.117-137, 2002.

REVINGTON, B. Feeding poultry in the post-antibiotic era. In: MULTI-STATE POULTRY MEETING, 2007, Indiana. **Anais...**Indiana, 2007. Disponível em <<http://ag.ansc.purdue.edu/poultry/multistate.pdf>>. Acesso em: 8 jan. 2007.

RODRIGUEZ, J.M.; CINTAS, L.M.; CASAUS, P.; HORN, N.; DODD, H.M.; HERNANDEZ, P.E.; GASSON, M.J. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. **J. Appl. Bacteriol.**, v.78, p.109-115, 1995.

ROSE, T. M.; SCHULTZ, E. R.; HENIKOFF, J. G. Consensus-degenerated hybrid oligonucleotides primers for amplification of distantly related sequence. **Nucl. Ac. Res.**, Oxford, v.26, p.1628-1635, 1998.

SALMONELLA VILOSIDADES INTESTINAIS: Patogênese e Virulência. 2006. Disponível em: <<http://www.delphianos.com.br/biologia/microbiologia/arquivo.php>>. Acesso em: 1 jun. 2006.

SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **Int. Dairy J.**, v.8, p.341-347, 1998.

SANTOS, J.R.G.; TURNES, C.G., Probióticos em avicultura. **Ciênc. Rural**, v.35, n.3, p.741-747, 2005.

SCHILLINGER, U.; LUCKER, F.K. Identification of *Lactobacilli* from meat and meat products. **Food Microbiol.**, v.4, p.199-208, 1987.

SCHNEITZ, C. Research note: Automated droplet application of a competitive exclusion preparation. **Poult. Scien.**, Champagne, v.71, p.2125-2128, 1992.

SCHWARZ, K.K.; FRANCO, S.G.; FEDALTO, L.M.; BORGES, S.A.; SILVA, A.V.E.; PEDROSO, A.C. Efeitos de antimicrobianos, probióticos, prebióticos e simbióticos sobre o desempenho e morfologia do jejuno de frangos. **Rev. Bras. Ciên. Avíc.**, v.4, p.35, 2002.

SHACKELFORD, A.D. Modificações dos métodos do processamento para controle da *Salmonella* em aves. **Poult. Scien.**, v.67, p.933-935, 1998.

SILVA, E.N.; ANDREATTI FILHO, R.L. Probióticos e prebióticos na avicultura. In: II SIMPÓSIO DE SANIDADE ÁVICOLA, 2, 2000, Santa Maria. **Anais...**Concórdia. EMBRAPA Suínos e aves, 2000. v.1, p.45-55.

SILVA, E. N. Probióticos e prebióticos na alimentação de aves. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2000, São Paulo. **Trabalhos de Pesquisas...** Campinas: FACTA, 2000. p 241-251.

SMITH, J.W.G. Memorandum of evidence to the agricultural committee inquiry on *Salmonella* in eggs. **PHLS Microbiol. Dig.**, v.6, p.1-9, 1989.

SNOEYENBOS, G.H.; WEINACK, O.M.; SOERJADI-LIEM, A.S.; MILLER, B.M.; WOODWARD, D.E.; WESTON, C.R. Large-scale trials to study competitive exclusion of *Salmonella* in chickens. **Avian Dis.**, v.29, p.1004-1011, 1985.

STAVRIC, S.; GLEESON, T.M.; BLANCHFIELD, B.; PIVNICK, H. Competitive exclusion of *Salmonella* from newly hatched chicks by mixtures of pure bacterial cultures isolated from fecal and cecal contents of adult birds. **J. Food Protect.**, Ames, v. 48, n. 9, p.778-782, 1985.

STOMPFOVÁ, V.; LAUROKONA, A.; OUWEHAND, A.C. Selection of enterococci for potencial canine probiotic additives. **Vet. Microbiol.**, v.100, p.107-114, 2004.

SUN, X. **Broiler performance and intestinal alterations when fed drug-free diets.** Blacksburg, 2004. 59f. Dissertation (Master of Science in Animal and Poultry Sciences) – Faculty of the Virginia Polytechnic Institute, 2004.

SUIDA, D. **Estimulantes do desempenho de galinhas poedeiras e de frangos de corte.** Viçosa, 1994. 59p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa.

SWANN COMMITTEE BVA and RCVS evidence to the Swann Committee. **Vet. Rec.**, v.84, p.91-92, 1969.

TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of gram positive bacteria. **Bacteriol. Rev.**, v.40, p.722-756, 1976.

TANNOCK, G.W.; SAVAGE, D.C. Influences of dietary and environmental stress on microbial populations in the murine gastrointestinal tract. **Infect. Immun.**, v.9, p.591-598, 1974.

TANNOCK, G.W. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. **Int. Dairy J.**, v.8, p.527-533, 1998.

TAXONOMY - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html>> Acesso em: 16 fev. 2007

TOOD, E.C.D. Epidemiology of the foodborne diseases: a Woldacide review. **World Health Stat. Q.**, v.50, p.30-50, 1997.

TOURNUT, J. R. Probiotics. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35, 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu:SBZ, 1998, p.179-199.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS. **Atividades Acadêmicas UEG em 2001**. Patologia / Patógenos e Doenças do trato gastrintestinal / *Salmonella* Enteritidis / Salmonelose. Goiânia, 2001. Disponível em: <<http://www.shopping1.radiologico.nom.br/trabalho/estudo/patology/patogeno>>. Acesso em : 03 ago. 2007.

UNIVERSITY OF CAMBRIDGE. Department of Clinical Veterinary Medicine. **Mechanisms of immunity to food poisoning and vaccine serotypes of *Salmonella* in chickens.** Cambridge: Cambridge United Kingdom. 2001. Disponível em: <<http://www.vet.cam.ac.uk/research/sig.html>>. Acesso em:01 jul. 2006.

VARGAS JR., J.G.; TOLEDO, R.S.; ALBINO, L.F.T. Uso de probióticos e prebióticos em rações de frangos de corte. **Rer. Bras. Ciên. Avíc.**, s.2, p.31, 2000.

VASSALO, M.; FIALHO, E.T.; OLIVEIRA, A.I.G.; TEIXEIRA, A.S.; BERTECHINE, A.G. Probioticos para leitões dos 10 aos 30Kg de peso vivo. **Rev. Soc. Bras. Zootec.**, v.26, p.131-138, 1997.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis.** New Jersey: Prentice Hall, p. 663, 1999.

ZIPRIN, R.L.; ELISSAL, D.E.; HINTON, A.; BIER, R.C.; SPATES, G.E.; CORRIER, D.E.; BENOIT, T.G. Colonization control of lactose fermenting *Salmonella* Typhimurium in young broiler chickens by use of dietary lactose. **Am. J. Vet. Res.**, v.52, p.833-837, 1991.

ZUANON, J.A.S. **Efeito de promotores de crescimento de frango de corte.** Viçosa: UFV, 1995. 70p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa.

WEINACK, O.M.; SNOEYENBOS, E.H.; DELOACH, J.R.; SMYSER, C.F.; SOERJADI, A.S. Reciprocal competitive exclusion of *Salmonella* and *Escherichia coli* by native intestinal microflora of the chicken and turkey. **Avian Dis.**, v.26, p.585-595, 1982.