

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

**COMPARAÇÃO DE ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS,  
PATOLÓGICOS E ZOOTÉCNICOS ENTRE FRANGOS E  
PERUS DE CORTE DESAFIADOS COM *Salmonella*  
Heidelberg**

**IGOR HENRIQUE BASTOS VELLANO**

**Botucatu - SP, abril de 2019**

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

**COMPARAÇÃO DE ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS,  
PATOLÓGICOS E ZOOTÉCNICOS ENTRE FRANGOS E PERUS  
DE CORTE DESAFIADOS COM *Salmonella* Heidelberg**

**IGOR HENRIQUE BASTOS VELLANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Medicina Veterinária para a  
obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Raphael Lucio  
Andreatti Filho  
Co-Orientadora: Dra. Elisane Lenita  
Milbradt

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Vellano, Igor Henrique Bastos.

Comparação de aspectos microbiológicos, patológicos e zootécnicos entre frangos e perus de corte desafiados com *Salmonella Heidelberg* / Igor Henrique Bastos Vellano. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Raphael Lucio Andreatti Filho

Coorientador: Elisane Lenita Milbradt

Capes: 50503014

1. Salmonella. 2. Mucosa intestinal. 3. Frango de corte - Patogênese. 4. Peru (Ave).

Palavras-chave: *Salmonella Heidelberg*; frangos; mucosa intestinal; patogenia; perus.

## COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho

Membro e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – Unesp – Botucatu (SP)

Prof. Dr. Adriano Sakai Okamoto

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – Unesp – Botucatu (SP)

Profa. Dra. Terezinha Knöbl

Membro

Departamento de Patologia

FMVZ - USP - São Paulo (SP)

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, que me deram suporte durante toda a vida e que são a razão para eu ter chegado até aqui.

## AGRADECIMENTOS

Ao apoio financeiro concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), número do processo 88882.180531/2018-01.

Ao Professor e Orientador Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho, pela orientação, amizade e pela oportunidade de aprendizado ao longo dos últimos quatro anos, contribuindo para o meu desenvolvimento pessoal e profissional

À Dra. Elisane Lenita Milbradt, pela co-orientação, paciência e auxílio fundamental em todas as fases do meu projeto.

Aos professores doutores Adriano Sakai Okamoto e Alexandre Hataka pela colaboração no trabalho, por aceitarem compor a minha banca e por toda a ajuda dispndida ao longo da minha trajetória desde a residência.

Aos demais professores do serviço de Patologia da faculdade de Medicina Veterinária FMVZ-UNESP-Botucatu: Prof. Dr. Júlio Lopes Sequeira, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Noeme Souza Rocha, por toda a colaboração e disposição em ajudar sempre no que fosse possível.

Ao Prof. Dr. Alexandre Vaz Pires e ao Dr. Daniel Polizel do departamento de zootecnia da Esalq – USP, pela disponibilidade em contribuir com as análises de ácidos graxos voláteis.

Ao professor Carlos Roberto Padovani do departamento de bioestatística do Instituto de Biociências - Unesp, por contribuir com as análises estatísticas do trabalho.

À Bianca Nagayoshi, Letícia Gross, Gabriela Bastos e todos os envolvidos direta ou indiretamente no desenvolvimento do projeto que, por ventura eu não tenha listado aqui, o meu muito obrigado.

Aos amigos que fiz durante a residência e mestrado, por todas as risadas, preocupações, companheirismo e aprendizado, vou levar para sempre comigo.

Aos companheiros de república, por dividirem não somente um teto, como também momentos que ficarão na memória.

À minha namorada Mariana Carvalho, por todo companheirismo, amor e carinho ao longo dessa caminhada.

À Maria Valéria Dalanezi pela ajuda no processamento do material histológico .

A todos os funcionários que tive o prazer de conhecer e que sempre me ajudaram muito, em especial ao Maury Raul, Claudinei Rodrigues e Carlos Godoy.

Às empresas Brasil Foods e Aviagen pela doação das aves experimentais.

À minha família, por serem o meu alicerce.

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Composição percentual e estimada das dietas experimentais de frangos de corte.....	36
<b>Tabela 2.</b> Composição percentual e estimada das dietas experimentais de perus de corte.....	38
<b>Tabela 3.</b> Média em log das unidades formadoras de colônia por grama no inglúvio e ceco de frangos e perus de corte, inoculados via oral com $6 \times 10^8$ UFC/ml de <i>Salmonella</i> Heidelberg no terceiro dia de vida. ....	39
<b>Tabela 4.</b> Mediana e valores mínimo e máximo de unidade formadoras de colônias por grama (UFC/g) no fígado e baço de frangos e perus de corte desafiados por via oral com $6 \times 10^8$ UFC/ml de <i>Salmonella</i> Heidelberg no terceiro dia de vida .....	40
<b>Tabela 5.</b> Porcentagem de excreção de <i>Salmonella</i> Heidelberg de frangos e perus de corte desafiados com $6 \times 10^8$ UFC/mL da bactéria no terceiro dia de vida ...	41
<b>Tabela 6.</b> Concentração de ácidos graxos voláteis de cadeia curta no conteúdo cecal de frangos e perus de corte desafiados no terceiro dia de vida com $6 \times 10^8$ UFC/ml de <i>Salmonella</i> Heidelberg .....	42

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	3
1.INTRODUÇÃO.....	4
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Indústria avícola e salmonelose.....	5
2.1.2. Patogenia da <i>Salmonella</i> Heidelberg.....	7
3. OBJETIVO GERAL.....	10
3.1. Objetivos específicos.....	10
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11
CAPÍTULO 2 - COMPARAÇÃO DE ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS, PATOLÓGICOS E ZOOTÉCNICOS ENTRE FRANGOS E PERUS DE CORTE DESAFIADOS COM <i>Salmonella</i> Heidelberg.....	15
SUMÁRIO.....	18
DESCRIÇÃO DO PROBLEMA.....	19
MATERIAL E MÉTODOS.....	20
Cepa de <i>Salmonella</i> Heidelberg e desafio experimental.....	21
Aves e instalações.....	21
Manejo sanitário e alimentar.....	22
<i>Delineamento experimental</i> .....	23
Experimentos A (Frango).....	23
Experimento B (Perus).....	23
Quantificação de <i>Salmonella</i> Heidelberg no ceco, ingluvío, fígado e baço.....	23
Análise de suabe cloacal para determinação da incidência de SH.....	23
Exame histológico e morfologia intestinal.....	24
Desempenho.....	24
Quantificação de Ácidos Graxos Voláteis (AGVs).....	25
Análise Estatística.....	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
<i>Resultados</i> .....	26
Quantificação de <i>Salmonella</i> Heidelberg no ceco, ingluvío, fígado e baço.....	26
Excreção de <i>Salmonella</i> Heidelberg.....	27
Exame histológico e morfologia intestinal.....	27
Desempenho.....	27
Quantificação de Ácidos Graxos Voláteis (AGVs).....	28
<i>Discussão</i> .....	28
CONCLUSÕES E APLICAÇÕES.....	32
REFERÊNCIAS E NOTAS.....	32
ANEXO.....	44

# **CAPÍTULO 1**

## **CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

## RESUMO

O agronegócio representa uma fatia expressiva do PIB (produto interno bruto) nacional e no setor produtivo, frangos e perus de corte são responsáveis por boa parte da produção e exportação de produtos cárneos. A *Salmonella* spp. continua sendo uma toxinfecção alimentar de importância em saúde pública, sendo que nos últimos anos o sorovar Heidelberg (SH) vem ganhando destaque por sua característica mais invasiva, com plasmídeos responsáveis pela transmissão de genes de resistência. Ele também pode provocar danos à mucosa intestinal, semelhantes aos causados pelo sorovar Enteritidis (SE) e sua detecção pode ser realizada por cultivos microbiológicos e através de suabes, mesmo que estes apresentem uma baixa confiabilidade devido à excreção intermitente da bactéria. Devido a carência de informações a respeito da patogenia da SH em ambas as espécies, o objetivo desse trabalho foi avaliar a sensibilidade de frangos e perus de corte às ações da SH.

**Palavras-Chave:** *Salmonella* Heidelberg, mucosa intestinal, patogenia, perus, frangos

**ABSTRACT**

Agribusiness represents a significant share of GDP (gross domestic product) national and the productive sector, broilers and turkeys are responsible for much of the production and export of meat products. *Salmonella* spp. continues to be a food poisoning of public health importance, and in recent years serovar Heidelberg (SH) has been highlighted by its more invasive characteristics, with plasmids responsible for the transmission of resistance genes. It can also cause damage to the intestinal mucosa, similar to those caused by serovar Enteritidis (SE), and their detection can be performed through swabs, even if they present a low reliability due to the intermittent excretion of the bacteria. Due to the lack of information about the pathogenicity in both species, the objective of this work was to evaluate the sensitivity of broilers and turkeys poults to SH actions.

**Key words:** *Salmonella* Heidelberg, intestinal mucosa, pathogeny, turkeys, chickens

## 1. INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro tem expressiva participação na economia do país, do qual a avicultura tem uma representatividade importante nesse setor. Apesar dos entraves econômicos do último ano, o país conseguiu manter a segunda posição como maior produtor mundial de carne de frango com 13.056 toneladas, além de destinar 4.320 toneladas à exportação, ficando à frente dos EUA. A carne de peru possui uma produção mais modesta, porém em franca expansão, com uma fatia representativa de 72% destinada ao mercado interno (ABPA, 2018).

O consumo desses produtos de origem avícola e derivados elevam o risco de exposição à *Salmonella* spp., que está associada à toxinfecções alimentares em seres humanos (FOLEY et al., 2011). Dos mais de 2650 sorovares conhecidos de *Salmonella* spp., o sorovar Heidelberg (SH) vem ocupando o nicho ecológico deixado pela *Salmonella* Enteritidis (SE), a qual obteve progressiva redução do número de casos, possivelmente devido ao alto grau de imunidade dos plantéis (FOLEY, S.L.; LYNNE, A.M.; NAYAK, R., 2008).

Comparado a outros sorovares, a SH possui uma característica mais invasiva, com plasmídeos responsáveis pela transmissão de genes de resistência, tornando-o um objeto de estudo importante na saúde pública (HAN et al., 2011). Além disso, pode provocar danos na mucosa intestinal semelhantes aos provocados por SE, tendo importância patogênica para pintainhos e como potencial contaminante de carcaças, uma vez que a excreção fecal persiste (BORSOI et al., 2011).

A excreção fecal de *Salmonella* spp. pode ser detectada por meio de suabes cloacais ou amostra de fezes, como método diagnóstico, porém a intermitência de eliminação fecal da bactéria por aves infectadas limita a confiabilidade dos resultados (VAN IMMERSEEL et al., 2004). As informações acerca da patogenia de SH são escassas, sendo que o objetivo desse trabalho foi avaliar a sensibilidade de perus e frangos à SH, a fim de apontar diferenças na resposta à infecção entre essas aves, dada que a hipótese é de que esse sorovar tenha uma ação mais intensa em perus. Dessa forma, o presente projeto irá gerar informações práticas, as quais poderão ser utilizadas pela indústria avícola.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Indústria avícola e salmonelose

O complexo cenário econômico que o país vem enfrentando, nos últimos anos, tem causado impacto negativo na avicultura nacional. Em 2017, deflagrou-se a “Operação Carne Fraca”, em que a Polícia Federal investigou fraudes laboratoriais no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e irregularidades cometidas por frigoríficos de grandes companhias (SALOMÃO, 2018). Diversas consequências negativas surgiram dessa operação, como o abalo na imagem e reputação do agronegócio nacional, restrições às exportações e demissões de trabalhadores no setor, porém o saldo positivo de combate a corrupção deve ser mencionado (MENTEN, 2017). Apesar disso, a produção de carne de frango manteve uma média de 13,05 milhões de toneladas, enquanto a quantidade de carne de peru produzida foi de 390,48 mil toneladas. No ramo das exportações de frango, o Brasil ocupa o primeiro lugar com 4,3 milhões de toneladas, seguido pelos EUA e União Europeia. A produção de carne de peru tem por maior destino o mercado interno, sendo exportados 28% do total produzido (ABPA, 2018), com a terceira posição alcançada no ramo das exportações de acordo com o último levantamento (ABPA, 2015).

Sabe-se que o consumo de carne de aves está em franca expansão por se tratar de uma fonte proteica de qualidade e de menor custo. Nesse sentido, o aumento no consumo desse produto e seus derivados aumenta o risco de exposição à *Salmonella* spp. (FOLEY et al., 2011). Dentre os mais de 2650 sorovares de *Salmonella* spp., apenas uma pequena proporção, aproximadamente 10%, está associada com produtos de origem avícola (carne e ovos) (EFSA, 2014) e essas são as principais causadoras de infecções alimentares em humanos.

Nos EUA, dados de 2016 reportaram a ocorrência de três mortes dentre 895 casos confirmados de salmonelose, 209 deles necessitaram de atendimento hospitalar (FOOD SAFETY NEWS, 2016). Um surto de salmonelose, que se originou a partir de carne de peru crua, acometeu 279 pessoas de 41 estados diferentes, com 107 indivíduos hospitalizados, e uma vítima fatal (CDC, 2018).

Nas últimas décadas, têm ocorrido significativas mudanças na predominância dos sorovares de *Salmonella enterica* associados às aves e infecções humanas. No início

do século XX, os sorovares Pullorum e Gallinarum estavam disseminados nos rebanhos avícolas dos EUA (SHIVAPRASAD, 2000), chegando ao plantel brasileiro, provavelmente, por meio de importação de material genético contaminado. Esses sorovares são responsáveis por infecções denominadas de pulorose (*S. Pullorum*) e tifo aviário (*S. Gallinarum*), que causam alta mortalidade e dessa forma, foram responsáveis por grandes prejuízos ao setor avícola, sendo por esse motivo alvos de programas de erradicação instituídos pelo governo e empresas privadas (BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, EN; DI FÁBIO, J., 2009).

Uma das consequências do rígido controle da *S. Gallinarum* foi o maior isolamento da *Salmonella* Enteritidis (SE). Vários fatores podem ter desencadeado a maior detecção da SE, dentre eles, a redução da imunidade das aves após as mudanças promovidas pelo monitoramento da *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* e a ocupação desse nicho ecológico pela SE (BÄUMLER, A.J.; HARGIS, B.M.; TSOLIS, R.M., 2000). Acredita-se também que a capacidade de transmissão vertical e horizontal da SE tem proporcionado a disseminação e persistência na indústria avícola (CARDOSO e TESSARI, 2008). Apesar disso, a prevalência da SE tem diminuído, gradativamente, principalmente após a década de 90, no qual a *Salmonella* enterica subesp. enterica sorovar Heidelberg (SH) passou a ser o sorovar mais isolado entre os anos de 1997 até 2006 nos EUA, e em 2007 a *Salmonella* enterica subesp. enterica sorovar Kentucky (SK) ocupou essa posição (FOLEY, S.L.; LYNNE, A.M.; NAYAK, R., 2008). A SH além de estar entre os sorovares mais comumente isolados de aves figurou entre os sete principais sorovares associados com a salmonelose humana nos Estados Unidos no ano de 2014 (CDC, 2016).

No Brasil, o sorovar Heidelberg é identificado em aves e produtos derivados desde o ano de 1962 (HOFER, E.; DA SILVA FILHO, S.J.; DOS REIS, E.M.F., 1997). Na região sul do país, em estudo realizado num abatedouro sob inspeção federal, a SH foi isolada em frangos após a depenagem e na água do *chiller*, indicando possível contaminação ambiental (COLLA et al., 2012). Este mesmo sorovar foi o terceiro mais isolado (7,31%) de amostras provenientes dos estados do Paraná, Mato Grosso do Sul e Santa Catarina de 2009 a 2010, onde também apresentou resistência a diferentes antimicrobianos (VOSS-RECH et al., 2015).

### 2.1.2. Patogenia da *Salmonella* Heidelberg

Comparado com outros sorovares de *Salmonella* causadores de gastroenterite, até mesmo a SE, a SH tende a ser mais patogênica para seres humanos, pois pode causar infecções invasivas como sepse e miocardite (WILMSHURST e SUTCLIFFE, 1995). A ingestão de carne e derivados de frango, perus e ovos tem sido a principal via de transmissão de SH em surtos envolvendo a bactéria (CHITTICK et al., 2006; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2010).

Bactérias do gênero *Salmonella* spp. se multiplicam no trato intestinal das aves invadindo a mucosa entérica, tonsilas cecais e placas de Peyer, sendo eliminadas nas fezes, podendo acarretar contaminação ambiental. Acredita-se que aves mais jovens eliminem a bactéria por mais tempo, quando comparadas a aves mais velhas, e esse fato se deve, principalmente, a maturidade do sistema imune – GALT (*gut-associated lymphoid tissue*). A persistência da bactéria no trato intestinal da ave pode influenciar a homeostase da microbiota intestinal e levar a um desequilíbrio da mesma (SADEYEN et al., 2006).

Alguns sorovares, como Heidelberg, podem se multiplicar em macrófagos, atingindo o fígado e baço, via corrente sanguínea ou sistema linfático, e outros órgãos, como ovário, oviduto, moela e pulmão (CHAPPELL et al., 2009; LUTFUL KABIR, 2010). Uma vez no trato reprodutivo das fêmeas, essa bactéria pode penetrar nos ovos por meio de mecanismos semelhantes aos da SE (GAST, R.K.; GUARD-BOULDIN, J.; HOLT, P.S., 2004). Os danos causados pela SH na mucosa intestinal são semelhantes aos provocados por SE, tendo importância patogênica para pintos recém-nascidos e como potencial contaminante de carcaças, uma vez que a excreção fecal persistiu até os 20 dias após infecção experimental (BORSOI et al., 2011).

Mesmo na infecção subclínica, as aves respondem à infecção oral com resposta inflamatória associada com heterófilos e infiltração de macrófagos e monócitos na mucosa cecal (MATULOVA et al., 2013). Uma vez dentro do hospedeiro, o microrganismo tem capacidade de aderir e invadir as células, o que é facilitado por alguns fatores de virulência, tais como toxinas, fímbrias e flagelos (FOLEY et al., 2013).

Participam também da patogenia três categorias gerais de toxinas. A endotoxina contribui para a resistência da parede bacteriana ao ataque e digestão dos fagócitos do

hospedeiro (BACK e ISHIZUKA, 2010), enquanto que as exotoxinas, que compreendem citotoxinas e enterotoxinas, possuem a habilidade de destruir células mamíferas (FOLEY et al., 2013). Foi relatado que endotoxinas aumentam a produção de interleucina-2 (IL-2), que pode atuar indiretamente na integridade intestinal por meio da ativação de macrófagos e produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (ALHENAKY et al., 2017).

A composição da microbiota intestinal, em aves, varia consideravelmente ao longo do TGI. O ceco é conhecido como o segmento de maior colonização de microrganismos, estando presente um grande número de bactérias Gram positivas e negativas, porém o íleo tem interesse particular por sua proximidade ao ceco, albergando grande população bacteriana e também como porção do intestino frequentemente colonizada por *Salmonella* (THOMPSON e APPLGATE, 2006).

Como muitos sorovares de *Salmonella* têm algum nível de invasibilidade, uma variedade de tecidos internos (incluindo fígado, baço, ovário, oviduto, testículos, saco da gema, coração, sangue do coração, rim, vesícula biliar, pâncreas, líquido sinovial e olhos) são potencialmente úteis para a detecção de aves infectadas. Múltiplos órgãos (processados individualmente ou em *pool*) são normalmente colhidos a partir de cada ave para maximizar a probabilidade de detecção (GAST e BEARD, 1990). Suabes cloacais ou amostra de fezes são materiais utilizados para a pesquisa de *Salmonella*, porém a intermitência de excreção fecal da bactéria por aves infectadas limita a confiabilidade das amostras selecionadas (VAN IMMENSEEL et al., 2004). Borsoi et al. (2011) analisaram a excreção fecal de SE e SH em pintos de corte, na qual constataram diferenças na eliminação do agente, provavelmente devido a imunidade individual das aves e a variabilidade entre os diferentes sorovares.

O trato gastrointestinal no pinto recém eclodido é funcionalmente imaturo, apesar de passar por alterações morfológicas, celulares e moleculares significativas no final da incubação (UNI, 2006). Na eclosão, as criptas possuem poucas células e são, relativamente, indistinguíveis, enquanto que 48h após a eclosão, a aparência típica de invaginação ou de indentação da cripta dentro da submucosa é vista completa em todos os segmentos intestinais (GEYRA, A.; UNI, Z.; SKLAN, D., 2001).

O epitélio do intestino totalmente desenvolvido é revestido com uma camada de muco que é composta de glicoproteínas de mucina, água, macromoléculas e microrganismos residentes (UNI, 2006). A espessura da camada de muco varia em

diferentes secções do intestino e é uma barreira protetora, pois os agentes patogênicos devem primeiro passar através da camada de muco para atingir as células epiteliais subjacentes (SMIRNOV et al., 2005). O componente de glicoproteína da camada de muco, a mucina, é secretado por células caliciformes nas vilosidades do epitélio intestinal e atua como protetor na medida em que fornece sítios de ligação para a microbiota, reduzindo assim o potencial de colonização de bactérias nocivas (FORDER et al., 2007).

Vilosidades mais longas geralmente são provenientes de uma mitose ativa da cripta (SAMANYA e YAMAUCHI, 2002), sendo a cripta uma área onde as células-tronco se dividem para permitir a renovação das vilosidades, e uma alta cripta indica rápida renovação com alta demanda por novos tecidos (XIA, M.S.; HU, C.H.; XU, Z.R., 2004). Alterações na morfologia intestinal, tais como vilosidades mais curtas e criptas mais profundas têm sido associadas à presença de toxinas (XU et al., 2003). Em um trabalho com pintos de corte, foram analisadas as diferenças histológicas entre duas cepas de *S. Heidelberg* e uma de *S. Enteritidis*, onde se constatou que os grupos infectados apresentaram a relação altura de vilosidade:profundidade de cripta mais baixa, comparadas ao grupo controle (BORSOI et al., 2011).

Em seres humanos, os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) têm um papel importante no regulamento intestinal, agindo como uma fonte de energia onde uma porcentagem dos ácidos produzidos pela fermentação dos carboidratos é utilizada pelo hospedeiro, processo semelhante ao que acontece em suínos e ruminantes (BERGMAN, 1990). Sabe-se, atualmente, que os AGCC, principalmente o butirato, agem diretamente no intestino promovendo um efeito anti-inflamatório (LUCAS LÓPEZ et al., 2017), e, além disso, promovem homeostase e garantem a integridade intestinal por meio de processos como a produção de muco, secreção de imunoglobulina A e reparo tecidual. Tanto o butirato quanto o propionato facilitam o desenvolvimento de células T reguladoras fora do timo, com consequente efeito anti-inflamatório, pois inibem as histonas desacetilases (HDAC) (TILG e MOSCHEN, 2015).

O acetato é o AGCC mais comumente encontrado no cólon humano, e está positivamente associado aos níveis de glutamina na microbiota, os quais em conjunto, foram correlacionados aos níveis mais elevados de espécies bacterianas, dentre elas, algumas pertencentes à família Clostridiaceae (ORG et al., 2017).

A microbiota cecal das aves hospeda principalmente microrganismos dos filos Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria, sendo que a primeira é a mais abundante (GONG et al., 2002). O produto de fermentação dessas bactérias estão envolvidos na produção de AGCC, que demonstraram ser eficazes contra a *Salmonella* pela regulação da expressão gênica responsável pela penetração nas células epiteliais do hospedeiro (GANTOIS et al., 2006).

### **3. OBJETIVO GERAL**

O presente estudo visou avaliar e comparar, em frangos e perus de corte, a sensibilidade frente ao desafio com SH, englobando aspectos microbiológicos, patológicos e zootécnicos induzidos pela infecção. Dessa forma será possível evidenciar a ação da SH sobre diferentes parâmetros, gerando informações inéditas para o meio científico, as quais servirão de base para estratégias de controle e prevenção da bactéria na criação industrial dessas aves.

#### **3.1. Objetivos específicos**

Estudar os efeitos da infecção por SH em diferentes momentos, nas duas espécies, por meio da análise microbiológica de órgãos como ingluvívio, fígado, baço e ceco; avaliação da morfometria cecal, desempenho zootécnico e quantificação de ácidos graxos voláteis no conteúdo cecal. Traçar um paralelo comparativo entre as variáveis analisadas nas diferentes espécies.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA. Relatório Anual 2015. **Associação Brasileira de Proteína animal**, p. 0–248, 2015.
- ABPA. Relatório Anual 2018. **Associação Brasileira de Proteína animal**, p. 0–178, 2018.
- ALHENAKY, A. et al. The effect of heat stress on intestinal integrity and Salmonella invasion in broiler birds. **Journal of Thermal Biology**, v. 70, n. Pt B, p. 9–14, dez. 2017.
- BÄUMLER, A.J.; HARGIS, B.M.; TSOLIS, R. M. Tracing the Origins of Salmonella Outbreaks. **Science**, v. 287, n. 5450, p. 50–52, jan. 2000.
- BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, EN; DI FÁBIO, J. Salmoneloses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A. Doenças das aves. 2. ed. Campinas: FACTA, p. 435-454, 2009.
- BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, v. 70, n. 2, p. 567–590, 1990.
- BORSOI, A. et al. Behavior of salmonella heidelberg and salmonella enteritidis strains following broiler chick inoculation: Evaluation of cecal morphometry, liver and cecum bacterial counts and fecal excretion patterns. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 266–273, 2011.
- CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. Divulgação Técnica Salmonela Na Segurança Dos Alimentos. v. 70, n. 1, p. 11–13, 2008.
- CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Outbreak of Multidrug-Resistant Salmonella Infections Linked to Raw Turkey Products, 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/reading-07-18/index.html>.
- CHAPPELL, L. et al. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1–3, p. 53–59, 2009.
- CHITTICK, P. et al. A summary of national reports of foodborne outbreaks of Salmonella Heidelberg infections in the United States: clues for disease prevention. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 5, p. 1150–1153, 2006.
- COLLA, F. L. et al. Isolamento de Salmonella Heidelberg em diferentes pontos da tecnologia de abate de frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 4, p. 603–606, 2012.
- EFSA. The European Union Summary Report - Trends and Sources of Zoonoses,

- Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. **EFSA Journal**, v. 12, n. 2, 2014.
- FOLEY, S. L. et al. Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4273–9, 1 jul. 2011.
- FOLEY, S. L. et al. *Salmonella* Pathogenicity and Host Adaptation in Chicken-Associated Serovars. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 4, p. 582–607, 2013.
- FOLEY, S. L.; LYNNE, A. M.; NAYAK, R. *Salmonella* challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. **Journal of animal science**, v. 86, n. 14 Suppl, 2008.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) - Executive Report. 2010.
- FOOD SAFETY NEWS. The Top 10 most important foodborne outbreaks of 2016, 2016. Disponível em: <http://www.foodsafetynews.com/2016/12/the-top-10-most-important-foodborne-outbreaks-of-2016/#.WI3cTvJLNvd>
- FORDER, R. E. A. et al. Bacterial modulation of small intestinal goblet cells and mucin composition during early posthatch development of poultry. **Poultry Science**, v. 86, n. 11, p. 2396–2403, 2007.
- GANTOIS, I. et al. Butyrate Specifically Down-Regulates *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Gene Expression. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 1, p. 946–949, 2006.
- GAST, R. K.; BEARD, C. W. Isolation of *Salmonella enteritidis* from Internal Organs of Experimentally Infected Hens Published by: American Association of Avian Pathologists Stable URL : <https://www.jstor.org/stable/1591394> REFERENCES Linked references are available on JSTOR for th. v. 34, n. 4, p. 991–993, 1990.
- GAST, R. K.; GUARD-BOULDIN, J.; HOLT, P. S. Colonization of Reproductive Organs and Internal Contamination of Eggs After Experimental Infection of Laying Hens with *Salmonella heidelberg* and *Salmonella enteritidis*. **Avian Diseases**, v. 48, n. 4, p. 863–869, 2004.
- GEYRA, A.; UNI, Z.; SKLAN, D. The effect of fasting at different ages on growth and tissue dynamics in the small intestine of the young chick. **British Journal of Nutrition**, v. 86, n. 01, p. 53, 2001.
- GONG, J. et al. Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler

chickens and comparison with bacteria in the cecum. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 41, n. 3, p. 171–179, 2002.

HAN, J. et al. Comparison of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolates from human patients with those from animal and food sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 1130–1133, 2011.

HOFER, E.; DA SILVA FILHO, S. J.; DOS REIS, E. M. F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 55–62, 1997.

LUCAS LÓPEZ, R. et al. The human gastrointestinal tract and oral microbiota in inflammatory bowel disease: a state of the science review. **Apmis**, v. 125, n. 1, p. 3–10, 2017.

LUTFUL KABIR, S. M. Avian colibacillosis and salmonellosis: A closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 1, p. 89–114, 2010.

MALONE, G. W. et al. Influence of Litter Type and Size on Broiler Performance . 1 . Factors Affecting. **Poultry Science**, v. 62, p. 1741–1746, 1983.

MATULOVA, M. et al. Chicken innate immune response to oral infection with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Veterinary Research**, v. 44, n. 1, p. 1, 2013.

MENTEN, J.O. Operação Carne Fraca: consequências. Campo Grande News, 27 de março de 2017. Disponível em: <https://www.campograndenews.com.br/artigos/operacao-carne-fraca-consequencias>.

ORG, E. et al. Relationships between gut microbiota, plasma metabolites, and metabolic syndrome traits in the METSIM cohort. **Genome Biology**, v. 18, n. 1, p. 1–14, 2017.

SALOMÃO, K. Entenda o que é a Operação Carne Fraca e os impactos para a BRF. Exame, 6 de março de 2018. Disponível em: <https://exame.abril.com.br/negocios/entenda-o-que-e-a-operacao-carne-fraca-e-os-impactos-para-a-brf/>.

SADEYEN, J. R. et al. *Salmonella* carrier-state in hens: study of host resistance by a gene expression approach. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 5, p. 1308–1314, 2006.

SAMANYA, M.; YAMAUCHI, K. Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. natto. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 133, n. 1, p. 95–104, 2002.

- SHIVAPRASAD, H. L. Fowl typhoid and pullorum disease. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 19, n. 2, p. 405–24, 1 ago. 2000.
- SMIRNOV, A. et al. Mucin dynamics and microbial populations in chicken small intestine are changed by dietary probiotic and antibiotic growth promoter supplementation. **J. Nutr.**, v. 135, n. August 2004, p. 187–192, 2005.
- THOMPSON, K. L.; APPLGATE, T. J. Feed withdrawal alters small-intestinal morphology and mucus of broilers. **Poultry Science**, v. 85, n. 9, p. 1535–1540, 2006.
- TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Food, immunity, and the microbiome. **Gastroenterology**, v. 148, n. 6, p. 1107–1119, 2015.
- VAN IMMERSEEL, F. et al. Intermittent long-term shedding and induction of carrier birds after infection of chickens early posthatch with a low or high dose of *Salmonella enteritidis*. **Poultry Science**, v. 83, n. 11, p. 1911–1916, 2004.
- VOSS-RECH, D. et al. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v. 94, n. 3, p. 433–441, 2015.
- WILMSHURST, P.; SUTCLIFFE, H. Splenic abscess due to salmonella heidelberg. **Clinical Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p. 1065–1066, 1995.
- XIA, M. S.; HU, C. H.; XU, Z. R. Effects of copper-bearing montmorillonite on growth performance, digestive enzyme activities, and intestinal microflora and morphology of male broilers. **Poultry Science**, v. 83, n. 11, p. 1868–1875, 2004.
- XU, Z. et al. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of growing pigs. **Poultry science**, n. Table 1, p. 1030–1036, 2003.

## **CAPÍTULO 2**

COMPARAÇÃO DE ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS,  
PATOLÓGICOS E ZOOTÉCNICOS ENTRE FRANGOS E PERUS DE  
CORTE DESAFIADOS COM *Salmonella* Heidelberg

**Comparação de aspectos microbiológicos, patológicos e zootécnicos entre frangos e perus de corte desafiados com *Salmonella* Heidelberg**

Este artigo será submetido à revista *The Journal of Applied Poultry Research* (JAPR), estando a normativa devidamente anexada ao final desse capítulo

## **Comparação de aspectos microbiológicos, patológicos e zootécnicos entre frangos e perus de corte desafiados com *Salmonella* Heidelberg**

Igor Henrique Bastos Vellano<sup>††</sup>, Elisane Lenita Milbradt<sup>†</sup>, Carlos Roberto Padovani<sup>‡</sup>,  
Ibiara Correia de Lima Almeida Paz<sup>†</sup>, Daniel Montanher Polizel<sup>§</sup>, Bianca Nagayoshi<sup>\*\*</sup>,  
Letícia Gross<sup>\*\*</sup>, Gabriela Kharsa Bastos<sup>\*\*\*</sup>, Adriano Sakai Okamoto<sup>\*</sup>,  
Raphael Lucio Andreatti Filho<sup>\*</sup>

<sup>††</sup> Mestrando em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

<sup>†</sup> Professora do Departamento de Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

<sup>‡</sup> Professor do Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

<sup>§</sup> Professor do Departamento de Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

<sup>\*</sup> Professor do Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

<sup>\*\*</sup> Residente do Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

<sup>\*\*\*</sup> Estudante de graduação na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

**Audiência Primária:** Produtores de frangos e perus, pesquisadores, veterinários de aves de produção

<sup>†</sup> Autor correspondente: [emilbradt@gmail.com](mailto:emilbradt@gmail.com)

## SUMÁRIO

A avicultura tem por base a criação de frangos e perus, e o consumo de produtos e derivados dessa cadeia produtiva pode elevar o risco de exposição do consumidor a *Salmonella* spp. Devido à dinâmica dos sorovares, a *Salmonella* Heidelberg (SH) ganhou destaque, principalmente nos EUA e Brasil, onde surtos ocorreram nos últimos anos. Este sorovar tem o potencial de se multiplicar em macrófagos de aves, atingindo o fígado e baço, via corrente sanguínea ou sistema linfático, e outros órgãos. Esse estudo objetivou avaliar comparativamente a sensibilidade de frangos e perus de corte à SH. Para tal foram utilizados 112 pintos de corte e 112 perus de corte de um dia, distribuídos em dois experimentos. Os resultados expressos na quantificação microbiológica de SH e nos suabes cloacais evidenciaram que, na mesma idade, perus são mais sensíveis à ação da SH. A quantificação de ácidos graxos voláteis (AGVs) dos cecos indicaram uma viabilidade menor da SH nos cecos dos frangos de corte, provavelmente em decorrência da maior concentração de AGVs neste órgão, além de apresentarem níveis mais elevados de contaminação no inglúvio, se comparado aos perus. Os demais resultados de análise histopatológica e desempenho não demonstraram diferença significativa, pois esta *Salmonella* está altamente adaptada às aves. Na mesma idade, os perus são mais sensíveis à colonização cecal por SH, quando comparado com frangos de corte.

**Palavras chave:** Frangos, perus, *Salmonella* Heidelberg, sensibilidade

## DESCRIÇÃO DO PROBLEMA

A produção avícola mundial está fundamentada, principalmente, na criação de frangos e perus. O fator saúde humana está sendo priorizado, cada vez mais, na preferência por carne de aves, porém o aumento no consumo desse produto e seus derivados pode elevar o risco de exposição do consumidor à *Salmonella* spp. Nesse sentido, estratégias de controle e monitoramento de *Salmonella* spp., nas duas espécies, são desenvolvidas visando a redução da prevalência do agente e estabelecimento de um nível adequado de proteção do consumidor [1].

Levando em consideração que a prevalência dos sorovares é dinâmica, a *Salmonella* Heidelberg (SH) vem ganhando destaque nos últimos anos, principalmente nos EUA, onde ocorreram surtos em 29 estados, com 634 pessoas acometidas [2]. Carne de peru moída, frango assado e frango mecanicamente separado são alguns exemplos de produtos relacionados a esses surtos, ocorridos principalmente entre os anos de 2011 e 2014 [2, 4].

O sorovar Heidelberg tem o potencial de se multiplicar em macrófagos, atingindo o fígado e baço, via corrente sanguínea ou sistema linfático, e outros órgãos, como ovário, oviduto, moela e pulmão [5, 6]. A SH também possui alto grau de invasibilidade em humanos, causando sepse e miocardite [7].

A utilização de materiais contaminados processados é frequente para a pesquisa do agente, sendo realizada a partir de múltiplos órgãos para maximizar a probabilidade de detecção [8]. Van Immerseel et al. [9] relataram que suabes cloacais ou amostras de fezes apresentaram intermitência na excreção fecal de *Samonella* Enteritidis (SE) por aves infectadas, sendo que em outro trabalho abordando SH e SE, a diferença de excreção foi relacionada à imunidade individual das aves e a variabilidade entre os diferentes sorovares [10].

A microbiota cecal das aves hospeda, principalmente, microrganismos dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, principais responsáveis pela transformação dos polissacarídeos em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Estes ácidos são empregados por frangos como fonte de energia e carbono, além de serem eficazes contra a *Salmonella* pela regulação da expressão gênica responsável pela penetração nas células epiteliais do hospedeiro [11].

A distribuição e abundância relativa dos principais gêneros bacterianos no ceco são distintas entre frangos e perus, apesar da semelhança a nível dos filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria [12, 13]. As duas espécies também apresentam diferenças intestinais anatômicas, e de maneira precoce, os frangos estão mais próximos da maturidade fisiológica às seis semanas de idade, se comparado aos perus no mesmo período [14].

Frente a importância do Brasil como produtor e exportador de carne de perus e frangos e da carência de informações acerca da patogenia de SH, o presente estudo teve por objetivo avaliar a sensibilidade de perus e frangos frente à SH e o efeito que esse sorovar promove na invasão tecidual do ceco e na persistência do agente.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (FMVZ-UNESP), Botucatu - SP. A eutanásia das aves foi realizada por meio de deslocamento cervical, conforme preconizado pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária [15]. O protocolo experimental de número 0244/2017 foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista, estando de acordo com os princípios éticos na

experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### **Cepa de *Salmonella* Heidelberg**

Utilizou-se cepa de *Salmonella* Heidelberg (SH) pertence ao Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ-UNESP. Foi desenvolvida resistência ao ácido nalidíxico (Nal) [16] e rifampicina (Rif) [17], por meio de cultivos sucessivos em ágar verde brilhante (AVB) [18] contendo Nal (100ug/mL de meio) e Rif (100ug/mL de meio), conforme Andreatti Filho et al.[19], para facilitar posterior enumeração bacteriana. O inóculo utilizado como desafio foi constituído de cultivo da cepa de SH em caldo brain heart infusion (BHI), incubada a 41°C durante 18 horas. O número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi determinado por meio de diluições decimais em solução tampão de PBS [20] 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 feita após incubação a 41°C por 24 horas.

No terceiro dia de vida, todas as aves, exceto as do grupo controle negativo, receberam dose de 1mL do inóculo de SH, com concentração de  $6 \times 10^8$  UFC/mL que foi administrado oralmente, via gavagem. As aves do controle negativo receberam 1mL de PBS.

### **Aves e instalações**

Foram adquiridos de incubatórios comerciais, 112 perus de corte, fêmeas da linhagem Nicholas e 112 pintos de corte, fêmeas da linhagem Cobb 500. As aves foram alojadas em boxes com densidade populacional inicial de 21 aves/m<sup>2</sup> e final de 9,8

aves/m<sup>2</sup> para perus. Para os frangos, a proporção inicial foi de 40 aves/m<sup>2</sup> e final de 13 aves/m<sup>2</sup>. Os boxes foram equipados com bebedouro tipo pendular e comedouro manual tipo tubular, específicos para cada espécie. Os boxes foram forrados com maravalha.

Antes do alojamento das aves, as instalações foram submetidas a pesquisa de *Salmonella* spp. por meio de suabes de superfície. As aves infectadas e as do grupo controle foram alojadas em lados opostos do aviário.

### **Manejo sanitário e alimentar**

Os procedimentos de alojamento, manejo sanitário, alimentar e diário foram semelhantes para todas as aves da mesma espécie. O manejo sanitário dos perus teve como base as indicações do Guia de manejo para criação de perus de corte [21]. As aves foram vacinadas no incubatório, contra o vírus da doença de Newcastle, rinotraqueíte infecciosa dos perus e boubá aviária. Para os frangos de corte, o manejo sanitário foi baseado no Manual de manejo de frangos de corte Cobb [22]. As aves foram vacinadas no incubatório, contra o vírus da doença de Newcastle, Marek e bronquite infecciosa das galinhas. As dietas foram isonutritivas, sendo o programa alimentar dividido em três fases para os frangos, ou seja: inicial (1 a 21 dias), crescimento (22 a 35 dias) e final (36 a 42 dias) (Tabela 1) e duas fases para os perus: inicial (1 a 21 dias) e final (22 a 42 dias) (Tabela 2). As dietas experimentais foram formuladas com milho e farelo de soja baseadas em aminoácidos totais e os níveis nutricionais seguiram o recomendado pelo Manual da Linhagem Cobb 500 [23] e Manual da Linhagem Nicholas [21]. A ração dos perus foi peletizada, sendo que na fase inicial o *pellet* possuía diâmetro de 2,0mm e na fase de crescimento diâmetro de 6,0mm. Os frangos de corte receberam ração farelada. O fornecimento de água e ração foi *ad libitum*.

### ***Delineamento experimental***

#### **Experimento A (Frango):**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dois tratamentos e quatro repetições de catorze aves cada, sendo: controle negativo (pintos sem desafio de SH) e controle positivo (pintos com desafio de SH).

#### **Experimento B (Peru):**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dois tratamentos e quatro repetições de catorze aves cada, sendo: controle negativo (perus sem desafio de SH) e controle positivo (perus com desafio de SH).

#### **Quantificação de *Salmonella* Heidelberg no ingluvío, fígado, baço e ceco**

No período de 12, 24 horas e cinco, 10, 20 e 42 dias após infecção (dpi) foram eutanasiadas 10 aves por tratamento para quantificação microbiológica de SH no ingluvío, fígado, baço e ceco. A colheita dos órgãos e o cultivo microbiológico para pesquisa de SH foram realizados conforme metodologia utilizada por Milbradt et al. [24].

#### **Análise de suabe cloacal para determinação da incidência de SH**

No terceiro, sétimo, 11°, 15°, 19°, 23°, 26°, 30°, 34°, 38° e 42° dpi foram realizadas colheitas de suabes cloacais de quatro aves por repetição, para pesquisa de SH, totalizando números iguais de suabes para ambas as espécies. A colheita de suabe cloacal foi realizada de acordo com os parâmetros preconizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instrução Normativa nº126, de 03 de Novembro de 1995. Em cada colheita, os suabes foram acondicionados individualmente

em tubos de ensaio contendo solução salina peptonada tamponada (1%) e incubados à 41°C por 24 horas. Após esse período, cada tubo foi homogeneizado e submetido ao enriquecimento seletivo em caldo Tetrionato [25] e Rappaport-Vassiliadis [26], sendo posteriormente incubados à 41°C por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram cultivadas individualmente em placas de Petri contendo AVB com Nal e Rif, incubadas a 41°C por 24 horas. As amostras que apresentaram colônias com morfologia típica de *Salmonella* foram consideradas positivas.

### **Exame histológico e morfologia intestinal**

As amostras de ceco foram colhidas as 12, 24 horas e cinco, 10, 20 e 42 dpi na região medial e fixadas em solução de formalina 10% por 48 horas. As secções histológicas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), de acordo com a metodologia preconizada por Behmer et al. [27]. Os cortes histológicos foram analisados utilizando sistema analisador de imagem Axio Vision Software Rel. Versão 4.6.1 (Zeiss Vision) acoplado ao microscópio óptico modelo Axio Imager A1, Zeiss. As amostras cecais foram analisadas quanto à altura das vilosidades e profundidade de criptas, contabilizando 10 medidas para cada item. Considerou-se como altura das vilosidades a secção do ápice até a base, a qual correspondia com a porção superior das criptas. As criptas foram medidas da base até a região de transição entre criptas e vilosidades.

### **Desempenho**

Aos sete, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de vida as aves foram pesadas em grupos para determinação do peso médio (PM), ganho de peso (GDP), consumo de ração (CR) e

taxa de conversão alimentar (CA). A mortalidade foi registrada diariamente e a viabilidade avaliada semanalmente e no período total de criação.

### **Quantificação de Ácidos Graxos Voláteis (AGVs)**

No 20° e 42° dpi, foi colhido 1g de conteúdo cecal para quantificação dos ácidos graxos voláteis (AGVs) acético, propiônico, butírico, valérico, iso-valérico e iso-butírico. O conteúdo foi armazenado a -20°C. Devido as características físicas das amostras (elevado teor de matéria seca), realizou-se a diluição com água destilada na proporção de 1v:1m (volume/massa). A mistura foi homogeneizada em vórtex durante 2 minutos e submetida à centrifugação a 15.000 g/min, durante 60 minutos e a 4°C. Posteriormente, 0,8mL do sobrenadante foi transferido para um *vial* cromatográfico, onde foi acrescido 0,4mL de solução (3:1) de metafosfórico (25) com ácido fórmico (98-100) e 0,2mL de solução de ácido 2-etil-butírico (100mM) como padrão interno. Desse extrato, 1µL foi injetado em cromatógrafo gasoso com coluna capilar HP-FFAP (19091F-112; 25m, 0,320mm, 0,50µm) [28], estando as condições cromatográficas de acordo com Ferreira et al. [29].

A concentração dos ácidos graxos voláteis de cadeia curta (AGV) (mM/L) foi determinada com base na curva cromatográfica de calibração externa. Para análise estatística, os dados utilizados foram transformados para proporção molar (mM/100 mM), ou seja, a relação entre a quantidade de um determinado AGV e o total observado.

### ***Análise Estatística***

Os resultados da contagem de SH em ingluvío e ceco e dos suabes foram submetidos a análise de variância para o modelo com dois fatores, complementada com o teste de Tukey com 5% de significância [30], enquanto os resultados do fígado e baço

foram submetidos à análise de variância não paramétrica para o modelo com dois fatores (grupos e momentos de colheita), complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn [31], sendo calculada a mediana e valores mínimo e máximo de UFC por grama ( $\log_{10}\text{UFC/g}$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Resultados*

#### **Quantificação de *Salmonella* Heidelberg no inglúvio, fígado, baço e ceco**

As aves do grupo controle negativo não apresentaram SH em nenhum dos momentos avaliados. A colonização do inglúvio diferiu as 12 horas e no quinto dia após a infecção, sendo que os frangos de corte apresentaram maior contaminação, quando comparados aos perus de corte ( $3.48 \pm 0.56 \log$  (12 h) e  $4.01 \pm 0.24 \log$  (5 d) versus  $2.46 \pm 0.49 \log$  ( $P=0.041$ ) e  $2.84 \pm 0.63 \log$  ( $P=0.048$ ), respectivamente (Tabela 3). Observa-se que a partir do 10º dia após a inoculação de SH, há a redução da contaminação desse órgão, em ambas as espécies.

A colonização cecal pela SH pareceu obedecer a mesma dinâmica encontrada no inglúvio, isto é, apresentou redução a partir do 10º dia após a inoculação do desafio experimental em ambas as espécies. Doze horas após o desafio experimental, os perus de corte apresentaram maior contaminação cecal pela bactéria ( $6.68 \pm 0.14 \log$ ), quando comparado com a contaminação encontrada no ceco dos frangos ( $5.51 \pm 0.33 \log$ ) ( $P=0.048$ ), porém, as 24 horas após o desafio, não houve diferença ( $P=0.893$ ) na colonização cecal de ambas as espécies. No 10º dia, observou-se redução da contaminação cecal, a qual foi mais evidente nos frangos de corte, quando comparado com perus, sendo que esses ( $5.11 \pm 0.39 \log$ ) apresentaram contaminação mais elevada

do que os frangos ( $3.4 \pm 0.61 \log$ ) ( $P=0.032$ ). No 42° dia após a inoculação, nenhum frango de corte apresentou colonização cecal por SH, ao passo que os perus continuavam apresentando a bactéria nesse órgão ( $0.33 \pm 0.11 \log$ ) (Tabela 3).

No fígado e baço, a colonização foi pouco expressiva, quando comparada ao inglúvio e ceco, havendo diferença entre as espécies somente na 12° hora após a inoculação do desafio, sendo que os perus apresentaram maior contagem de UFC ( $2.39$  e  $2.45 \log$  no baço e fígado, respectivamente) ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4).

### **Excreção de *Salmonella* Heidelberg**

Observou-se nos frangos a redução na excreção de SH a partir do 11° dia após a inoculação do desafio experimental (Tabela 5). Apesar de haver diferença entre as espécies somente no 26°, 38° e 42° dia após a infecção, nota-se que a porcentagem de positividade é maior em perus de corte, não sendo evidenciada excreção da bactéria, em frangos de corte, a partir do 34° dia.

### **Exame histológico e morfologia intestinal**

Não foi observada diferença no tamanho das vilosidades e profundidade de criptas entre as aves do grupo controle e desafiadas com SH, em ambas as espécies.

### **Desempenho**

Ambas as espécies não apresentaram sinais clínicos da infecção por SH, o que pode ser evidenciado pelos parâmetros de desempenho, os quais não diferiram das aves que não receberam a bactéria. A viabilidade para os frangos foi de 99,98%, enquanto a porcentagem para os perus foi de 99,96%.

## Quantificação de Ácidos Graxos Voláteis (AGVs)

Aos 20 dias após infecção observou-se diferença entre as espécies de aves, nas concentrações dos ácidos graxos voláteis acético, propiônico, iso-butírico, valérico e iso-valérico, sendo que os frangos de corte apresentaram concentrações mais elevadas (Tabela 6). A concentração de ácido butírico foi semelhante nas duas espécies.

Aos 42 dias após infecção, houve redução na concentração da maioria dos AGVs mensurados. Nesse momento, frangos de corte apresentaram concentrações mais elevadas de ácido acético e propiônico, sendo que a concentração dos demais AGVs não diferiram entre as espécies de aves. Considerando a mesma espécie, frangos diferiram para todos o AGVs, sendo que em perus a diferença ficou apenas para os ácidos acético e butírico.

### *Discussão*

A dinâmica de infecção da SH em frangos e perus de corte difere, como observado nos resultados. Apesar da semelhança física, as espécies possuem diferenças, principalmente em relação ao sistema digestório, pois perus apresentam maior diâmetro intestinal, digesta mais viscosa e com maior tempo de retenção (taxa de passagem) [14]. Esses fatores podem levar a redução da pressão parcial de O<sub>2</sub> e, conseqüentemente, do potencial redox no intestino dessa espécie.

Quando a ave se contamina com *Salmonella* spp. pela via digestória, o inglúvio é a primeira barreira encontrada pelo patógeno, pois o mesmo é colonizado, principalmente, por bactérias do gênero *Lactobacillus*, o que confere ao órgão um baixo pH [32]. Nesse estudo, observou-se que nos frangos de corte houve redução da contaminação do inglúvio a partir do 5º dia após o desafio de SH, sendo que nos perus a redução foi observada a partir do 10º dia. Essa diferença na idade da redução da

contaminação, talvez se deva ao estabelecimento da microbiota do hospedeiro, pois se sabe que o aumento da diversidade da microbiota no sistema digestório é proporcional ao aumento da idade das aves [33, 35]. Os frangos de corte apresentaram maior contaminação no inglúvio em dois momentos (12 horas e 5° dia após a infecção), porém o número de amostras positivas não diferiu, em nenhum momento, entre as espécies. O inglúvio é uma das principais fontes de contaminação de *Salmonella* durante o processo de abate e, sabe-se que a contaminação desse órgão pode estar ligada a contaminação da cama, uma vez que as aves podem consumir até 4% da sua dieta em material usado como cama [36].

Os cecos são locais onde ocorre a fermentação dos carboidratos da dieta, portanto, contêm as maiores concentrações de bactérias do sistema digestório [37] e também são considerados um dos principais reservatórios de *Salmonella* spp. em aves domésticas [38]. Menconi et al. [39] inferiram que perus parecem ser mais sensíveis a infecção cecal por SH, quando comparados aos frangos de corte. Nesse estudo, os perus de corte apresentaram maior número de unidades formadoras de colônia nos cecos em dois momentos avaliados e, maior número de amostras positivas durante todo o período de criação (Tabela 3). Os frangos de corte alcançaram a idade de abate sem apresentar a bactéria no conteúdo cecal, porém os perus de corte não foram avaliados até a idade de abate, sendo que, devido a maturidade da microbiota intestinal e do sistema imune, talvez os mesmos não apresentassem contaminação nesse órgão na idade de abate. Quando a comparação é realizada dentro da mesma idade, os resultados indicaram que perus de corte apresentam maior sensibilidade a colonização cecal pela bactéria. Essa inferência pode ser reforçada pela avaliação da excreção fecal, sendo que nos frangos de corte, não foi detectada a bactéria a partir do 38° dia após a inoculação, ao passo que os perus de corte eliminaram a bactéria até o 42° dia, último dia de avaliação. Um período

de eliminação mais longo pode levar a maior contaminação do ambiente e, posteriormente, a reinfecção das aves, uma vez que a disseminação do agente pode ocorrer por meio da poeira, cama do aviário e restos fecais, com duração de vários meses [40].

Vários fatores podem reduzir ou potencializar a infecção do sistema digestório das aves domésticas por bactérias do gênero *Salmonella*, como a idade da ave, diversidade da microbiota intestinal, maturação do sistema imune, tipo de dieta, tamanho e forma das partículas da dieta, tipo de material utilizado como cama no aviário, dentre outras. Com relação a diversidade da microbiota intestinal, sabe-se que há diferença entre microbiota de perus e frangos de corte, sendo que ambas as espécies compartilham baixa similaridade filogenética (16 – 19% de similaridade em nível de gênero) [12, 13]. A dieta, no entanto, é um dos principais fatores que afeta a microbiota intestinal de aves [41].

Nesse estudo, com o objetivo de comparar a sensibilidade de frangos e perus de corte à colonização por SH, foram utilizadas dietas à base de milho e farelo de soja, atendendo as exigências do NRC e recomendações das linhagens utilizadas. Para os frangos de corte, foi fornecida ração farelada e para os perus, ração peletizada, ambas com o mesmo tamanho de partículas. Sabe-se que as propriedades físicas da ração podem influenciar o pH, a microbiota e a produção de ácidos graxos voláteis no sistema digestório das aves [42]. Nesse estudo, a concentração dos ácidos graxos voláteis acético e propiônico foi mais elevada no conteúdo cecal dos frangos de corte, ao passo que a concentração de ácido butírico não diferiu entre as espécies. Segundo Carrier et al. [43], Hinton et al. [44] e Bedford [45], a redução de *Salmonella* no ceco, está associada à redução do pH cecal e aumento da concentração de ácidos graxos voláteis. Pode-se inferir que a maior concentração de ácidos graxos voláteis no conteúdo cecal de

frangos de corte esteja relacionada à microbiota específica de frangos de corte, já que ambas as espécies receberam ração com os mesmos ingredientes.

Segundo Santos et al. [46] as características físicas da ração podem influenciar a colonização cecal por *Salmonella*, pois essas podem modificar o pH intestinal e, conseqüentemente, a microbiota. Segundo Engberg et al. [42], a peletização da ração reduz substancialmente o tamanho das partículas, fazendo com que uma maior quantidade de amido fique disponível nos cecos para a fermentação microbiana, aumentando conseqüentemente, a produção de ácidos graxos voláteis e reduzindo o pH. Huang et al. [47] evidenciaram que frangos de corte alimentados com ração peletizada apresentaram maior concentração de ácidos graxos voláteis, menor pH, mas maior taxa de sobrevivência de *Salmonella* Typhimurium nos cecos, quando comparado com frangos alimentados com ração farelada. Em nosso estudo, mesmo recebendo ração farelada, os frangos de corte apresentaram maior concentração de ácidos graxos voláteis e menor colonização por SH nos cecos, fato que pode ser atribuído a microbiota específica da espécie. Outro fator que pode ter contribuído para a redução da contaminação por SH em frangos de corte, é o baixo pH da moela, o que pode ser atribuído ao uso da ração farelada. Acredita-se que a menor viabilidade da SH nos cecos dos frangos de corte se deva a maior concentração de ácidos graxos voláteis nesse órgão, uma vez que essas aves apresentavam níveis mais elevados de contaminação no inglúvio.

Não foram observadas diferenças na morfometria intestinal e desempenho entre as aves desafiadas e do tratamento controle, em ambas as espécies. Isso sugere que a infecção por *Salmonella* paratífica, como é o caso da SH, não tenha interferência de forma significativa no desempenho zootécnico das aves, pois este grupo de *Salmonella* está altamente adaptado às aves e convive de forma equilibrada com o hospedeiro [48].

## CONCLUSÕES E APLICAÇÕES

- 1- Perus são mais sensíveis a colonização cecal por *Salmonella* Heidelberg, quando comparado com frangos de corte, na mesma idade.

## REFERÊNCIAS E NOTAS

1. Foley, S. L., R. Nayak, I. B. Hanning, T. J. Johnson, J. Han, and S. C. Ricke. 2011. Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:4273–9 Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21571882>.
2. CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Multistate Outbreak of Multidrug-Resistant *Salmonella* Heidelberg Infections Linked to Foster Farms Brand Chicken (Final Update), 31 July, 2014a. Disponível em : <https://www.cdc.gov/salmonella/heidelberg-10-13/>.
3. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. *Salmonella* Heidelberg Infections Linked to Ground Turkey. 2011. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/2011/ground-turkey-11-10-2011.html>.
4. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Salmonella* Heidelberg Infections Linked to Tyson Brand Chicken. 2014b. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/heidelberg-01-14/>.
5. Chappell, L., P. Kaiser, P. Barrow, M. A. Jones, C. Johnston, and P. Wigley. 2009. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128:53–59.
6. Lutful Kabir, S. M. 2010. Avian colibacillosis and salmonellosis: A closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7:89–114.
7. Wilmshurst, P., and H. Sutcliffe. 1995. Splenic abscess due to *salmonella* heidelberg. *Clin. Infect. Dis.* 21:1065–1066.
8. Gast, R. K., and C. W. Beard. 1990. Isolation of *Salmonella enteritidis* from Internal Organs of Experimentally Infected Hens Published by : American Association of Avian Pathologists Stable URL : <https://www.jstor.org/stable/1591394> REFERENCES Linked references are available on JSTOR for th. 34:991–993.
9. Van Immerseel, F., J. De Buck, F. Boyen, L. Bohez, F. Pasmans, J. Volf, M. Sevcik, I. Rychlik, F. Haesebrouck, and R. Ducatelle. 2004. Medium-Chain Fatty Acids Decrease Colonization and Invasion through *hilA* Suppression Shortly after Infection of

Chickens with *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3582–3587 Available at <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.70.6.3582-3587.2004>.

10. Borsoi, A., L. R. do Santos, L. B. Rodrigues, H. L. de Souza Moraes, C. T. P. Salle, and V. P. do Nascimento. 2011. Behavior of salmonella heidelberg and salmonella enteritidis strains following broiler chick inoculation: Evaluation of cecal morphometry, liver and cecum bacterial counts and fecal excretion patterns. *Brazilian J. Microbiol.* 42:266–273.

11. Clavijo V., Flórez M.J.V. 2018. The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: a review. *Poult Sci* 97(3):1006–1021.

12. Wei, S., M. Morrison, and Z. Yu. 2013. Bacterial census of poultry intestinal microbiome. *Poult. Sci.* 92:671–683.

13. Wei, S., M. Lilburn, and Z. Yu. 2016. The Bacteriomes of Ileal Mucosa and Cecal Content of Broiler Chickens and Turkeys as Revealed by Metagenomic Analysis. *Int. J. Microbiol.*

14. Palander, S., M. Näsi, and P. Palander. 2010. Digestibility and energy value of cereal-based diets in relation to digesta viscosity and retention time in turkeys and chickens at different ages estimated with different markers. *Arch. Anim. Nutr.* 64:238–253.

15. CFMV (Conselho Federal de Medicina Veterinária). Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais - Conceitos e Procedimentos Recomendados, 2012. 1v., 62p.; Brasília.

16. Ácido Nalidíxico – Wintomylon - Sanofi Aventis, Brasil.

17. Rifampicina – Rifaldin – Sanofi Aventis, Brasil.

18. Ágar Verde Brilhante (AVB) - Acumedia Manufacturers, Inc. Lansing, MI 48912 USA.

19. Andreatti Filho, R. L., E. N. Da Silva, and P. R. Curi. 1997. Ácidos orgânicos e microbiota cecal anaeróbia no controle da infecção experimental de frangos por *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteritidis*. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 49:661–672.

20. PBS Accumedia-Neogen Corporation, Lansing, MI, EUA.

21. Aviagen. 2015. Management Guidelines for Raising Commercial Turkeys.

22. COBB, 2012. Manual de manejo de frangos de corte Cobb.
23. COBB, 2015. Broiler Performance and Nutrition Supplement.
24. Milbradt, E. L., J. R. Zamae, J. P. Araújo Júnior, P. Mazza, C. R. Padovani, V. R. Carvalho, C. Sanfelice, D. M. Rodrigues, A. S. Okamoto, and R. L. Andreatti Filho. 2014. Control of Salmonella Enteritidis in turkeys using organic acids and competitive exclusion product. *J. Appl. Microbiol.* 117:554–563.
25. Tetrathionate Broth Base - Acumedia Manufacturers, Inc. Lansing, MI 48912 USA.
26. Rappaport-Vassiliadis R10 Broth - Acumedia Manufacturers, Inc. Lansing, MI 48912 USA.
27. Behmer, A.O., Tolosa, E.M.C. e Freitas Neto, A.G, 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: Eduspe, 239p.
28. J & W 112-88A7, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA.
29. Ferreira, E. M., A. V. Pires, I. Susin, M. V. Biehl, R. S. Gentil, M. D. O. M. Parente, D. M. Polizel, C. V. D. M. Ribeiro, and E. De Almeida. 2016. Nutrient digestibility and ruminal fatty acid metabolism in lambs supplemented with soybean oil partially replaced by fish oil blend. *Anim. Feed Sci. Technol.* 216:30–39 Available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.007>.
30. ZAR, J. H. *Biostatistical Analysis* (5th Edition), 2009. Prentice-Hall/Pearson, Upper Saddle River, NJ.
31. Dunn, O. J. Multiple comparisons using rank sums, 1964. *Technometrics*, v.6, n.3, p.241-52.
32. Fonseca, B. B., M. E. Beletti, M. S. da Silva, P. L. da Silva, I. N. Duarte, and D. A. Rossi. 2010. Microbiota of the cecum, ileum morphometry, pH of the crop and performance of broiler chickens supplemented with probiotics. *Rev. Bras. Zootec.* 39:1756–1760 Available at [http://apps.webofknowledge.com/full\\_record.do?page=5&excludeEventConfig=ExcludeIfFromFullRecPage&qid=55&log\\_event=yes&viewType=fullRecord&SID=S1uedhXIb6Eq6hoQs7V&product=UA&doc=854&search\\_mode=Refine](http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?page=5&excludeEventConfig=ExcludeIfFromFullRecPage&qid=55&log_event=yes&viewType=fullRecord&SID=S1uedhXIb6Eq6hoQs7V&product=UA&doc=854&search_mode=Refine).
33. Danzeisen, J. L., H. B. Kim, R. E. Isaacson, Z. J. Tu, and T. J. Johnson. 2011. Modulations of the Chicken Cecal Microbiome and Metagenome in Response to Anticoccidial and Growth Promoter Treatment. *PLoS One* 6:1–14.
34. Oakley, B. B., H. S. Lillehoj, M. H. Kogut, W. K. Kim, J. J. Maurer, M. D. Lee, S. R. Collett, T. J. Johnson, and N. A. Cox. 2014. The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiol. Lett.* 360:100–112.

35. Mohd Shaufi, M. A., C. C. Siew, C. W. Chong, H. M. Gan, and Y. W. Ho. 2015. Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. 7:1–12.
36. Malone, G. W., G. W. Chaloupka, S. Division, W. W. Saylor, and A. Biochemistry. 1983. Influence of Litter Type and Size on Broiler Performance . 1 . Factors Affecting. *Poult. Sci.* 62:1741–1746.
37. Apajalahti, J. 2005. Comparative Gut Microflora , Metabolic Challenges , and Potential Opportunities. :444–453.
38. Fanelli, M. J., W. W. Sadler, C. E. Franti, and J. R. Brownell. 1971. Localization of Salmonellae within the Intestinal Tract of Chickens. *Avian Dis.* 15:366–375.
39. Menconi, A., A. D. Wolfenden, S. Shivaramaiah, J. C. Terraes, T. Urbano, J. Kuttel, C. Kremer, B. M. Hargis, and G. Tellez. 2011. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture for the treatment of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in neonatal broiler chickens and turkey poults. *Poult. Sci.* 90:561–565.
40. Gast, R. K., R. Guraya, D. R. Jones, J. Guard, K. E. Anderson, M. Karcher, R. K. Gast, A. D. R. Guraya, A. D. R. Jones, A. J. Guard, A. K. E. Anderson, and D. M. K. C. 2017. Frequency and Duration of Fecal Shedding of *Salmonella* Serovars Heidelberg and Typhimurium by Experimentally Infected Laying Hens Housed in Enriched Colony Cages at Different Stocking Densities. *Avian Dis.* 61:366–371.
41. Pan, D., and Z. Yu. 2014. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes* 5:108–119.
42. Engberg, R. M., M. S. Hedemann, and B. B. Jensen. 2002. The influence of grinding and pelleting of feed on the microbial composition and activity in the digestive tract of broiler chickens. *Br. J. Sci.* 44:569–579.
43. Corrier, D. E., A. Hinton, R. L. Ziprin, R. C. Beier, and J. R. DeLoach. 1990. Effect of Dietary Lactose on Cecal pH , Bacteriostatic Volatile Fatty Acids , and *Salmonella typhimurium* Colonization of Broiler Chicks. *Avian Dis.* 34:617–625 Available at <http://www.jstor.org/stable/1591254>.
44. Hinton, A., D. E. Corrier, G. E. Spates, J. O. Norman, L. Ziprin, R. C. Beier, and J. R. Deloach. 1990. Biological Control of *Salmonella typhimurium* in Young Chickens. *Avian Dis.* 34:626–633.
45. Bedford, M. 2000. Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets : implications and strategies to minimise subsequent problems. *Worlds. Poult. Sci. J.* 56:347–365.
46. Santos, F. B. O., B. W. Sheldon, A. A. Santos Jr, and P. R. Ferket. 2008. Influence

of Housing System, Grain Type, and Particle Size on Salmonella Colonization and Shedding of Broilers Fed Triticale or Corn-Soybean Meal Diets. *Poult. Sci.* 87:405–420.

47. Huang, D. S., D. F. Li, J. J. Xing, Y. X. Ma, Z. J. Li, and S. Q. Lv. 2006. Effects of Feed Particle Size and Feed Form on Survival of *Salmonella typhimurium* in the Alimentary Tract and Cecal *S. typhimurium* Reduction in Growing Broilers. *Poult. Sci.* 85:831–836.

48. Muniz, E. C., L. Pickler, M. C. Lourenço, A. L. Kraieski, D. Mesa, P. Westphal, and E. Santin. 2015. Avaliação da resposta imunológica da mucosa intestinal de frangos de corte desafiados com diferentes sorovares de *Salmonella*. *Pesq. Vet. Bras.* 35:241–248 Available at <http://www.phcogrev.com/text.asp?2010/4/7/32/65324>.

**Tabela 1.** Composição percentual e estimada das dietas experimentais de frangos de corte.

Ingredientes (%)	Inicial (1-21 d)	Crescimento (22-35 d)	Final (36-42 d)
Milho	58.191	61.190	65.013
Farinha de soja (45%)	35.720	32.180	28.650
Óleo de soja	2.850	3.765	3.778
Calcário	0.980	0.930	0.820
Fosfato dicálcico	0.790	0.550	0.380
Sal de mesa	0.390	0.390	0.378
DL-Metionina	0.312	0.290	0.266
Vitamina/premix mineral	0.300	0.300	0.300
L-Lisina	0.250	0.240	0.253
Bicarbonato de sódio	0.135	0.100	0.100
Treonina	0.082	0.065	0.062
<b>TOTAL</b>	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>
<b>Composição nutricional calculada</b>			
EM (kcal/kg)	3,050	3,150	3,200
CP (%)	21.202	19.802	18.502
Cálcio (%)	0.666	0.581	0.491
Fósforo disponível (%)	0.260	0.209	0.172
Fibra bruta (%)	2.900	2.764	2.643
Metionina (%)	0.593	0.556	0.518
Aminoácidos contendo enxofre (%)	0.881	0.828	0.776
Lisina (%)	1.226	1.133	1.060
Potássio (%)	0.822	0.766	0.713
Sódio (%)	0.210	0.201	0.196
Cl (%)	0.285	0.285	0.279
Ácido linoleico (%)	0.296	0.348	0.353
Triptofano (%)	0.236	0.217	0.199
Treonina (%)	0.799	0.734	0.686
Arginina (%)	1.330	1.228	1.129

**Multivitamínico Frango Inicial** (1 kg): níveis de garantia/kg de ração para a fase inicial: Vit. A, 11.000 UI; Vit. D3, 2.000 UI; Vit. E, 16 mg; Ácido fólico, 0.4 mg; Pantotenato de cálcio, 10 mg; Biotina, 0.06 mg; Niacina, 35 mg; Piridoxina, 2 mg; Riboflavina, 4.5 mg; Tiamina, 1.2 mg; Vit. B12, 16 mcg; Vit. K3, 1.5 mg; Se, 0.25 mg; Antioxidante, 30 mg. **Multivitamínico Frango Crescimento** (1 kg): níveis de garantia/kg de ração fase de crescimento: Vit. A, 8.800 UI; Vit. D3, 1.600 UI; Vit. E, 12.8 mg; Ácido fólico, 0.32 mg; Pantotenato de cálcio, 8 mg; Biotina, 0.048 mg; Niacina, 28 mg; Piridoxina, 1.6 mg; Riboflavina, 3.6 mg; Tiamina, 0.96 mg; Vit. B12, 12.8 mcg; Vit. K3, 1.2 mg; Se, 0.2 mg; Antioxidante, 24 mg. **Multivitamínico Frangos Final** (0.5 kg): níveis de garantia/kg de ração: Vit. A, 3.000 UI; Vit. D3, 500 UI; Vit. E, 5 mg; Pantotenato de cálcio, 4 mg; Biotina, 0.015 mg; Niacina, 5 mg; Piridoxina, 0.4 mg; Riboflavina, 1 mg; Tiamina, 0.3 mg; Vit. B12, 3 mcg; Vit. K3, 0.5 mg; Se, 0.2 mg; Antioxidante, 15 mg. 4 MC-MIX Mineral Aves (0.5 kg) níveis de garantia/kg de ração: Cu, 9 mg; Zn, 60 mg; I, 1 mg; Fe, 30 mg e Mn, 60 mg.

**Tabela 2.** Composição percentual e estimada das dietas experimentais de perus de corte.

Ingredientes	Tipo de Ração	
	Inicial (1 - 21d)	Crescimento (22 - 42d)
Farelo de Soja	51.15	47.69
Milho	35.91	39.77
Oleo Soja	5.77	5.80
Fosfato Bicálcico	2.85	2.59
Calcário	1.37	1.28
L-Lisina 98%	1.28	1.28
Bicarbonato de Sódio	0.60	0.56
Metionina	0.39	0.35
Adsorvente	0.30	0.30
Suplemento Mineral <sup>1</sup>	0.15	0.15
Treonina	0.13	0.11
Suplemento Vitamínico <sup>2</sup>	0.10	0.10
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
Níveis Nutricionais Calculados		
Energia Metab. (kcal/kg)	3.000	3.050
Proteína Bruta (%)	28.00	26.00
Cálcio (%)	1.40	1.30
Fósforo Disponível (%)	0.75	0.70
Lisina (%)	1.82	1.70
Metionina Total (%)	0.73	0.68
Metionina + Cistina Total (%)	1.18	1.11
Arginina Total (%)	1.95	1.82
Treonina Total (%)	1.16	1.09

**1**-Enriquecimento mineral por kg de ração: Cu: 15 mg; Fe:65 mg; Mn: 110 mg; Zn:100 mg; I: 1.5 mg; Se: 0.3 mg. **2**-Enriquecimento vitamínico por kg de ração: Vit A 11250 UI Vit. D3: 4000 UI; Vit. E: 50 UI; Vit. K3: 4.5 mg, Biotina: 0.25mg, Tiamina B1: 4.5mg, Riboflavina B2: 8mg; Piridoxina: 7mg, Vit. B12: 0.020 mg; Niacina: 75 mg; Ácido Pantotênico: 23 mg; Ácido Fólico: 2 mg e Antioxidante: 15 mg.

**Tabela 3.** Média em  $\log_{10}$  das unidades formadoras de colônia por grama de conteúdo de Inglúvio e ceco de frangos e perus de corte, inoculados por via oral com  $6 \times 10^8$  UFC/mL de *Salmonella* Heidelberg no terceiro dia de vida.

Grupo Experimental	Inglúvio ( $\log_{10}$ ufc/g $\pm$ EPM*)						Valor <i>P</i>
	Idade (horas/dias após infecção)						
	12h	24h	5d	10d	20d	42d	
Frangos	3.48 $\pm$ 0.56 <sup>aA</sup>	3.47 $\pm$ 0.45 <sup>A</sup>	4.01 $\pm$ 0.24 <sup>aA</sup>	2.36 $\pm$ 0.45 <sup>B</sup>	1.13 $\pm$ 0.48 <sup>C</sup>	0.20 $\pm$ 0.2 <sup>D</sup>	<b>0.035</b>
Perus	2.46 $\pm$ 0.49 <sup>ba</sup>	2.95 $\pm$ 0.49 <sup>A</sup>	2.84 $\pm$ 0.63 <sup>ba</sup>	2.91 $\pm$ 0.67 <sup>A</sup>	0.71 $\pm$ 0.36 <sup>B</sup>	0.40 $\pm$ 0.27 <sup>B</sup>	<b>0.046</b>
Valor <i>P</i>	<b>0.041</b>	<b>0.456</b>	<b>0.048</b>	<b>0.892</b>	<b>0.078</b>	<b>0.054</b>	
	Ceco ( $\log_{10}$ ufc/g $\pm$ EPM*)						Valor <i>P</i>
	Idade (horas/dias após infecção)						
	12h	24h	5d	10d	20d	42d	
Frangos	5.51 $\pm$ 0.33 <sup>ba</sup>	6.54 $\pm$ 0.11 <sup>A</sup>	6.17 $\pm$ 0.13 <sup>A</sup>	3.4 $\pm$ 0.61 <sup>ba</sup>	1.12 $\pm$ 0.61 <sup>C</sup>	0 <sup>bd</sup>	<b>0.008</b>
Perus	6.68 $\pm$ 0.14 <sup>aA</sup>	6.97 $\pm$ 0.15 <sup>A</sup>	6.45 $\pm$ 0.23 <sup>A</sup>	5.11 $\pm$ 0.39 <sup>aA</sup>	1.11 $\pm$ 0.54 <sup>B</sup>	0.33 $\pm$ 0.11 <sup>aC</sup>	<b>0.023</b>
Valor <i>P</i>	<b>0.048</b>	<b>0.893</b>	<b>0.224</b>	<b>0.032</b>	<b>0.678</b>	<b>0.001</b>	

<sup>a-b; A-D</sup> Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha são significativamente diferentes pelo Teste de Tukey ( $P < 0.05$ ).

\* Erro padrão da média.

**Tabela 4.** Mediana e valores mínimo e máximo das unidades formadoras de colônia por grama no fígado e baço de frangos e perus de corte, desafiados por via oral com  $6 \times 10^8$  UFC/mL de *Salmonella* Heidelberg no terceiro dia de vida.

Grupo Experimental	Fígado (ufc/g)					
	Idade (horas/dias após infecção)					
	12h	24h	5d	10d	20d	42d
Frangos	0 (0;3.1) <sup>a</sup>	0 (0;3.1)	0 (0;2.6)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)
Perus	2.39 (0;3.4) <sup>b</sup>	0 (0;2)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)
Valor <i>P</i>	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
	Baço (ufc/g)					
	Idade (horas/dias após infecção)					
	12h	24h	5d	10d	20d	42d
Frangos	0 (0;3.2) <sup>a</sup>	0 (0;3.7)	0 (0;2.6)	1 (0;3)	0 (0;2)	0 (0;0)
Perus	2.45 (0;3.7) <sup>b</sup>	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;2.8)	0 (0;0)	0 (0;0)
Valor <i>P</i>	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

<sup>a-b</sup> Letras diferentes na coluna indicam diferença de contaminação entre as espécies, pela análise de variância não paramétrica ( $P < 0.05$ ).

**Tabela 5.** Porcentagem de excreção de *Salmonella* Heidelberg em frangos e perus de corte desafiados com  $6 \times 10^8$  UFC/mL no terceiro dia de vida.

Dias após infecção	Grupos (% positividade)		Valor <i>P</i>
	Frangos	Perus	
3	100 <sup>A</sup>	100 <sup>A</sup>	1
7	100 <sup>A</sup>	100 <sup>A</sup>	1
11	93.75 <sup>A</sup>	100 <sup>A</sup>	0.999
15	43.75 <sup>B</sup>	62.25 <sup>B</sup>	0.456
19	31.25 <sup>B</sup>	37.5 <sup>C</sup>	0.986
23	25 <sup>B</sup>	31.5 <sup>C</sup>	0.786
26	6.25 <sup>bc</sup>	25 <sup>aC</sup>	0.038
30	18.75 <sup>B</sup>	18.75 <sup>C</sup>	0.967
34	18.75 <sup>B</sup>	25 <sup>C</sup>	0.781
38	0 <sup>bd</sup>	31.25 <sup>aC</sup>	0.031
42	0 <sup>bd</sup>	18.75 <sup>aC</sup>	0.023
Valor <i>P</i>	<b>0.023</b>	<b>0.006</b>	-

<sup>a-b; A-D</sup> Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna são significativamente diferentes pelo Teste de Tukey ( $P < 0.05$ ).

**Tabela 6.** Concentração de ácidos graxos voláteis de cadeia curta no conteúdo cecal de frangos e perus de corte, desafiados no terceiro dia de vida com  $6 \times 10^8$  UFC/mL de *Salmonella* Heidelberg.

Grupos Experimentais				
AGV (mM/100mM)	Idade (dias após infecção)	Frangos	Perus	Valor <i>P</i>
Acético	20	108±5.86 <sup>Aa</sup>	81.6±5.76 <sup>Ba</sup>	0.032
	42	70.1±6.03 <sup>Ab</sup>	53.4±5.89 <sup>Bb</sup>	0.049
Valor <i>P</i>		0.032	0.045	-
Propiônico	20	20.7±0.86 <sup>Aa</sup>	5,9±0,84 <sup>B</sup>	0.028
	42	7.4±1.26 <sup>Ab</sup>	3.6±0.79 <sup>B</sup>	0.044
Valor <i>P</i>		0.015	0.072	-
Butírico	20	22.5±2.29 <sup>a</sup>	28.6±4.75 <sup>a</sup>	0.267
	42	9.5±0.93 <sup>b</sup>	9.8±1.96 <sup>b</sup>	0.673
Valor <i>P</i>		0.021	0.018	-
Valérico	20	2.4±0.12 <sup>Aa</sup>	1.3±0.22 <sup>B</sup>	0.045
	42	1.2±0.41 <sup>b</sup>	1.1±0.81	0.067
Valor <i>P</i>		0.028	0.347	
Isovalérico	20	2.1±0.25 <sup>Aa</sup>	0.9±0.31 <sup>B</sup>	0.042
	42	0.9±0.2 <sup>b</sup>	0.7±0.84	0.088
Valor <i>P</i>		0.043	0.087	

<sup>a-b, A-B</sup> Médias seguidas por diferentes letras minúsculas em uma mesma coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P < 0.05$ ).

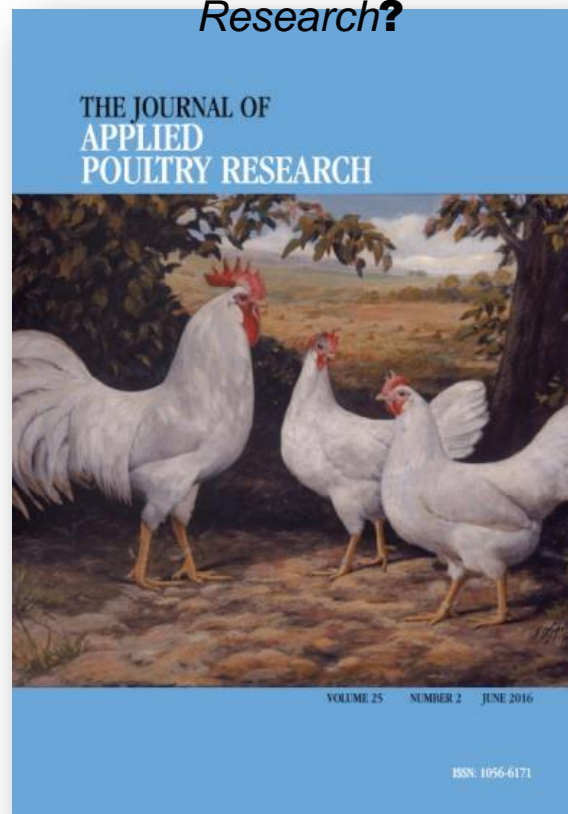
ANEXO

# POULTRY SCIENCE ASSOCIATION



## Instructions to Authors

**Interested in publication in *The Journal of Applied Poultry Research?***



UPDATED FEBRUARY 2017

Please visit the online Instructions for Authors at [https://academic.oup.com/japr/pages/General\\_Instructions](https://academic.oup.com/japr/pages/General_Instructions) to ensure you are viewing the most up to date version.

## Table of contents

<b>I. Scope and general information .....</b>	<b>46</b>
A. Scope.....	46
B. Submission .....	46
C. Contact information for journal staff .....	46
D. Types of articles .....	46
<b>II. Journal Policies .....</b>	<b>48</b>
A. Peer review process .....	48
B. Pre-submission language editing.....	48
C. Post-production corrections.....	48
D. Ethics.....	48
E. Care and use of animals.....	49
F. Third-party copyright.....	49
G. Third-party content in Open Access papers .....	50
H. Conflict of interest .....	50
I. Permissions regarding reuse of OUP materials .....	50
J. Self-archiving policy.....	52
K. Copyright.....	53
L. Open Access .....	53
<b>III. Preparation of manuscript .....</b>	<b>55</b>
A. Manuscript format and structure/style .....	55
B. Tables .....	59
C. Miscellaneous usage notes.....	60
D. Figures/illustrations .....	62
E. Supplementary data .....	66
<b>IV. Charges.....</b>	<b>67</b>
A. Open Access charges .....	67
B. Conventional page charges .....	68
C. Color charges .....	68
<b>V. Additional information about accepted manuscripts .....</b>	<b>69</b>
A. Charges .....	69
B. Proofs .....	69
C. Advance Access .....	69
D. Offprints.....	69
E. CrossRef funding data registry.....	69

# I. Scope and general information

## A. Scope

**The mission of *The Journal of Applied Poultry Research (JAPR)* is to provide practical, reliable, and timely information to those whose livelihoods are derived from the commercial production of poultry and those whose research benefits this sector; address topics of near-term application based on appropriately designed studies and critical observations; encourage scientific approaches to practical problem solving; and present information comprehensible to a broad readership. Opinions or views expressed in papers published by *JAPR* are those of the authors and do not necessarily represent the opinion of the Poultry Science Association or the editor-in-chief.**

## B. Submission

**All manuscripts are submitted and reviewed via the journal's [Scholar One Manuscripts submission site](http://mc.manuscriptcentral.com/japr) at <http://mc.manuscriptcentral.com/japr>. New authors should create an account prior to submitting a manuscript for consideration.**

## C. Contact information for journal staff

**For information on the scientific content of the journal, contact the editor-in-chief, Dr. John Carey, Texas A&M University  
Department of Poultry Science, 101 Kleberg Center, 2472 TAMU, College Station, TX 77843-2472; e-mail: [jcarey@poultry.tamu.edu](mailto:jcarey@poultry.tamu.edu)**

**For assistance with ScholarOne Manuscripts and manuscript submission, contact David Busboom at [david.busboom@poultryscience.org](mailto:david.busboom@poultryscience.org).**

**For assistance with article proofs, copyright forms, published manuscripts, contact Matthew Marusak at [poultry.science@oup.com](mailto:poultry.science@oup.com).**

**For assistance with invoicing, contact [production.invoicing@oup.com](mailto:production.invoicing@oup.com).**

## D. Types of articles

### i.) Research reports

**Most papers published in *JAPR* are research reports. The journal emphasizes the importance of good scientific writing and clarity in presentation of the concepts, apparatus, and sufficient background information that would be required for thorough understanding by scientists in other disciplines. The results of experiments published in *JAPR* must be replicated, either by replicating treatments within experiments or by repeating experiments.**

### ii.) Field reports

**Field reports will be published when adequate background is available and conclusions can be supported by quantifiable laboratory or diagnostic results.**

**The manuscript should follow the format outlined in the Style and Form section of this document. It should include a section titled Field Report in which the observations are explained and discussed under subheadings of Materials and Methods and Results and Discussion. Authors are encouraged to include subheadings for all major areas in this section.**

iii.) Review articles

**Articles submitted to this section may cover new developments in a field, describe the evolution of a currently accepted management practice, propose changes in management based on current research, or describe procedures. Clear distinctions should be made between firmly established practices and unresolved questions. Articles should begin with a concise description of the topic, followed by a critical evaluation of the important references. Review articles, whether solicited or unsolicited, will be subject to a stringent review process.**

**Review articles should follow the general format outlined in the Style and Form, when appropriate, and include brief subheadings to separate main ideas. A Conclusions and Applications section should be included in most cases.**

iv.) Symposium and workshop articles

**Manuscripts presented at the annual meeting as part of a symposium or workshop may be submitted with prior agreement by the editor-in-chief. These submissions will be subject to peer review and may be accepted or rejected in the same manner as other submissions. The format may be similar to reviews, research reports, or field reports, as outlined in the Style and Form.**

v.) Letters and commentaries

**The journal accepts letters, book reviews, and other free-form communications (used to correct errors, provide clarification, or offer other points of view on pertinent issues). Submissions may be edited in consultation with the author.**

## II. Journal Policies

### A. Peer review process

**The journal uses a two-stage review process. All manuscripts will first receive a preliminary review to ensure appropriateness for the journal. The second review will be a more detailed scrutiny by individuals knowledgeable in the specific subject area of the paper.**

**Additional examination of the manuscript will be made by the editors.**

**The review process will be stringent. Names of authors will be made known to reviewers; reviewers may contact the authors directly with questions, suggestions, and comments if such contact will improve the paper or streamline the review process. The subject editors will handle all initial correspondence with authors during the review process; the editor-in-chief will notify the author of the final decision to accept or reject.**

### B. Pre-review language editing

**If your first language is not English, to ensure that the academic content of your paper is fully understood by journal editors and reviewers, we recommend using an external language editing service. Language editing is optional and does not guarantee that your manuscript will be accepted for publication. For further information on this service, please click [here](#). Several specialist language editing companies offer similar services and you can also use any of these. Authors are liable for all costs associated with such services.**

### C. Post-production corrections

**No correction to a paper already published will be carried out without an erratum or corrigendum (as applicable), this applies to papers on Advance Access and published within an issue. This means that any change carried out to a paper already published online will have a corresponding erratum or corrigendum published with its own separate DOI. Whether on Advance Access or in an issue, if an erratum or corrigendum is published, the online version of the original paper will also be corrected online and the correction notice will mention this. Corrections will only be made if the publication record is seriously affected by the academic accuracy of published information.**

**Authors' corrections to Supplementary Data are made only in exceptional circumstances (for example major errors that compromise the conclusion of the study). Because the Supplementary Data is part of the original paper and hence the published record, the information cannot be updated if new data have become available or interpretations have changed.**

### D. Ethics

**Authors should observe high standards with respect to publication ethics as set out by the [Commission on Publication Ethics \(COPE\)](#). Falsification or fabrication of data,**

plagiarism, including duplicate publication of the authors' own work without proper citation, and misappropriation of the work are all unacceptable practices. Any cases of ethical misconduct are treated very seriously and will be dealt with in accordance with the COPE guidelines.

By submission of a manuscript, the authors guarantee to the journal that the work described has not been published before (except in the form of an abstract or as part of a published lecture, review, thesis, or dissertation); that it is not under consideration for publication elsewhere; and that its publication has been approved by all coauthors, if any, as well as by the responsible authorities at the institute where the work has been carried out. Appropriate identification of previously published preliminary reports should be provided in a title page footnote.

### E. Care and use of animals

Authors must make it clear that experiments were conducted in a manner that avoided unnecessary discomfort to the animals by the use of proper management and laboratory techniques. Experiments shall be conducted in accordance with the principles and specific guidelines presented in *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching*, 3rd edition, 2010 (found [here](#)); and, if applicable, *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (United States Department of Human Health and Services, National Institutes of Health, Publication Number ISBN 0-309-05377-3, 1996); or *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*, 2nd ed. Volume 1, 1993 (Canadian Council on Animal Care). Methods of killing experimental animals must be described in the text. In describing surgical procedures, the type and dosage of the anesthetic agent must be specified. Intra-abdominal and intrathoracic invasive surgery requires anesthesia. This includes caponization. The editor-in-chief of Poultry Science may refuse to publish manuscripts that are not compatible with these guides. If rejected solely on that basis, however, the paper may be resubmitted for reconsideration when accompanied by a written verification that a committee on animal care in research has approved the experimental design and procedures involved.

### F. Third-party copyright

In order to reproduce any third party material, including tables, figures, or images, in an article authors must obtain permission from the copyright holder and be compliant with any requirements the copyright holder may have pertaining to this reuse. When seeking to reproduce any kind of third party material authors should request the following:

- i.) non-exclusive rights to reproduce the material in the specified article and journal;
- ii.) print and electronic rights, preferably for use in any form or medium;
- iii.) the right to use the material for the life of the work; and
- iv.) world-wide English-language rights.

It is particularly important to clear permission for use in both the print and online versions of the journal, and we are not able to accept permissions which carry a time

limit because we retain journal articles as part of our online journal archive. Further guidelines on clearing permissions can be found [here](#).

## G. Third-party content in Open Access papers

If you will be publishing your paper under an Open Access license but it contains material for which you do not have Open Access re-use permissions, please state this clearly by supplying the following credit line alongside the material:

*Title of content*

*Author, Original publication, year of original publication, by permission of [rights holder]*

## H. Conflict of interest

Oxford University Press requires declaration of any conflict of interest upon submission online. If the manuscript is published, conflict of interest information will be communicated in a statement in the published paper.

## I. Permissions regarding reuses of OUP material

### i.) Rights & Permissions

#### **Global Business Development and Rights:**

At Oxford University Press (OUP), it is a core part of our objective to encourage the widest possible dissemination of our journal content. We offer a comprehensive suite of licensing services to meet the needs of institutions, pharmaceutical and healthcare companies, and publishers worldwide.

Please see below for more information on the licensing options available. ii.) Permissions  
Permission for reuse or republication of Oxford Journals figures, abstracts, or articles, can be granted for a range of re-uses, including:

1. **Republication in a book/journal**
2. **eBook**
3. **PowerPoint presentation**
4. **Academic course packs**
5. **Thesis**

The fastest and most efficient way to obtain permission to reuse Oxford Journals content is by using our [Rightslink](#) automated permissions system. For details on how to obtain permission through the Rightslink permissions system please click [here](#).

If you are unable to secure the specific permissions you require through our Rightslink permissions system, or if you have any questions or queries about reusing material from Oxford Journals titles, please click here to contact us, providing as much information about your query as possible.

### iii.) Oxford Open – Open Access

Articles published under our [Oxford Open - Open Access](#) model are clearly labeled, and made freely available online immediately upon publication, without subscription barriers to access. In addition, the majority of articles that are made available under Oxford Open, will also allow readers to reuse, republish, and distribute the article in a variety of ways, depending upon the license used. For further detail on Oxford Open and the activities permitted under our Open Access licenses, please click [here](#).

iv.) STM Permissions Guidelines and signatories

A key part of our efforts to minimize the administration that is often involved in permission clearances while ensuring that any re-use of limited amounts of content from our journals is fair and the original source of the material fully attributed. It should be emphasized here that these are just guidelines (for further information please click [here](#)).

v.) Rights and permissions guidelines for Authors

For details of our Publication Rights policies and obtaining third party permission please download our [Guidelines for Author Permissions](#). Self- archiving policies are specific to each journal, but details of these policies and their terms and conditions can be found on the journals' homepage.

vi.) Translation rights

1. Reprints Reprints are powerful promotional tools, not only at industry-specific exhibitions, conferences and meetings, but also for sales representatives and medical professionals in the field. Content Ed Net is OUP's current authorised provider for translated article reprints for the pharma industry. For more information on how to obtain translation reprints for your market/territory, please contact us.
2. Local Excerpted editions Local Editions provide an excellent opportunity to disseminate important research to healthcare professionals who may not otherwise have access to Oxford Journals content. OUP currently licenses Local Edition rights in more than a dozen territories across the globe.

Publishing partners can select articles of interest to a specific market and distribute sponsored issues in the local language.

For more information on our translation licensing activities, please [contact us](#).

vii.) Business development – Digital licensing

OUP has an active digital licensing policy across our full range of journals and books. The Business Development group works to establish strategic partnerships and digital licensing relationships with companies all over the world. These activities are heavily focused on maximizing the dissemination, usage, and discoverability of Oxford content worldwide, while also incubating new business models and routes to market. To this end, the Business

**Development group licenses material into a wide range of digital platforms, including:**

1. **Online Aggregators**
2. **Mobile technologies**
3. **Discoverability services**
4. **Text Mining databases**
5. **Abstract and Indexing services**
6. **For more information or to discuss licensing OUP content, please [contact us](#).**

## **J. Self-archiving policy**

### **i.) Author's original version**

**The author's original version is defined here as the un-refereed author version of an article that is considered by the author to be of sufficient quality to be submitted for formal peer review by a second party. The author accepts full responsibility for the article, which may have a version number or date stamp and the content and layout is set out by the author.**

**Prior to acceptance for publication in the journal, authors retain the right to make their original version of the article available on their own personal website and/or that of their employer and/or in free public servers of original version articles in their subject area, provided that, upon acceptance, they acknowledge that the article has been accepted for publication as follows:**

*This article has been accepted for publication in [Journal Title] Published by Oxford University Press.*

### **ii.) Version of record**

**The version of record is defined here as a fixed version of the journal article that has been made available by OUP by formally and exclusively declaring the article "published". This includes any "early release" article that is formally identified as being published even before the compilation of a volume issue and assignment of associated metadata, as long as it is citable via some permanent identifier(s). This does not include any "early release" article that has not yet been "fixed" by processes that are still to be applied, such as copy-editing, proof corrections, layout, and typesetting.**

**Authors of *Oxford Open* articles are entitled to deposit their original version or the version of record in institutional and/or centrally organized repositories and can make this publicly available immediately upon publication, provided that the journal and OUP are attributed as the original place of publication and that correct citation details are given. Authors should also deposit the URL of their published article, in addition to the PDF version.**

**The journal strongly encourages *Oxford Open* authors to deposit the version of record instead of the original version. This will guarantee that**

the definitive version is readily available to those accessing your article from such repositories, and means that your article is more likely to be cited correctly.

Oxford Journals automatically deposits open access articles in PMC for the majority of journals participating in *Oxford Open*. For a list of journals involved and for the latest information on the status of PMC deposits for individual journals please see [journals which offer an open access model](#). In case of query please contact [Journals Permissions](#).

## K. Copyright

The Poultry Science Association, Inc. retains the copyright to all materials accepted for publication in the journal unless an Open Access license is selected. Authors will be asked to complete a Copyright Transfer Agreement following acceptance of their paper through the journal's Author Services website.

## L. Open Access

After your manuscript is accepted, the corresponding author will be required to complete a mandatory license to publish agreement. As part of the licensing process you will be asked to indicate whether or not you wish to pay for Open Access. If you do not select the open access option, your paper will be published with standard subscription- based access and you will only be charge page charges.

JAPR authors have the option to publish their paper under the [Oxford Open](#) initiative; whereby, for a charge, their paper will be made freely available online immediately upon publication.

### i.) Licenses

RCUK/Wellcome Trust/COAF funded authors publishing in *JAPR* can use the Creative Commons Attribution license (CC BY) for their articles.

All other authors may use a Creative Commons Non-Commercial license (CC BY-NC). Please click [here](#) for more information about Creative Commons licenses.

### ii.) Charges

The Open Access charges are as follows:

1. **PSA Members: \$1,500 (if at least one author is a current PSA member)**
2. **Standard charge: \$2,000**
3. **Reduced Rate Developing country charge\*: \$1,000**
4. **Free Developing country charge\*: \$0**

Visit our developing countries page ([here](#)) to view a list of qualifying countries.

**Authors can pay Open Access charges using our Author Services site. This will enable you to pay online with a credit/debit card, or request an invoice by email or mail.**

**Please note that if an author elects to publish Open Access, page charges do not apply. However, Open Access charges are in addition to any color charges that may apply. Orders from the UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from the rest of the European Union, OUP will assume that the service is provided for business purposes. Please provide a VAT number for yourself or your institution, and ensure you account for your own local VAT correctly.**

## III. Preparation of manuscript

### A. Manuscript format and structure/style

#### i.) General

**Papers must be written in English. The text and all supporting materials must use American spelling and usage as given in *The American Heritage Dictionary*, *Webster's Third New International Dictionary*, or the *Oxford American English Dictionary*. Authors should follow the style and form recommended in *Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers*. 2006. 7th ed. Style Manual Committee, Council of Science Editors, Reston, VA.**

#### ii.) Preparing the manuscript file

**Manuscripts should be typed double-spaced, with lines and pages numbered consecutively, using Times New Roman font at 12 points. All special characters (e.g., Greek, math, symbols) should be inserted using the symbols palette available in this font. Complex math should be entered using MathType from Design Science ([www.dessci.com](http://www.dessci.com)). Tables and figures should be placed in separate sections at the end of the manuscript (not placed within the text).**

**Metric or English units (or both) are acceptable. Authors should use units appropriate for the intended audience. Energy content of feeds will be expressed as calories.**

#### iii.) Headings

##### 1. Major headings

**Major headings are centered, boldface, in all capital letters, and consist of SUMMARY, DESCRIPTION OF PROBLEM, MATERIALS AND METHODS, RESULTS AND DISCUSSION, CONCLUSIONS AND APPLICATIONS, and REFERENCES AND NOTES.**

**Major headings in review articles, field reports, and symposium articles may vary from those listed here, but should include SUMMARY, CONCLUSIONS AND APPLICATIONS, and REFERENCES AND NOTES.**

##### 2. First subheadings

**First subheadings are boldface and italic, on a separate line beginning at the left margin, and have the first letter of each important word capitalized. Text that follows a first subheading should be in a new paragraph.**

##### 3. Second subheadings

**Second subheadings begin the first line of a paragraph. They are indented, boldface, italic, and followed by a period. The first letter**

of each important word is capitalized. The text follows immediately after the final period of the subheading.

iv.) Title page

The title should be indicative of the content. It should capture the interest of all who might benefit from information in the manuscript. However, the length of the title should be kept to a minimum. The running title should be 30 characters or less, including spaces.

Address and affiliation of authors (listed by first name or initials, middle initial, and last name) should be included. Indicate to whom correspondence should be directed by means of a footnote, with the notation "Corresponding author: (e-mail address)" at the bottom of the title page.

List 3 to 8 key words or phrases to identify the most important subjects covered by the paper.

Statement of primary audience. To determine appropriateness for the journal and to assist in selecting reviewers, the author should indicate clearly what sector(s) within the poultry community (e.g., flock supervisors, nutritionists, quality assurance personnel, researchers, plant managers, veterinarians) could benefit most from the content of this article.

v.) Summary

The Summary (maximum of 250 words) is not an abstract. It is intended to give readers with diverse backgrounds a general appreciation of the manuscript contents. It should be written so that even those not directly interested in the topic will enjoy reading at least this section to keep abreast of areas other than their own. This section should not include details of materials and methods or a detailed review of the results. Keep the summary free-flowing, giving the reader a general, not specific, idea of what the study revealed. Do not include reference citations in the summary.

vi.) Description of problem

This section will acquaint the reader with the problem, citing field experiences where appropriate. Readability is of utmost importance. Detailed literature reviews may not be appropriate for this section. A more extensive citation of references should be included in the Results and Discussion or References and Notes section. This section should end with a statement of the objective(s) of the study.

vii.) Materials and methods

The author(s) should clearly establish in the Materials and Methods section why the problem was approached in a particular way. The rationale for including each treatment should be clearly stated. Detailed laboratory and bird management procedures should be described in the References and Notes section and not in the Materials and Methods section. Sources of stock, equipment, and materials should be listed in the References and Notes section and referred to in text by citation number.

**A brief statement of the statistical methods should be included, with more detailed descriptions placed in the References and Notes section.**

**In manuscripts using several treatments, a description of treatments should be included as Table 1.**

**viii.) Results and discussion**

**This section begins with observed results and their interpretation. Descriptive subheadings may precede all major paragraphs and changes in subject emphasis. This section should discuss specifically how findings address the problem described in the Description of Problem section and how they are related to published works.**

**Statements regarding statistically significant differences between treatments in results should be included in the text, tables, and figures. Statements regarding differences should be avoided unless they are supported by statistical analyses and meet the stated level of probability (e.g.,  $P < 0.05$ ).**

**ix.) Conclusion and applications**

**Conclusions and recommendations of the author(s) should be listed numerically. Each statement should be clear, concise, and without discussion. Authors are encouraged to summarize their significant findings, to identify further research needs, and to describe the constraints, economics, and other factors associated with using the results in scientific or commercial applications. Do not include references in this section.**

**x.) References and notes (with Acknowledgements)**

**References and notes should be cited in text, by number within an editorial bracket (e.g., [1]). In the References and Notes section, citations should be listed in the order they appear and are numbered in the text (not alphabetically). Authors are encouraged to use reference management software (e.g., EndNote or Reference Manager) to facilitate renumbering or inserting references by the editor or inserting references during the revision process. Manuscripts may be returned to authors before review for renumbering of references if not cited in numerical order. Include details such as statistical analysis; detailed procedures; sources of birds, instruments, or items; details of designed instruments; a literature review; and other tangential matters.**

**Cite acknowledgments at the end of this section in a subsection called Acknowledgments. These entries are not numbered.**

**xi.) Sample references**

**1. Journal Article**

- 1. Dansky, L. M., and F. W. Hill. 1952. Application of the chromic oxide indicator method to balance studies with growing chicks. *J. Nutr.* 47:449–459.**
- 2. Snow, J. L., M. W. Douglas, and C. M. Parsons. 2003. Phytase**

effects on amino acid digestibility in molted laying hens. *Poult. Sci.* 82:474–477.

3. Witter, R. L., and I. M. Gimeno. 2006. Susceptibility of adult chickens, with and without prior vaccination, to challenge with Marek's disease virus. *Avian Dis.* 50:354–365. doi:10.1637/7498-010306R.1

2. Monograph

4. NRC. 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

3. Dissertation

5. Heskett, E. A. 2003. Efficacy of a recombinant herpes virus of turkeys vector vaccine, expressing genes to Newcastle disease virus and Marek's disease virus, in chickens and turkeys against exotic Newcastle disease virus challenge. PhD Diss. Univ. Florida, Gainesville.

4. Trade Publication

6. Wilgus, H. S. 1973. Temperature-programmed feeding schedules and other means of conserving protein in market turkey production. *Feedstuffs* 45(27):27–31.

5. Book or Chapter in Book

7. AOAC International. 2007. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 18th ed. Rev. 2. AOAC Int., Gaithersburg, MD.

8. Whittow, G. C. 1976. Regulation of body temperature. Pages 146–173 in *Avian Physiology*. P. Sturkie, ed. Springer-Verlag, New York, NY.

6. Proceedings

9. Hruby, M., J. C. Remus, and E. E. M. Pierson. 2004. Nutritional strategies to meet the challenge of feeding poultry without antibiotic growth promotants. Pages 3–5 in *Proc. 2nd Mid-Atlantic Nutr. Conf.*, Timonium, MD. Univ. Maryland, College Park.

7. Federal Register

10. USDA, Animal and Plant Health Inspection Service. 2004. Blood and tissue collections at slaughtering and rendering establishments, final rule. 9CFR part 71. *Fed. Regist.* 69:10137–10151.

8. Laboratory Procedure

11. The extract was added to 30 mL of hexane, made to 100 mL with 10% aqueous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

9. Personal Communication

12. Wilson, H. R. 2005. Univ. Florida, Gainesville. Personal communication.

**10. Proprietary Product**

- 13. Avizyme TX, Finnfeed International, Marlborough, Wiltshire, UK.**  
**14. Thymol, 99% purity, Acros Organics, Geel, Belgium.**

**11. Statistical Procedure**

**If a note has an embedded reference, the reference is cited by number (as in the text) or parenthetically within the note:**

**15. Data were analyzed by ANOVA with flock as the independent variable. When differences among flocks were significant, means were separated using Duncan's multiple range test (SAS User's Guide, 2001, Version 8 ed., SAS Institute Inc., Cary, NC). Pearson product-moment correlation coefficients were calculated between average percentage cracks from each flock recorded every week and average values for egg-specific gravity, breaking strength, percentage shell, shell thickness, and shell weight per unit of surface area. Significance implies  $P < 0.05$ .**

**12. Statistical Software**

**16. SAS User's Guide. 2001. Version 8 ed. SAS Inst. Inc., Cary, NC.**

**13. US Patent**

**17. El Halawani, M. E., and I. Rosenboim. 2004. Method to enhance reproductive performance in poultry. Univ. Minnesota, assignee. US Pat. No. 6,766,767.**

**14. Website**

**18. Dyro, F. M. 2005. Arsenic. WebMD. Accessed Feb. 2006.  
<http://www.emedicine.com/neuro/topic20.htm>.**

**15. Acknowledgments**

**19. The advice and technical assistance of Thomas Jones (affiliation, location) are acknowledged.**

**B. TABLES**

**Number tables consecutively according to the citation in the text. Tables must be created using the Microsoft Word table feature and inserted in the manuscript after the references section. Each table must be placed on a separate page and must have a clear descriptive heading so that the meaning of the data will be understandable without reference to the text. Indicate footnotes to tables with numbers, beginning with 1.**

**Statistical notation should be made with lowercase and uppercase superscript letters or with asterisks, as appropriate. Statistical notation should place the superscript "a" on the largest mean. Probability values may be indicated as follows:  $*P \leq 0.05$ ,  $**P \leq 0.01$ ,  $***P \leq 0.001$ , and  $\dagger P \leq 0.10$ . Consult a recent issue of the journal for examples of tables.**

## A. Miscellaneous usage notes

### i.) Abbreviations

**The following abbreviations may be used without definition in *JAPR*. Plurals do not require “s.” Chemical symbols and 3-letter abbreviations for amino acids do not need definition. Other abbreviations should be defined at first use in the summary and the main text, as well as in each table or figure in which they appear. Author-defined abbreviations are boldface at first use in the main text. Abbreviations should not be used in the manuscript title, running title, or to begin a paragraph or sentence. They can be used in section headings if previously defined. This list appears inside the back cover of each issue of the journal.**

**The following abbreviations may be used without definition in *JAPR*:**

**ADF acid detergent fiber**

**ADFI average daily feed intake**

**ADG average daily gain**

**AME apparent metabolizable energy**

**AMEn nitrogen-corrected apparent metabolizable energy**

**ANOVA analysis of variance**

**AOAC Association of Official Analytical Chemists**

**BSA bovine serum albumin**

**BW body weight**

**°C Celsius**

**cDNA complementary DNA**

**CF crude fiber**

**cfu colony-forming units (following a numeral)**

**CI confidence interval**

**CP crude protein**

**cpm counts per minute**

**CV coefficient of variation**

**d day**

**df degrees of freedom**

**DM dry matter**

**DNA deoxyribonucleic acid**

**EDTA ethylenediaminetetraacetate**

**EE ether extract**

**ELISA enzyme-linked immunosorbent assay**

**°F Fahrenheit**

**FCR feed conversion ratio**

**FE feed efficiency**

**ft foot**

**g gram**

**gal gallon**

**G:F gain-to-feed ratio**

**GLM** general linear model  
**h** hour  
**HEPES** N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid  
**HPLC** high-performance (high-pressure) liquid chromatography  
**ICU** international chick units  
**Ig** immunoglobulin  
**IL** interleukin  
**i.m.** intramuscular  
**in.** inch  
**i.p.** intraperitoneal  
**IU** international units  
**i.v.** intravenous  
**kcal** kilocalorie  
**L** liter (also capitalized with any combination, e.g., mL)  
**lb** pound  
**L:D** hours of light:hours of darkness in a photoperiod  
**LSD** least significant difference  
**m** meter  
**μ** micro  
**M** molar  
**ME** metabolizable energy  
**ME<sub>n</sub>** nitrogen-corrected metabolizable energy  
**MHC** major histocompatibility complex  
**mRNA** messenger ribonucleic acid  
**min** minute  
**mo** month  
**MS** mean squares  
**n** number of observations  
**NADH** reduced form of NAD  
**NDF** neutral detergent fiber  
**NRC** National Research Council  
**NS** not significant  
**PBS** phosphate-buffered saline  
**PCR** polymerase chain reaction  
**ppm** parts per million  
**r** correlation coefficient  
**r<sup>2</sup>** coefficient of determination, simple  
**R<sup>2</sup>** coefficient of determination, multiple  
**RH** relative humidity  
**RIA** radioimmunoassay  
**RNA** ribonucleic acid  
**rpm** revolutions per minute  
**s** second  
**SAS** Statistical Analysis System

**s.c.** subcutaneous  
**SD** standard deviation  
**SE** standard error  
**SEM** standard error of the mean  
**SNP** single nucleotide polymorphism  
**SRBC** sheep red blood cells  
**TBA** thiobarbituric acid  
**T cell** thymic-derived cell  
**TME** true metabolizable energy  
**TME<sub>n</sub>** nitrogen-corrected true metabolizable energy  
**TSAA** total sulfur amino acids  
**USDA** United States Department of Agriculture  
**UV** ultraviolet  
**vol/vol** volume to volume  
**vs.** versus  
**wt/vol** weight to volume  
**wt/wt** weight to weight  
**wk** week  
**yr** year

ii.) **SNP Nomenclature**

**The increasing number of SNP association studies and the improvements in chicken genome annotation require a standardized SNP nomenclature for unequivocal and correct SNP identification. Additionally, information regarding the SNP investigated should be easily accessible in a publicly available database. Therefore, all relevant SNP included in a study should be listed with their unique RefSNP (rs) or submitted SNP (ss) number (if rs number is not yet available) as indicated in the public domain NCBI dbSNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). If the SNP investigated do not yet have an entry in the NCBI dbSNP database, the authors of the manuscript are responsible for submitting all the required information to NCBI (see <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) for depositing the SNP into this database and obtaining a unique ss number for the SNP. In the text of the manuscript, use of the rs/ss number of the SNP or an alternative standardized nomenclature is recommended.**

## C. Figures/Illustrations

i.) **Permissions**

**All copyright permission must be cleared and, if necessary, paid for by the author; this includes applications and payments to DACS (Data Access Control System), ARS (Artists Rights Society), and similar licensing agencies where appropriate. It is also the author's responsibility to include acknowledgements as stipulated by particular institutions.**

[Download the permissions instructions here.](#)

## ii.) Requirements

**Submission of figures in an electronic format will help us to ensure that your work is produced to the highest possible standard. This page contains information on how best to prepare your artwork for electronic submission. Most figure file formats are acceptable, although TIFF is preferable. TIFFs (Tagged Image File Format) are used for bitmap, greyscale, and colour images. To save files in TIFF format, go to the 'Save As' or 'Export' commands under 'File'.**

**Before submitting artwork, please make sure that your image(s) fulfil the following criteria**

## iii.) Formats

**A number of different file formats are acceptable, including:**

1. **Tagged Image File Format (.tif)\* (please check settings when exporting to Tiff from the original application).**
2. **Encapsulated PostScript (.eps)\***
3. **Rich Text Format (.rtf)**
4. **(Editable) Microsoft Word (.doc/.docx) (image files embedded into Word are often not good quality).**
5. **(Editable) Microsoft PowerPoint (.ppt/.pptx) (image files embedded into PowerPoint are often not good quality).**
6. **Microsoft Excel (.xls/.xlsx)**
7. **editable Portable Document Format (PDF)**
8. **Postscript (.ps)**
9. **Photoshop (.psd)**
10. **Adobe Illustrator (.ai)**
11. **Graphics Interchange Format (.gif)**
12. **Portable Network Graphics (.png)**

**\*preferred file format. Note that .jpg is not a file format listed as files produced as JPGs condense every time they are opened (and thus lose quality).**

## iv.) A note about resolution and quality: PPI vs. DPI

1. **The quality of an image is not dependent upon DPI. Typically when an image is of low quality (even though the resolution is within standards), the image contains pixelated text. This means that the figure should be redrawn using a standard font and that care should be taken to ensure the font is embedded.**
2. **DPI pertains to the print version of the image; PPI to the online version. The compositor will take care to convert the accepted figure files accordingly. It is important to note that maximum size should be set at 1081 width by 1280 height for PPI / 600 DPI for line drawings and a minimum 300 DPI for colour or tone images.**

3. **Graphics downloaded from the Web are not acceptable for print reproduction. These graphics are low-resolution images (usually 72 dpi) that are suitable for screen display but far below acceptable standards for print reproduction.**
4. **Please take care that images you supply are not simply low resolution figures that have been expanded. These types of images will appear pixelated when maximised.**

v.) Specific types of artwork

1. **Bar graphs**  
**Avoid the use of gray or color in bar graphs. Instead, please use solid black, solid white, and patterned (e.g., horizontally or diagonally striped) bars.**
2. **Line art**  
**Line art is best reproduced when it is submitted as crisp black-and-white images and contains no unnecessary gray shading.**
3. **Patterns**  
**If your image requires the use of many lines (as line graphs often do), please choose patterns that are easily distinguished from each other. Patterns with similar characteristics are hard to differentiate after reduction.**  
**For additional useful information on preparing your figures for publication, go to <http://art.cadmus.com/da/index.jsp>.**
4. **Equations and tables**  
**All equations to be formatted using MathType only; image versions should be avoided.**  
**All tables to be in editable format in either Word or Excel; image and pdf versions should be avoided.**

vi.) Requirements

**Follow these rules for figures:**

1. **Number them consecutively following the sequence in which they are mentioned in the text.**
2. **Include scale bars where appropriate. These should not be placed in the legend.**
3. **Size figures for publication:**

Design	Page size	Page size in inches	No of columns	Required figure processing width	
				Single column (mm/in.)	Double column (mm/in.)
Large format	279 x 216 mm	10.98 X 8.50 in.	Double	90 mm/3.54 in.	180 mm/7.09 in.
Medium format	246 x 189 mm	9.68 X 7.44 in.	Double	80 mm/3.15 in.	160 mm/6.30 in.
Small format	234 x 156 mm	9.21 X 6.14 in.	Single	130 mm/5.12 in.	

#### 4. Figures must:

- **Be submitted for publication at resolutions of 600 dots per inch for line figures/black&white images and 300 dots per inch for half tones/color figures.**
- **Use the same font type for all figures; use standard fonts such as Times, Courier, Arial, Helvetica, or Symbol.**
- **Have embedded fonts. Embedding the fonts ensures that the text is retained within the figure during production.**
- **Have uniform lettering style and ensure that figure locants are consistently sized throughout. Figures will not be redrawn by the publisher.**
- **Have legends that define abbreviations and contain enough information so the figure can be understood independently of the text. Legends should be listed one after the other at the end of the main text document.**
- **Be converted to grayscale if originally created in color but intended to be printed in black and white BEFORE acceptance.**
- **Be saved in a separate file.**
- **Always use the latest version of the software program available. Files from older versions often lose integrity when opened in newer versions.**
- **Have layers flattened into one layer, if using any files consisting of layers (e.g., .eps).**
- **Be saved as clearly named files so that they can easily be identified in terms of manuscript, figure number, and format (e.g. [first authorsurname]Fig1.tif).**
- **Have figure legends/captions included at the end of the main text file. Please ensure that figures and figure legends/captions are in agreement. Symbols must NOT be included in figure legends; ALL symbols used in figures should be described in**

the legend/caption using words (e.g., filled triangle, open circle). Symbols may be used in the key within the figure artwork.

- **Have line weights between 0.35 pt and 1.5 pt; if there are multiple lines in use, use patterns to differentiate them. Do not use lines that are thinner than 2 points, including the “hairline” width option in some programs.**
- **Have colour supplied in CMYK and not RGB. Please note that the use of red and green in figures is particularly problematic for approximately 5% of the male population. Advice on the preparation of colour-friendly figures is provided at [http://jfly.iam.u-tokyo.ac.jp/html/manuals/pdf/color\\_blind.pdf](http://jfly.iam.u-tokyo.ac.jp/html/manuals/pdf/color_blind.pdf).**
- **Have all data included within the illustration area.**
- **Avoid placing labels over a shaded area of the image.**

#### **D. Supplementary data**

**Submit all material to be considered as Supplementary Material online at the same time as the main manuscript. Ensure that the supplementary material is referred to in the main manuscript at an appropriate point in the text. Supplementary material will be available online only and will not be copyedited, so ensure that it is clearly and succinctly presented, and that the style conforms to the rest of the paper. Also ensure that the presentation will work on any Internet browser. It is not recommended for the files to be more than 2 MB each, although exceptions can be made at the editorial office’s discretion.**

## IV. Charges

### A. Open Access charges

**After your manuscript is accepted, the corresponding author will be required to complete a mandatory license to publish agreement. As part of the licensing process you will be asked to indicate whether or not you wish to pay for Open Access. If you do not select the open access option, your paper will be published with standard subscription-based access and you will only be charge page charges.**

*JAPR* authors have the option to publish their paper under the [Oxford Open initiative](#); whereby, for a charge, their paper will be made freely available online immediately upon publication.

#### i.) Licenses

**RCUK/Wellcome Trust/COAF funded authors publishing in *JAPR* can use the Creative Commons Attribution license (CC BY) for their articles. All other authors may use a Creative Commons Non-Commercial license (CC BY-NC). Please click [here](#) for more information about Creative Commons licenses.**

#### ii.) Charges

**The Open Access charges are as follows:**

- 1. PSA Members: \$1,500 (if at least one author is a current PSA member)**
- 2. Standard charge: \$2,000**
- 3. Reduced Rate Developing country charge\*: \$1,000**
- 4. Free Developing country charge\*: \$0**

**\*Visit our developing countries page ([here](#)) to view a list of qualifying countries.**

**Authors can pay Open Access charges using our Author Services site. This will enable you to pay online with a credit/debit card, or request an invoice by email or mail.**

**Please note that if an author elects to publish Open Access, page charges do not apply. However, Open Access charges are in addition to any color charges that may apply.**

**Orders from the UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from the rest of the European Union, OUP will assume that the service is provided for business purposes. Please provide a VAT number for yourself or your institution, and ensure you account for your own local VAT correctly.**

## **B. Conventional page charges**

**The current charge for publication is \$60 per printed page (or fraction thereof) in the journal if at least one author is a professional member of PSA. If no author is a member of PSA, the publication charge is \$85 per journal page.**

**The corresponding author shall be financially responsible for insuring payment of relevant page charges in a timely manner. The Editorial Office reserves the right to deny further publication to the corresponding author until such time as payment is received.**

**Waivers of page charges must be requested in advance of submission and will only be considered from authors from the approved list of developing countries found [here](#).**

## **C. Color changes**

**The cost to publish in color in the print journal is \$600 per color image. Color versions of figures will be included in the online PDF and full-text article at no charge.**

## V. Additional information about accepted manuscripts

### A. Charges

For charges relating to publication in *JAPR* please click [here](#).

### B. Proofs

Authors will receive a link to the PDF proof of their manuscript on our online system by email, and it is essential that a current email address is supplied with all manuscripts. Proofing instructions will accompany the PDF file but the proof should be checked immediately upon receipt and uploaded in accordance with covering instructions. Only essential corrections should be made at the proof stage.

### C. Advance access

For *JAPR*, manuscripts arrive at OUP and go through the production process until the final versions are ready to publish. These are then published on the journal's [Advance Access](#) page: <https://academic.oup.com/japr/advance-access>. They will remain on the page up until the issue that they are assigned to is published.

### D. Offprints

All contributors of published articles will have free online access to the PDF and HTML version of their article, to which links can be created from an institutional or firm website.

Authors of accepted articles can order paper offprints during the publication process. All authors are sent an individual link (after acceptance) to the Author Services site, where they are able to order offprints and single issues.

### E. CrossRef Funding Data registry

In order to meet your funding requirements authors are required to name their funding sources, or state if there are none, during the submission process. For further information on this process or to find out more about the CHORUS initiative please click [here](#).