

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E IMUNOLÓGICA DA MUCOSA  
INTESTINAL DE AVES TRATADAS COM *Lactobacillus* spp. E  
DESAFIADAS COM *Salmonella* ENTERITIDIS.**

**ADRIANO SAKAI OKAMOTO**

**BOTUCATU – SP  
Novembro/2005**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E IMUNOLÓGICA DA MUCOSA INTESTINAL  
DE AVES TRATADAS COM *Lactobacillus* spp. E DESAFIADAS COM *Salmonella*  
ENTERITIDIS.**

**ADRIANO SAKAI OKAMOTO**

Dissertação apresentada à Faculdade  
de Medicina Veterinária e Zootecnia da  
Universidade Estadual Paulista–UNESP  
“Julio de Mesquita Filho”, *Campus* de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: **Prof. Ass. Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho**

**BOTUCATU  
2005**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Okamoto, Adriano Sakai.

Avaliação histopatológica e imunológica da mucosa intestinal de aves tratadas com *Lactobacillus spp.* e desafiadas com *Salmonella* Enteritidis / Adriano Sakai Okamoto. – 2005.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2005.

Orientador: Raphael Lucio Andreatti Filho

Assunto CAPES: 50501062

1. Microbiologia veterinária
2. Aves domésticas - Doenças

CDD 636.5089607

Palavras-chave: Aves, histopatologia, *Lactobacillus*, *Salmonella*, IgA.

**ADRIANO SAKAI OKAMOTO**

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E IMUNOLÓGICA DA MUCOSA INTESTINAL  
DE AVES TRATADAS COM *Lactobacillus* spp. E DESAFIADAS COM *Salmonella*  
ENTERITIDIS.**

**Banca Examinadora:**

---

1º Examinador

---

2º Examinador

---

3º Examinador

Botucatu, 08 de dezembro de 2005.

Ao  
meu filho HUGO HIDEO,  
pelas alegrias, amor e paz  
que, mesmo sem saber, me proporcionou,

À minha esposa ELUANE,  
companheira inseparável de todas as lutas,  
pela dedicação, amor e compreensão,

Aos meus pais TERUO OKAMOTO e  
RACHEL SAKAI OKAMOTO,  
pelo amor e por tudo que me ensinaram,

Ao meu orientador prof. RAPHAEL ANDREATTI,  
pela oportunidade e confiança  
na realização desse projeto,

**DEDICO.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todas as pessoas que, de alguma forma, me ajudaram a subir mais um degrau em minha vida.

Às profissionais Médicas Veterinárias Aline L. Mesquita, Silvia Maria Almeida e Edna Tereza de Lima, pelo apoio, disponibilidade e colaboração durante a realização dos experimentos.

Ao professor João Pessoa Araújo Júnior, pelos ensinamentos e acompanhamento na padronização do ELISA.

Aos professores Germano Francisco Biondi (Inspeção), Semíramis G. Ferraz Viana (Parasitologia - IB), e Renée Laufer Amorin (Patologia Veterinária) pela atenção, ensinamentos e disposição dos aparelhos: leitor de ELISA, sonificador e analisador de imagens.

Ao professores da Patologia Veterinária Noeme Sousa Rocha e Julio Lopes Sequeira, pela ajuda e atenção prestada nos momentos de dúvidas.

Ao professor Adalberto José Crocci do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências – Unesp Botucatu, pelo auxílio na análise estatística.

Ao serviço da Biblioteca da UNESP – Campus de Botucatu, em especial às pessoas Rosimary Cristina da Silva (Meire), Selma Maria de Jesus e Luciana Pizzani, pela orientação das referências bibliográficas e confecção da ficha catalográfica.

À seção de Pós Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Campus de Botucatu, nas pessoas dos funcionários Denise A. Fioravante Garcia, Maria Regina T. Forlin e Maria A. Manuel, por serem sempre atenciosas e prestativas.

Aos amigos e colegas residentes e pós-graduandos da patologia e ornitopatologia.

Aos funcionários da Patologia Veterinária (Mauri e Noel), por serem sempre prestativos e amigos.

À pós-graduanda Gláucia Helaine de Oliveira da UNESP de Jaboticabal, pela atenção prestada e ensinamentos.

Ao amigo Raphael Lucio Andreatti Filho, pelos ensinamentos e conselhos.

À amiga Edna Tereza de Lima, pela verdadeira amizade.

À amiga Sandra Bassani, pela grande pessoa que é.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Botucatu, pela acolhida e oportunidade concedida para realização da Residência Médica Veterinária e o Mestrado.

A FAPESP, pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

À Agropecuária Céu Azul, na pessoa do Dr. Sandro Roberto Del Bem, pelo fornecimento de aves para realização do projeto piloto.

A todos funcionários e amigos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu.

## LISTA DE TABELAS

	<b>página</b>
<b>TABELA 1.</b> Unidades formadoras de colônia (UFC) no tratamento com <i>Lactobacillus</i> spp. e desafio com <i>Salmonella</i> Enteritidis em cada grupo experimental . . . . .	<b>20</b>
<b>TABELA 2.</b> Detecção de imunoglobulina A (IgA) no fluído intestinal de aves tratadas com <i>Lactobacillus</i> spp. e desafiadas com <i>Salmonella</i> Enteritidis. Resultados expressos em coeficiente ELISA . . . . .	<b>27</b>
<b>TABELA 3.</b> Quantidade de <i>Salmonella</i> Enteritidis nos cecos de aves tratadas com <i>Lactobacillus</i> spp. e desafiadas. Medianas das unidades formadoras de colônia (UFC) em cada tratamento e momento de coleta . . . . .	<b>29</b>
<b>TABELA 4.</b> Medida das vilosidades do duodeno ( $\mu\text{m}$ ) de aves tratadas com <i>Lactobacillus</i> spp. e desafiadas com <i>Salmonella</i> Enteritidis. Médias das vilosidades em cada tratamento e momento de coleta . . . . .	<b>30</b>
<b>TABELA 5.</b> Índice de aves infectadas por <i>Salmonella</i> Enteritidis em cada tratamento e momento de coleta. Resultados expressos em número de aves infectadas/número de aves desafiadas (percentual) . . . . .	<b>31</b>
<b>TABELA 6.</b> Média do peso corporal das aves tratadas com <i>Lactobacillus</i> spp. e desafiadas com <i>Salmonella</i> Enteritidis em cada tratamento e momento de coleta. Resultados expressos em gramas . . . . .	<b>32</b>
<b>TABELA 7.</b> Exame histopatológico do duodeno de aves tratadas com <i>Lactobacillus</i> spp. e desafiadas com <i>Salmonella</i> Enteritidis em cada tratamento e momento de coleta. Somatória das lesões observadas em oito repetições . . . . .	<b>34</b>

## LISTA DE GRÁFICOS

	<b>página</b>
<b>GRÁFICO 1.</b> Detecção de Imunoglobulina A (IgA) no fluído intestinal das aves. Médias dos coeficientes ELISA em cada tratamento e momento de coleta. ....	<b>28</b>
<b>GRÁFICO 2.</b> Medida das vilosidades intestinais (duodeno) de aves tratadas com <i>Lactobacillus</i> spp. e desafiadas com <i>S. Enteritidis</i> . Média ( $\mu\text{m}$ ) de oito repetições em cada tratamento e momento de coleta. ....	<b>31</b>
<b>GRÁFICO 3.</b> Peso corporal das aves tratadas com <i>Lactobacillus</i> spp. e desafiadas com <i>S. Enteritidis</i> . Média (gramas) de oito repetições em cada tratamento e momento de coleta. ....	<b>33</b>

## LISTA DE FIGURAS

	página
<b>FIGURA 1.</b> Medida do comprimento de vilosidade ( $\mu\text{m}$ ) do duodeno (HE-50X) .....	22
<b>FIGURA 2.</b> Congestão moderada dos vasos da lâmina própria (setas 1) e edema moderado subepitelial (setas 2) em vilosidade duodenal de aves com 28 dias de idade, tratadas com <i>Lactobacillus</i> spp. e desafiadas com <i>S. Enteritidis</i> no terceiro e 21 <sup>o</sup> dia (grupo A) (HE-200X). .....	35
<b>FIGURA 3.</b> Necrose e hemorragia difusas na mucosa duodenal de aves com 28 dias de idade, tratadas com <i>Lactobacillus</i> spp. e desafiadas com <i>S. Enteritidis</i> no 21 <sup>o</sup> dia (grupo C) (HE-200X).....	36
<b>FIGURA 4.</b> Necrose moderada (seta 1) e edema acentuado subepitelial (seta 2) em vilosidade duodenal de aves com 21 dias de idade, tratadas com <i>Lactobacillus</i> spp. e desafiadas com <i>S. Enteritidis</i> no terceiro dia (grupo B) (HE-200X).....	37
<b>FIGURA 5.</b> Necrose acentuada (setas) em vilosidade duodenal de aves com 28 dias de idade, tratadas com <i>Lactobacillus</i> spp. e desafiadas com <i>S. Enteritidis</i> no 21 <sup>o</sup> dia (grupo C) (HE-200X).....	38
<b>FIGURA 6.</b> Acúmulo de material necrótico (seta) no lúmen duodenal de aves com 21 dias de idade, tratadas com <i>Lactobacillus</i> spp. e desafiadas com <i>S. Enteritidis</i> no terceiro e 21 <sup>o</sup> dia (grupo A) (HE-400X). .....	39

## LISTA DE ABREVIações

IgA.....	Imunoglobulina A
EC.....	Exclusão Competitiva
ELISA.....	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
HE.....	Hematoxilina e Eosina
AVB.....	Ágar Verde Brilhante
MRS.....	De Man Rugosa Sharpe
BHI.....	Infusão Cérebro Coração
UFC.....	Unidade Formadora de Colônias
Nal.....	Ácido Nalidíxico
Rif.....	Rifampicina
PBS.....	Solução salina fosfatada tamponada
PBST.....	PBS acrescido de solução TWEEN
BSA.....	Albumina de Soro Bovino
DMSO.....	Dimetil Sulfóxido
HCl.....	Ácido Clorídrico
DO.....	Densidade Óptica
S.....	<i>Salmonella</i>
L.....	<i>Lactobacillus</i>
L.....	Tratamento com <i>Lactobacillus</i> spp.
L+S 3/21.....	Tratamento com <i>Lactobacillus</i> spp. e desafio com <i>Salmonella</i> Enteritidis no terceiro e 21º dia de idade das aves.

L+S 3 ..... Tratamento com *Lactobacillus* spp. e desafio com *Salmonella* Enteritidis no terceiro dia de idade das aves.

L+S 21..... Tratamento com *Lactobacillus* spp. e desafio com *Salmonella* Enteritidis no 21º dia de idade das aves.

S 3/21 ..... Desafio com *Salmonella* Enteritidis no terceiro e 21º dia de idade das aves.

Controle ..... Sem tratamento e sem desafio.

## SUMÁRIO

### Páginas

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE TABELA	
LISTA DE GRÁFICO	
LISTA DE FIGURA	
LISTA DE ABREVIACÕES	
1. INTRODUÇÃO .....	02
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
2.1. Salmonelose e Saúde Pública.....	05
2.2. Probiótico – <i>Lactobacillus</i> .....	08
2.3. Imunologia.....	11
3. OBJETIVOS .....	16
3.1. Gerais.....	16
3.2. Específicos .....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	18
4.1. Local.....	18
4.2. Aves .....	18
4.3. Amostras de <i>Lactobacillus</i> .....	18
4.4. Amostras de <i>Salmonella</i> Enteritidis .....	19
4.5. Inóculo de <i>Lactobacillus</i> .....	19
4.6. Inóculo de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	19
4.7. Delineamento Experimental .....	20
4.8. Contagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	21
4.9. Processamento das Amostras e Medida do Comprimento das Vilosidades .....	21
4.10. Coleta do Fluido de Lavagem Intestinal .....	22
4.11. Extração do Antígeno para o Teste ELISA.....	23
4.12. Reação ELISA.....	23
4.13. Análise Estatística .....	24
5. RESULTADOS .....	26
5.1. Detecção de Imunoglobulina A (IgA) .....	26

5.2. Contagem Cecal de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	28
5.3. Medida de Vilosidade Intestinal .....	29
5.4. Índice de Aves Infectadas .....	31
5.5. Pesagem das Aves.....	32
5.6. Exame Histopatológico .....	34
6. DISCUSSÃO .....	42
7. CONCLUSÕES .....	49
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	51

**OKAMOTO, A. S. Avaliação histopatológica e imunológica da mucosa intestinal de aves tratadas com *Lactobacillus* spp. e desafiadas com *Salmonella* Enteritidis. Botucatu, 2002, 66p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.**

**RESUMO:**

Este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a capacidade protetora de *Lactobacillus* spp. em frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis, utilizando-o como tratamento no primeiro dia de idade, e posterior desafio com *Salmonella* Enteritidis fagotipo 04, observando-se possíveis alterações histopatológicas e imunológicas na mucosa intestinal, como o comprimento das vilosidades, a produção de imunoglobulina A e o peso corporal. Foi observada maior eficácia do tratamento com *Lactobacillus* spp. somente quando as aves foram desafiadas com *Salmonella* Enteritidis aos 21 dias de idade. O comprimento das vilosidades intestinais apresentou-se reduzido após os desafios, mostrando posterior regeneração. Com o desafio de *Salmonella* Enteritidis ocorrendo no terceiro dia de idade, verificou-se que aves jovens possuem maior sensibilidade à infecção.

*Palavras-chave:* Aves, histopatologia, *Lactobacillus*, *Salmonella*, IgA.

**OKAMOTO, A. S. Histopathological and immunological evaluation of the intestinal mucosa of chickens treated with *Lactobacillus* ssp. and challenged with *Salmonella* Enteritidis. Botucatu, 2002, 66p, Masters dissertation – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.**

#### **ABSTRACT**

This study was driven with the objective of evaluate the protective capacity of *Lactobacillus* spp. in chickens challenged with *Salmonella* Enteritidis, utilizing as handling on one-day old chicks and posterior challenge with *Salmonella* Enteritidis phagotype 04, observing possible histopathological and immunological alterations in the intestinal mucosa, like the length of the villus, the production of immunoglobulin A and body weight. Greater efficacy in the treatment with *Lactobacillus* ssp. was observed only when the chicks were challenged with *Salmonella* Enteritidis at 21 days old. The length of the intestinal villus always diminished after challenge, regenerating later. After the first challenge of with *Salmonella* Enteritidis (at three-days old), we verified that young chicks possess a greater sensibility to infection.

**Key words:** chickens, histopatology, *Lactobacillus*, *Salmonella*, IgA.

“Todos os homens desejam  
por natureza saber”  
(Aristóteles)

## INTRODUÇÃO

---

---

## 1. INTRODUÇÃO

Com o crescente avanço tecnológico da indústria avícola e o aumento do consumo de produtos de origem aviária, muitos países aumentaram sua produção e exportação de carne de frango. O Brasil cada vez mais se destaca entre esses países, posicionando-se como um dos maiores produtores e exportadores mundiais de carne de frango.

Com o aumento da produção de produtos de origem aviária, cresceram também as doenças que acometem as aves, principalmente aquelas que podem ocorrer em qualquer fase do ciclo de produção avícola. Uma dessas doenças é a salmonelose, visto que produtos avícolas são costumeiramente relacionados aos surtos de infecção alimentar observados mais recentemente. As salmonelas paratífóides podem não causar doença clínica em aves, mas deixam-nas como portadoras, eliminando as bactérias nas fezes por longos períodos, e contaminando assim os aviários e abatedouros. Existem mais de 2.500 sorotipos de *Salmonella*, sendo que a espécie de grande importância atualmente em saúde pública é *S. Enteritidis*.

A suscetibilidade das aves à colonização intestinal por *Salmonella* spp. é maior durante os primeiros dias de vida, sendo posteriormente reduzida, à medida em que há o desenvolvimento da microbiota intestinal normal. Esta proteção exercida pela microbiota é denominada exclusão competitiva (EC). Define-se EC como o conjunto de fatores exercido e/ou estimulado por bactéria intestinal benéfica, que iniba, de alguma forma, a instalação e/ou multiplicação de bactéria patogênica. Os fatores de inibição da EC podem ser por meio da competição por nutrientes e sítios de ligação, estimulação do sistema imune celular e humoral, e produção de bacteriocinas, dentre outros.

Após a estimulação do sistema imune pela microbiota normal, ocorre a prevenção da adesão bacteriana na mucosa intestinal, através do aumento dos anticorpos IgA e oligossacarídeos bloqueando seus receptores.

Diversos produtos estão sendo desenvolvidos para este fim, sendo chamados de probiótico e/ou produto de exclusão competitiva. O primeiro é formado por uma ou mais cepas de bactérias previamente identificadas e testadas quanto ao seu “efeito protetor e de benefícios nutricionais”, enquanto que o segundo é composto

por várias bactérias associadas que agem conjuntamente, beneficiando o hospedeiro por inibir a multiplicação e aderência de bactérias patogênicas por meio dos vários fatores da EC. Os probióticos, ou produtos de exclusão competitiva estão cada vez mais sendo empregados, devido à exigência crescente dos consumidores por alimentos saudáveis e livres de resíduos. Com o uso desses produtos na avicultura, a tendência em diminuir os resíduos nos produtos aviários e a resistência bacteriana, devido a diminuição do uso de antibióticos na ração como promotores de crescimento, vem aumentando gradativamente.

Este estudo teve como propósito verificar a ação protetora exercida pelos *Lactobacillus* spp. frente ao desafio com *Salmonella* Enteritidis, tendo em vista a freqüente presença de *Salmonella* spp. em surtos de infecção alimentar, e a necessidade de uma via alternativa à prevenção das salmoneloses nos plantéis avícolas.

“Sempre que possível, as nossas notícias  
devem ser mensageiras de paz e  
otimismo, esperança e alegria”  
(Chico Xavier)

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

---

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A constante evolução técnica pela qual passa a avicultura industrial tem possibilitado a obtenção de produtos avícolas de baixo custo, saudáveis e altamente nutritivos (ANDREATTI FILHO & SAMPAIO, 1999). Segundo Machado (2000), este desenvolvimento ocorreu após a segunda guerra mundial, representando uma fonte alternativa de proteína animal de fácil e rápida produção em pequenas áreas.

As exportações brasileiras de carne de frango em abril de 2002 totalizaram 102,84 mil toneladas, gerando receitas de US\$ 92,86 milhões. Em relação ao mesmo período do ano anterior, em volume, as exportações foram incrementadas em 3,12% (EDITORA SAFRAS, 2002).

### 2.1. Salmonelose e Saúde Pública:

Com a grande expansão da indústria avícola, a salmonelose tornou-se fator limitante na criação de aves, adquirindo importância relevante, pois as perdas econômicas estão presentes em todas as fases, ou seja, da produção ao consumo dos produtos de origem aviária. Salmonelose é o termo que designa um grande grupo de doenças aviárias agudas ou crônicas, causadas por um ou mais membros do gênero *Salmonella* (GAST, 1997). As salmonelas são bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. São bastonetes curtos (0,7 – 1,5  $\mu$  / 2,0 – 5,0  $\mu$ ), móveis, com flagelos peritríquios, sendo alguns imóveis. São aeróbios e anaeróbios facultativos, fermentam açúcares com produção de gás, catalase positiva, oxidase negativa, e produzem H<sub>2</sub>S. As salmonelas possuem uma complexa constituição antigênica (antígenos somático “O”, flagelar “H” e capsular “K”) (HOLMES & GROSS, 1990; HOLT et al., 1994; GAST, 1997; BARROW, 2000)

Atualmente, os sorotipos não têm sido escritos em itálico e sim na forma proposta por POPOFF et al. (1996), onde o gênero *Salmonella* é apresentado em duas espécies: *Salmonella enterica*, e *Salmonella bongori*. Assim, a designação de *Salmonella enteritidis* passa a ser escrita como *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis, ou de forma simplificada *Salmonella* Enteritidis.

Segundo Gast (1997) e Tood (1997), a grande incidência de toxinfecção alimentar em humanos se deve à ingestão de produtos de origem aviária contaminados e/ou indevidamente preparados, visto que as aves são reservatórios de *Salmonella* spp. Embora aves adultas sejam relativamente resistentes à invasão sistêmica, pode ocorrer a colonização do trato digestivo na ausência de doença. Normalmente a doença clínica é observada em pintinhos quando infectados logo após o nascimento (BARROW, 2000). Experimentalmente, BARROW (1991) observou que cepas de *S. Enteritidis* variam consideravelmente na capacidade de causar doença sistêmica em aves recém-nascidas, com mortalidade de zero a 100%. A infecção por *Salmonella* em aves pode ser de três tipos: infecção do sistema retículo-endotelial, com pouco ou nenhum envolvimento intestinal e causada por sorotipos invasivos; infecção do sistema retículo-endotelial, com extensa colonização intestinal provocando doença sistêmica com excreção fecal e determinada também por sorotipos invasivos, e uma extensa colonização intestinal provocada por sorotipos não invasivos (BARROW, 1995; ZHANG-BARBER et al., 1999).

A *Salmonella* Enteritidis pode ser transmitida para os ovos através da infecção do oviduto, resultando na contaminação da albumina e contaminação dos ovos durante sua formação (DESMIDT et al., 1997). Há também a possibilidade de ovos se tornarem contaminados após a formação da casca pelo contato com fezes contaminadas na cloaca ou mesmo no ambiente (McILROY et al., 1989).

Estes microrganismos colonizam o trato intestinal das aves, sendo excretados nas fezes e entrando na cadeia alimentar humana (UNIVERSITY..., 2001). Alguns sorotipos são mais restritos ao trato intestinal, enquanto outros são capazes de invadir a corrente circulatória, podendo desencadear septicemia (COOPER, 1994; BERCHIERI Jr & BARROW, 1995).

A invasão do epitélio intestinal ocorre via superfície apical, quando a *Salmonella* induz à ruptura e o afastamento das microvilosidades, provocando a endocitose e migrando através da célula. Acredita-se que a invasão ocorra por um receptor mediador de endocitose, embora esses receptores não tenham sido identificados. A complexidade do mecanismo de invasão da *Salmonella* mostra sua alta capacidade de invadir diferentes tipos de células (FINLAY & FALKOW,

1989; LAX et al., 1995; CHADFIELD et al., 2003). A *Salmonella* migra da submucosa para tecidos linfáticos e é ingerida por células fagocíticas do sistema imune por um mecanismo desconhecido. A seguir, alcança a corrente sanguínea, e posteriormente, o fígado, baço e medula óssea. Nesse estágio ocorre a multiplicação, que dependerá da cepa de *Salmonella* e da resistência genética do hospedeiro (HORMAECHE et al., 1993). Durante a infecção sistêmica as salmonelas interagem com macrófagos e fagócitos polimorfonucleares, sendo a habilidade para se multiplicar dentro destas células um pré-requisito para virulência (MASTROENI et al., 1995).

A patogenicidade das salmonelas depende de uma série de fatores associados à bactéria, à ave e às condições de criação. A associação e a penetração da bactéria na mucosa digestiva é um pré-requisito para a infecção sistêmica, onde outras células são invadidas (BARROW, 1995; RYCHLIK et al., 1998).

O paratifo aviário não tem agente específico. Excetuando-se os agentes do tifo aviário e da pulrose, todos os demais sorotipos de *Salmonella* podem causar o paratifo. *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* causam salmoneloses em aves com maior frequência que outros sorotipos (SNOEYENBOS, 1991). Embora aves adultas sejam relativamente resistentes à multiplicação sistêmica, ocorre a colonização do trato digestivo na ausência da doença. Independente da presença de manifestações clínicas, os sorotipos relacionados com o paratifo aviário estão associados a casos de infecção alimentar no homem (BARROW, 1999, 2000). A *Salmonella Typhimurium*, além de sua importância em saúde pública, é responsável por surtos de infecção alimentar causados por cepas com múltipla resistência a antibióticos e fermentadoras de lactose. Esta última característica dificulta o diagnóstico da doença, o que ressalta ainda mais a importância das pesquisas que visem a prevenir a disseminação da salmonelose (MCDONOUGH et al., 2000).

O sorotipo de maior significância em saúde pública é o da *Salmonella Enteritidis* (POPPE, 1994), intrinsecamente relacionado com infecção alimentar por ovos e seus derivados (SMITH, 1989). No Brasil, significativo aumento de *S. Enteritidis* foi detectado a partir de 1993, tornando-se, desde 1994, o sorotipo de *Salmonella* mais frequentemente isolado de casos de infecções humanas, e

também de materiais de origem não humana, principalmente de alimentos destinados ao consumo humano. O Instituto Adolfo Lutz (I.A.L.) analisou 5.490 cepas de *Salmonella* isoladas de 1991 a 1995, provenientes de infecções humanas (2254 cepas) e de materiais de origem não humana (3236 cepas), e evidenciou aumento significativo na participação da *S. Enteritidis*. Assim, em 1991 este sorotipo correspondeu a 1,2% das cepas de *Salmonella* isoladas, 2% em 1992, 10,1% em 1993, 43,3% em 1994, e 64,9% em 1995. Este aumento verificado a partir de 1993 esteve associado à ocorrência de surtos de diarreia veiculados por alimentos (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS, 2001). Em muitos casos, a *S. Enteritidis* determina uma doença auto limitante, mas, particularmente em crianças e idosos, pode ser grave o suficiente para requerer internamento hospitalar, por se tornar invasiva e causar a morte (GREIN et al., 1997). A variação entre as cepas pode afetar a resposta imune, quanto à infectividade e à invasão (GAST, 1998). A transmissão de agentes infecciosos dentro de uma população é uma das preocupações em saúde pública (SALMONELLA..., 2002).

Para agravar a situação da salmonelose no cenário mundial, passaram a ser relatados nos EUA, surtos de infecção alimentar com amostras resistentes a vários antibióticos, como a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfas e tetraciclina (CODY et al., 1999; VILLAR et al., 1999). O relato de surto na Dinamarca caracterizou-se por reduzida eficácia das fluorquinolonas no tratamento dos pacientes, além das cinco drogas citadas anteriormente (MOLBAK et al., 1999).

O desenvolvimento racional e o aumento da produtividade avícola podem ser obtidos pela aplicação de medidas veterinárias destinadas a proteger e melhorar o nível das saúdes pública e animal, sendo necessário também impedir e reduzir, através de medidas de controle adequadas, o aparecimento de zoonoses transmitidas através de alimentos de origem animal, em especial as que constituam uma ameaça para a saúde humana (DIRECTIVA..., 1992).

## **2.2. Probióticos – *Lactobacillus*:**

A microbiota intestinal das aves é composta de inúmeras espécies bacterianas, formando um sistema complexo e dinâmico, responsável por

influenciar decisivamente em fatores microbiológicos, imunológicos, fisiológicos e bioquímicos no hospedeiro, podendo ser modulada pela composição da dieta (TANNOCK, 1998). A formação desta microbiota se dá imediatamente após o nascimento, e aumenta durante as primeiras semanas de vida (MACHADO, 2000). Microbiota normal são aqueles microrganismos que se encontram habitualmente na superfície das mucosas sadias (BARBÉS, 2001).

O efeito protetor da microbiota intestinal contra a colonização por patógenos é conhecido há muitos anos e tem sido amplamente aceito (PARRA, 1994). Esta habilidade de proteção, conhecida como exclusão competitiva (EC), foi primeiramente descrita pelo professor Esko Nurmi na Finlândia, em 1973 (NURMI & RANTALA, 1973). EC é a incapacidade de uma população de microrganismos em se estabelecer no intestino, em razão da presença de outra população bacteriana (DAY, 1992).

Os produtos de EC são originados do cultivo integral da microbiota intestinal, enquanto probióticos são constituídos por um ou mais componentes previamente identificados (FULLER, 1989). Uma maior compreensão do funcionamento da microbiota intestinal é necessária, visto que sua ação interfere, diretamente, na saúde geral do hospedeiro (TANNOCK, 1998).

Lilly & Stillwell (1965) citaram o termo “probiótico” para descrever qualquer substância ou organismo que contribuísse em manter o equilíbrio microbiano intestinal. Posteriormente, Fuller (1989) descreveu probiótico como sendo um suplemento alimentar microbiano vivo que beneficia o hospedeiro animal com melhoria do balanço microbiano intestinal. Para Schaafsma (1996) probióticos são “organismos vivos que, quando ingeridos, proporcionam efeito benéfico além dos inerentes à nutrição básica”.

A ação dos probióticos no organismo se refere principalmente à inibição que estes exercem na colonização do intestino por bactérias patogênicas. Os mecanismos através dos quais os probióticos reduzem as bactérias patogênicas são: produção de substâncias bactericidas, competição por nutrientes e sítios de ligação, alteração do metabolismo microbiano, estimulação do sistema imunológico local e sistêmico a partir da capacidade de adesão à mucosa intestinal, e a modificação da atividade metabólica do trato intestinal (BARBÉS, 2001; TRAVI..., 2002).

O aumento do uso de antibióticos, da resistência bacteriana, dos pacientes imunodeprimidos, das infecções oportunistas e do surgimento de novos patógenos, são fatores que determinam a necessidade de desenvolver novas estratégias no tratamento e prevenção das infecções. Devido às características dos probióticos, tem-se sugerido que os microrganismos que os compõe podem ser úteis nos processos infecciosos (REVISTA..., 2000)

Os probióticos devem ser viáveis nos diferentes microambientes do trato intestinal, para desempenhar sua função protetora (BRASSART, 1997). A ação do probiótico contribui para a normalização da permeabilidade intestinal (que pode estar aumentada), para o equilíbrio da microecologia do intestino (quando alterada por administração de antibióticos), e para produção de imunoglobulina A intestinal (SIITAS et al., 1996; FUKUSHIMA et al., 1998).

Os mecanismos pelos quais um probiótico exerce seus efeitos são a supressão de vírus e bactérias patogênicos, estimulação da imunidade local e sistêmica, e a modificação da atividade metabólica do trato intestinal (BARBÉS, 2001).

Entre os principais gêneros de microrganismos que são identificados na microbiota cecal de aves, observa-se, invariavelmente, a presença de *Bacillus*, *Bacteróides*, *Bifidobacterium*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Ruminococcus* e *Streptococcus*, entre outros (CORRIER et al., 1994c; HUDAULT et al., 1985; IMPEY et al., 1982; OYAZARBAL & CONNER, 1995).

Atualmente há grande expectativa pelo efeito benéfico das bactérias ácido lácticas sobre a saúde humana, por sua ação específica sobre determinados processos infecciosos (REVISTA..., 2000).

Em humanos o gênero *Lactobacillus* é população dominante ou subdominante no intestino delgado, assim como o gênero *Bifidobacterium* é no cólon. A resposta imune do hospedeiro e a função de barreira da microbiota, são algumas das defesas da mucosa intestinal contra patógenos (SCHIFFRIN, 1999).

Gusils et al. (1999) observaram a adesão de *Lactobacillus animalis* e *L. fermentum* nas células intestinais de aves, concluindo que *L. fermentum* reduziu a

colonização de *Salmonella Pullorum*, enquanto *L. animalis* inibiu a adesão de *S. Pullorum*, *S. Enteritidis* e *S. Gallinarum*.

Estudos *in vivo* e *in vitro* indicam que *Lactobacillus reuteri* influencia o sistema imune celular e humoral, pela estimulação da produção de citocinas e de células imunocompetentes, aumentando assim, a produção de anticorpos (TEJADA-SIMON et al., 1999). Há evidências de que o *Lactobacillus reuteri* influencia na expressão das citocinas na mucosa intestinal (MAASSEN, 2000). A resposta imune do hospedeiro compreende as defesas não específicas e as defesas específicas, ou adaptativas, que são ativas unicamente contra o patógeno que estimula a resposta, e cujo desenvolvimento requer alguns dias (FEARON et al., 1996). Cepas de *Lactobacillus* induzem a formação de uma barreira mucosa mais efetiva e com certa especificidade (ISOLAURI et al., 1991; SAAVEDRA et al., 1994).

A segurança das cepas bacterianas utilizadas como probióticos é uma questão muito importante. O emprego de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. não ocasiona preocupação, devido ao fato de que, normalmente, estas bactérias estão presentes no trato gastrointestinal sadio, não sendo relatados danos envolvendo estes microrganismos (SIMON et al., 1984).

### **2.3. Imunologia:**

O trato intestinal é uma enorme superfície de interação do indivíduo com o meio externo, albergando número de células microbianas muito superior ao número de células do organismo (GORBACH et al., 1967; BAQUERO, 1992). As bactérias se encontram em todos os níveis do trato gastrointestinal, mas em diferentes quantidades, devido às diferentes localizações (BAQUERO, 1992; BOURLIOUX, 1994; HILL, 1990). O trato gastrointestinal é considerado primariamente um órgão de digestão e absorção, mas é um órgão metabolicamente ativo, que requer nutrientes específicos (SAADIA et al., 1990).

A mucosa intestinal apresenta a maior interface do organismo com o meio externo e, portanto, também a principal via de entrada para a maioria dos patógenos (ELIA et al., 2002). No intestino delgado, o peristaltismo, a presença de imunoglobulina A (IgA), e a microbiota, reduzem a população de espécies patogênicas (ROWLANDS et al., 1999).

Diversos estudos demonstram um aumento da produção de IgA, após o tratamento com probióticos (PROBIÓTICOS, 2000). Segundo Nagy et al. (1979), algumas bactérias podem estimular moléculas de imunoglobulinas, tais como a IgA. O sistema imune pode ser influenciado pela microbiota intestinal por diversos meios, como por exemplo, a prevenção da adesão bacteriana na mucosa através dos anticorpos IgA e oligossacarídeos, funcionando como análogos de receptores (WOLD & HANSON, 1994).

O *Lactobacillus* tem sido reconhecido pela habilidade em estimular a produção de IgA, aumentando a resistência a doenças (FULLER, 1997; PERDIGON et al., 1993). Experimento utilizando *L. reuteri* em ração de frangos demonstrou que na lâmina própria do íleo desses animais houve um aumento significativo de células T CD4+, mas não de células T CD8+. Frangos de corte tratados ao nascimento com ração contendo *L. reuteri*, e desafiados oralmente com uma cepa de *S. Typhimurium* altamente patogênica ( $10^6$  UFC/ave), também ao nascimento, e com um dia de idade desenvolveram títulos de anticorpos contra *Salmonella* significativamente elevados, quando comparados com aves não tratadas (CASAS, 1998). As espécies de *Lactobacillus* variam em sua propriedade imunoregulatória (PERDIGON et al., 1986; PUUWELS et al., 1996). *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus* e *L. casei* parecem aumentar a atividade fagocitária, a síntese de IgA e a ativação dos linfócitos T e B (TRAVI..., 2002). Barbés (2001) confirmou o efeito imunogênico que a microbiota exerce, aumentando o número de células produtoras de IgA.

Um dos possíveis efeitos antinfeciosos dos probióticos, recentemente reportados, é o mecanismo de ativação do sistema imunológico. O aumento de IgA, resultante da ingestão de probióticos, pode contribuir para aumentar a resistência da mucosa contra a infecção gastrointestinal (WILLINER, 1998; KIRJAVAINEN et al., 1999). Bactérias ácido lácticas demonstram ser potentes moduladoras da função imune (KAILA, 1992; ARUNACHALAM, 2000). Estudos utilizando modelos animais ou cultura *in vitro*, demonstram evidência primária da imunomodulação (GILL & RUTHERFURD, 2001).

A imunidade da mucosa no trato gastrointestinal é a defesa primária contra patógenos (POXTON et al., 1995). A imunidade humoral local é a resposta imune que ocorre nas mucosas, constituída principalmente pelo sistema secretor de IgA

(ELIA et al., 2002). A IgA é a classe predominante de imunoglobulina encontrada nas secreções intestinais, pulmonares, urogenitais, lágrimas, saliva e muco nasal. Essas imunoglobulinas são produzidas por plasmócitos intestinais (ELIA et al., 2002; NORONHA et al., 1995; LOPES, 1994), que são linfócitos B ativados (MICROBIOLOGY..., 2002) sendo secretadas na luz intestinal, onde exercem efeito antibacteriano, antiviral e antitoxina (ELIA et al., 2002). Sua produção é estimulada por antígenos polissacarídeos (parede bacteriana), que sensibilizam os linfócitos B (LOPES et al., 1994).

A IgA apresenta-se em duas formas, sendo considerada um componente do sistema imune específico. A IgA circulante é monomérica, ao passo que a IgA secretória é polimérica, e presente nas secreções corporais (LOPES et al., 1994; MICROBIOLOGY..., 2002). A IgA nas secreções se encontra ligada a um componente secretor, formando a IgA secretora, composta por vários monômeros ligados por pontes de enxofre e pela cadeia J (NORONHA et al., 1995). Tal cadeia é uma pequena proteína sintetizada por todos os plasmócitos que secretam imunoglobulinas poliméricas. Sua função é facilitar a polimerização correta (MICROBIOLOGY..., 2002). Já o componente secretor, o qual é fundamental no complexo mecanismo que envolve a produção de IgA polimérica, normalmente se adere a IgA à medida que ela passa através do epitélio da mucosa. A aderência do componente secretor facilita o transporte da IgA secretora, além de proteger a imunoglobulina do ataque proteolítico (NORONHA et al., 1995).

Uma das funções da IgA é a exclusão imune, quando esta se liga a antígenos, interferindo no ataque e colonização de patógenos (WILLIAMS et al., 1972). A ação da IgA na superfície mucosa possui algumas características como a estrutura polimérica, a presença da cadeia J, e o componente secretor, os quais a diferem das outras imunoglobulinas (STAAT & MCGHEE, 1996).

Anticorpos IgA atuam como primeira linha de defesa na mucosa e no lúmen intestinal (LOPES et al., 1994), regiões onde ocorre o primeiro contato de inúmeros patógenos com a ave. Desta forma, o aumento do título de IgA neste local proporcionará redução das infecções por patógenos intestinais, devido à interação da IgA com a superfície dos microrganismos patogênicos (HUSBAND et al., 1999).

Há evidências indiretas da passagem seletiva de IgA à luz do intestino delgado, o que é corroborado pela observação de que plasmócitos contendo IgA são mais proeminentes e mais numerosos nas vilosidades intestinais do que aquelas contendo IgG. A IgA pode ser sintetizada, tanto localmente por plasmócitos do próprio tecido ou chegar por via hematogênica de qualquer outro lugar do organismo. A evidência de que ocorre a síntese local de IgA é proporcionada pela observação de que isoanticorpos IgA contra hemáceas podem ser facilmente demonstrados no colostro, embora ausentes no plasma. A IgA secretada no intestino, parece ter resistência aumentada à digestão por enzimas proteolíticas e agentes redutores, o que aumenta a sua meia vida neste órgão (HUMPHREY & WHITE, 1970). Esta IgA secretória pode ser detectada por testes sorológicos, como por exemplo, o exame Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), que tem sido empregado para detectar resposta sorológica contra microrganismos do gênero *Salmonella*, embora o monitoriamento bacteriológico seja tradicionalmente o suporte principal para determinar uma infecção no plantel (BARROW, 1998). Segundo Barrow et al. (1989), Iba et al. (1991), Nicholas & Cullen (1991), Barrow et al. (1992), van Zijderveld et al. (1993), e Berchieri Jr. et al. (1995), nem todas as aves sorologicamente positivas apresentam excreção fecal durante os exames bacteriológicos, mas todas as aves positivas em exame microbiológico apresentam soropositividade no ELISA.

A técnica do ELISA pode detectar resposta sorológica em aves portadoras quando não for possível a identificação por meio de exames bacteriológicos, mediante cultura de suabe cloacal, amostras de cama e amostras de órgãos de aves (DADRASST et al., 1990).

“Minha fé mais profunda é que  
podemos mudar o mundo  
pela verdade e pelo amor”  
(Mahatma Gandhi)

## **OBJETIVOS**

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Gerais:

Verificar possíveis alterações histopatológicas e imunológicas da mucosa intestinal de aves tratadas com *Lactobacillus* spp., e desafiadas com *Salmonella* Enteritidis.

#### 3.2. Específicos:

Aves tratadas com *Lactobacillus acidophilus*, *L. fermentum*, *L. reuteri* e *L. salivarius*, e desafiadas ou não com *Salmonella* Enteritidis foram mensuradas individualmente através dos seguintes parâmetros:

- 3.2.1. Peso corporal;
- 3.2.2. Comprimento das vilosidades da porção proximal do duodeno;
- 3.2.3. Produção de imunoglobulina A proveniente de fluido de lavagem intestinal das aves.
- 3.2.4. Lesões histopatológicas do duodeno.

“Meço o valor de um homem  
pela medida em que ele se  
liberta de seu próprio eu”  
(Albert Einstein)

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Local:

Os experimentos foram realizados no Infectório e Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Botucatu.

### 4.2. Aves:

Foram utilizadas 288 pintos de corte com um dia de idade, de linhagem comercial, não sexadas, e livres de administração de quimioterápicos, provenientes de matrizes com 40 e 47 semanas de idade. Todos os experimentos foram programados para início imediato após a chegada das aves do incubatório. As aves foram alojadas em gaiolas de arame, em isolamento e aquecidas, recebendo água e ração não medicada *ad libitum*. Para se comprovar a ausência de *Salmonella* spp., foram adquiridas oito aves a mais em cada grupo, sendo estas sacrificadas imediatamente após a chegada ao laboratório quando realizou-se procedimento tentativo de isolamento de *Salmonella* spp. conforme metodologia descrita por Ewing (1986) e Mallinson & Snoeyenbos (1989). O isolamento de uma única colônia de *Salmonella* spp., determinaria o sacrifício de todo o lote de aves, com o conseqüente cancelamento do experimento.

### 4.3. Amostras de *Lactobacillus*:

Foram utilizadas amostras de *Lactobacillus acidophilus*, *L. fermentum*, *L. reuteri* e *L. salivarius*, isoladas de ingluvío e cecos de matrizes pesadas de linhagem comercial em produção, empregando-se cultivo anaeróbio em meio de cultura DeMan-Rugosa-Sharpe (MRS), específico para *Lactobacillus*. As amostras foram identificadas pelo Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia -UNESP- Campus de Botucatu, através do teste de hidróxido de potássio, coloração pelo método de Gram, produção de catalase, formação de gás a partir da glicose, e teste de fermentação de carboidratos utilizando o API 50 CH<sup>®</sup>.

#### 4.4. Amostra de *Salmonella* Enteritidis:

Foi utilizada amostra de *Salmonella enterica*, subespécie *enterica*, sorotipo Enteritidis fagotipo 4, isolada de fígado de matrizes pesadas, sorotipada e fagotipada pelo Instituto Adolfo Lutz em São Paulo-SP, mutante resistente ao ácido nalidíxico (Nal) e rifampicina (Rif), desenvolvida através de cultivos sucessivos em ágar verde brilhante (AVB) contendo ácido nalidíxico (100µg/mL de meio) e rifampicina (100µg/mL de meio), conforme Andreatti Filho et al. (1997), Weinack et al. (1982), Ziprin et al. (1991), para facilitar posterior enumeração bacteriana.

#### 4.5. Inóculo de *Lactobacillus*:

Todas as amostras de *Lactobacillus* utilizadas neste experimento, foram cultivadas separadamente em tubos contendo caldo MRS, a 37°C por 48 horas em anaerobiose. Posteriormente, 1mL de caldo MRS cultivado foi retirado de cada tubo, e misturado com os demais, formando inóculo na diluição 1:1:1:1. O número de unidades formadoras de colônia (UFC) do inóculo ( $2,0 \times 10^9$  UFC/mL) foi determinado através de diluições decimais em solução tampão de salina fosfatada (PBS) com pH 7,2 (Tabela 1). Todas as determinações bacterianas foram realizadas pelo plaqueamento de 0,1mL das suspensões (MRS) e respectivas diluições decimais (PBS), em duplicata de ágar MRS. A leitura das placas foi feita após incubação a 37°C por 48 horas. Todas as incubações de *Lactobacillus* foram realizadas em anaerobiose, utilizando jarra contendo sistema anaeróbio (Anaerobac<sup>\*</sup>).

#### 4.6. Inóculo de *Salmonella* Enteritidis:

Os inóculos, em todos os experimentos, foram constituídos de culturas da amostra de *S. Enteritidis* em caldo infusão de cérebro e coração (BHI), incubados a 40°C por 12 horas, e diluído 100 vezes também em BHI no momento do uso. O número de UFC nos inóculos foi determinado através de diluições decimais em PBS com pH 7,2 (Tabela 1). 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

---

\* Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda.

feita após incubação a 40°C por 24 horas, com inóculo de  $3,0 \times 10^8$  UFC/mL e  $3,3 \times 10^7$  UFC/mL, no primeiro e segundo desafios, respectivamente.

#### 4.7. Delineamento Experimental:

Duzentas e oitenta e oito aves foram divididas em seis grupos de 48 cada (Tabela 1), assim compostos:

- Grupo A: aves tratadas com *pool* de *Lactobacillus* spp. no primeiro dia, e desafiadas com *Salmonella* Enteritidis no terceiro e vigésimo primeiro dias de vida (L+S 3/21).
- Grupo B: aves tratadas com *pool* de *Lactobacillus* spp. no primeiro dia, e desafiadas com *S. Enteritidis* somente no terceiro dia de vida (L+S 3).
- Grupo C: aves tratadas com *pool* de *Lactobacillus* spp. no primeiro dia, e desafiadas com *S. Enteritidis* somente no vigésimo primeiro dia de vida (L+S 21).
- Grupo D: aves tratadas com *pool* de *Lactobacillus* spp. no primeiro dia, e não desafiadas com *S. Enteritidis* (L).
- Grupo E: aves não tratadas com *Lactobacillus* spp., e desafiadas com *S. Enteritidis* no terceiro e vigésimo primeiro dias de vida (S 3/21).
- Grupo F: aves não tratadas com *Lactobacillus* spp., e não desafiadas com *S. Enteritidis* (controle).
- 

TABELA 1: Unidades formadoras de colônia (UFC) no tratamento com *Lactobacillus* spp. e desafio com *S. Enteritidis* em cada grupo experimental.

Grupo	Tratamento com <i>Lactobacillus</i> spp		Desafio com <i>S. Enteritidis</i>	
	Primeiro dia*	3º dia	21º dia	
L+S 3/21	$2,0 \times 10^9$ **	$3,0 \times 10^8$	$3,3 \times 10^7$	
L+S 3	$2,0 \times 10^9$	$3,0 \times 10^8$	----	
L+S 21	$2,0 \times 10^9$	----	$3,3 \times 10^7$	
L	$2,0 \times 10^9$	----	----	
S 3/21	----	$3,0 \times 10^8$	$3,3 \times 10^7$	
Controle	----	----	----	

\* Idade das aves

\*\* UFC/MI

Os inóculos foram administrados através de depósito direto no esôfago/inglúvio, com o auxílio de pipeta graduada de 1 mL na quantidade de 0,5mL/ave.

Oito aves de cada grupo foram coletadas aos 14, 21, 28 e 35 dias de idade, e sacrificadas por deslocamento cervical, necropsiadas de forma asséptica, e retirado o intestino a partir da porção proximal do duodeno até a porção distal do reto. Um dos cecos foi separado para quantificação de *Salmonella* Enteritidis, enquanto o restante foi processado a fim de se coletar o fluido de lavagem intestinal. Posteriormente, foi coletado segmento do duodeno (aproximadamente dois centímetros após a moela) para exame histopatológico e medição das vilosidades.

Todas as aves foram pesadas individualmente no começo do experimento, e oito aves antes de cada sacrifício, para obtenção do peso médio das aves após o cultivo/tratamento.

#### **4.8. Contagem de *Salmonella*:**

Em cada momento após o sacrifício, um dos cecos de cada ave foi fixado na região ileocecal com o auxílio de fio estéril, removido assepticamente, transferido para bolsa plástica e homogenizado com PBS na proporção de 1:10, obtendo-se diluição  $10^{-1}$ . Realizou-se as demais diluições até  $10^{-8}$  em tubos de ensaio contendo PBS, com posterior plaqueamento de 0,1mL em duplicata de AVB Nal/Rif, cultivadas durante 24 horas à temperatura de 40°C. O número de UFC/grama de conteúdo cecal obtido foi convertido em  $\log_{10}$  para a interpretação dos resultados.

#### **4.9. Processamento das amostras e medida do comprimento das vilosidades:**

Amostras individuais de, aproximadamente, um centímetro de comprimento da porção proximal do duodeno foram coletadas das aves, abertas pela borda mesentérica, estendidas pela túnica serosa, e fixadas em solução de Bouin durante 18 horas, em frascos de vidro identificados. Posteriormente, foram recortadas e lavadas em álcool etílico 70%, e desidratadas em série crescente de álcool etílico. Após desidratação, foram diafanizadas em xilol e incluídas em

parafina. Em cada lâmina histológica foram colocados seis cortes semi-seriados com 5 $\mu$ m de espessura, sendo que entre estes, foram desprezados seis cortes (JUNQUEIRA et al., 2002). Os cortes foram corados segundo a técnica da hematoxilina – eosina (HE). Foram efetuadas trinta medidas do comprimento das vilosidades de cada ave para o segmento do duodeno coletado. As medidas do comprimento dos vilos foram tomadas a partir da região basal, que coincide com a porção superior das criptas, percorrendo-a longitudinalmente até seu ápice (Figura 1). A análise morfométrica do intestino delgado foi realizada em sistema analisador de imagens (ZEISS) contendo o programa KS-300, através de microscopia de luz, em aumento de 50 vezes.



FIGURA 1. Medida do comprimento de vilosidade ( $\mu$ m) do duodeno (HE-50X).

#### 4.10. Coleta do fluido de lavagem intestinal:

Inoculou-se com auxílio de seringa descartável estéril, 2 mL de solução tampão (PBS contendo 0,02% sodium azide, 1% albumina de soro bovino, 1mM phenylmethyl sulfonyl fluoride e 5mM ácido etileno diamino tetra-acético, sal

dissódico-EDTA), na porção proximal do duodeno e coletou-se o fluído na porção distal do reto. O fluído intestinal foi centrifugado a 1200 x g por 15 minutos, e o sobrenadante separado para o teste de ELISA.

#### **4.11. Extração do antígeno para o teste ELISA:**

Culturas de *S. Enteritidis* Nal/Rif foram utilizadas no preparo dos antígenos, e incubadas em 10mL de BHI, à temperatura de 37°C durante 24 horas; posteriormente inoculou-se 5 mL em 500mL de caldo BHI, com incubação similar à anterior. A seguir, as culturas foram centrifugadas a 1912Xg (centrífuga refrigerada Sorvall Super T 21) à temperatura de 4°C durante 30 minutos. Os sobrenadantes foram retirados, e os sedimentos ressuspensos em 10mL de PBS com pH 7,4, realizando-se um total de quatro lavagens. Posteriormente, as culturas foram sonicadas (sonicador VCX400 – Sonics & Materials inc. 53 church Hill Rd), sendo submetidas a oito ciclos de  $\pm$  85watts de potência durante 30 segundos, com intervalo de 30 segundos entre os ciclos. Os materiais sonicados foram centrifugados a 5000Xg por 20 minutos numa temperatura de 4°C. Os sobrenadantes foram armazenados à temperatura de -20°C e utilizados como antígenos durante o ELISA indireto.

#### **4.12. Reação ELISA:**

Antígeno de *S. Enteritidis* foi preparado por sonicação da bactéria cultivada em BHI e purificada por centrifugação da suspensão (HASSAN et al., 1990). Placas estéreis apropriadas contendo 96 poços foram preenchidas com 50 $\mu$ L de antígeno na diluição de 1:50 com tampão carbonato-bicarbonato (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>), com pH 9,6, incubados à temperatura de 4°C durante 18 horas. Após cada etapa, os reagentes foram removidos e as cavidades lavadas quatro vezes com PBS, acrescido de 0,01% de TWEEN 20 (PBST). As placas foram bloqueadas com o acréscimo de 100 $\mu$ L de solução tampão carbonato-bicarbonato, juntamente com 2% de albumina de soro bovino (BSA-Sigma), e incubados durante 60 minutos à temperatura de 37°C, para evitar ruídos na reação. Em seguida, 50 $\mu$ L de cada amostra dos fluídos de lavagem intestinal, previamente diluídos em PBST + BSA 0,5% (1:2), foram depositados em cada poço, e as placas incubadas a 37°C durante 60 minutos. Nova lavagem foi

realizada, e 50µL do conjugado (anticorpo de ovelha anti-IgA de galinha associado à peroxidase) diluídos em PBST + BSA 0,5% (1:40000) foram adicionados, com nova incubação durante 60 minutos a 37°C. Após nova lavagem, o substrato contendo 3µL de peróxido de hidrogênio a 30%, 100µL de tetra metil benzadina (TMB) a 10mg/mL (diluído em Dimetil sulfóxido-DMSO), e 10 mL de tampão acetato / citrato 0,1 mol/L com pH 6,0, foram adicionados, totalizando o volume de 100 µL/poço, durante 15 minutos em temperatura ambiente e na ausência de luz. Finalizando, 50 µL de ácido clorídrico (HCl) 2 N foram acrescentados a cada poço para interromper a reação. A mensuração foi feita em um leitor de placas de ELISA com comprimento de onda a 450 nm.

#### **4.13. Análise estatística:**

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada por intermédio do programa Statistical Analyses System-SAS (STATISTICAL..., 1988), e foram feitas análises de regressão linear e quadrática para as medidas da altura das vilosidades. O teste de Goodman foi utilizado para comparação entre as proporções do número de aves infectadas por *S. Enteritidis* entre os tratamentos, e em cada momento. Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação do índice de colonização cecal e índice ELISA entre os tratamentos, e em cada momento. Para cada variável avaliada no experimento, os grupos foram comparados em cada momento pela análise de variância de um delineamento inteiramente ao acaso, com oito repetições (ZAR, 1996).

“Perca tempo escolhendo um amigo,  
mas perca ainda mais quando tiver de trocá-lo”  
(Benjamin Franklin)

## **RESULTADOS**

---

## 5. RESULTADOS

Para facilitar a descrição, leitura, e simplificar a apresentação dos resultados, melhorando sua interpretação, optamos pela utilização dos parâmetros abaixo com seus respectivos significados:

- Primeiro momento - sacrifício de oito aves de cada grupo aos 14 dias de idade.
- Segundo momento - sacrifício de oito aves de cada grupo aos 21 dias de idade.
- Terceiro momento - sacrifício de oito aves de cada grupo aos 28 dias de idade.
- Quarto momento - sacrifício de oito aves de cada grupo aos 35 dias de idade.
- Tratamento com *Lactobacillus* spp. – 1º dia de idade.
- Primeiro desafio com *Salmonella* Enteritidis - 3º dia de idade.
- Segundo desafio com *Salmonella* Enteritidis - 21º dia de idade.

### 5.1. Detecção de Imunoglobulina A (IgA):

Os resultados da detecção de IgA obtidos no exame ELISA em densidade óptica (DO), foram convertidos para coeficiente ELISA (Tabela 2 e Gráfico 1), visando eliminar possível variação da DO, devido a alterações na temperatura ambiente durante o exame, levando a uma melhor interpretação dos resultados. Este coeficiente foi obtido pela média da amostra menos a média do controle negativo, dividido pela média do controle positivo menos a média do controle negativo (IDEXX – USA).

$$\text{Coeficiente ELISA} = \frac{\text{Média Amostra} - \text{Média Negativo}}{\text{Média Positivo} - \text{Média Negativo}}$$

TABELA.2. Detecção de imunoglobulina A (IgA) no fluído intestinal de aves tratadas com *Lactobacillus* spp. e desafiadas com *Salmonella* Enteritidis. Resultados expressos em coeficiente ELISA.

Tratamento	Momento (dias)			
	14	21	28	35
L+S 3/21	- 0,116 A a*	0,090 AC a	0,457 B a	0,115 C a
L+S 3	- 0,267 A a	0,063 B a	0,183 B b	0,206 B a
L+S 21	- 0,256 A a	0,241 B a	0,277 B ab	0,826 C b
L	- 0,026 A a	0,156 A a	0,021 A c	0,116 A a
S 3/21	- 0,199 A a	0,153 B a	0,073 C c	0,307 B a
Controle	- 0,104 A a	0,169 B a	0,156 B b	0,308 C a

\*Letras maiúsculas comparam médias de momentos em cada tratamento (linha).

\*Letras minúsculas comparam médias de tratamento em cada momento (coluna).

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

No grupo A (L+S 3/21) houve aumento significativo de IgA no fluído intestinal até 28 dias, com posterior diminuição observada com 35 dias de idade.

Os grupos B (L+S 3) e C (L+S 21) apresentaram médias crescente de IgA concomitante com a idade das aves.

No grupo D (L) não houve diferença significativa entre todos os momentos analisados.

O grupo E (S 3/21) apresentou aumento de IgA aos 21 dias, quando ocorreu o segundo desafio, diminuindo posteriormente o índice de IgA com 28 dias, e voltando a aumentar com 35 dias de idade.

No grupo controle foi observado aumento gradativo de IgA nos diferentes momentos, mostrando que com o desenvolvimento a ave adquire IgA naturalmente, mesmo sem tratamento ou desafio.

Em relação aos momentos analisados, não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados, aos 14 e 21 dias de idade.

Na terceira coleta (28 dias) os grupos B, C, E e F não diferiram significativamente entre si. O grupo A foi o que apresentou maior índice de IgA aos 28 dias de idade, devido ao tratamento com *Lactobacillus* spp. e ao estímulo do primeiro e, principalmente, do segundo desafio com *S. Enteritidis*. Já o grupo D apresentou baixo índice de IgA neste momento.

Na última coleta realizada aos 35 dias de idade, os grupos apresentaram índices de IgA semelhantes ( $P > 0,05$ ), exceto para o grupo C, que apresentou o maior índice de IgA de todos os tratamentos e momentos.

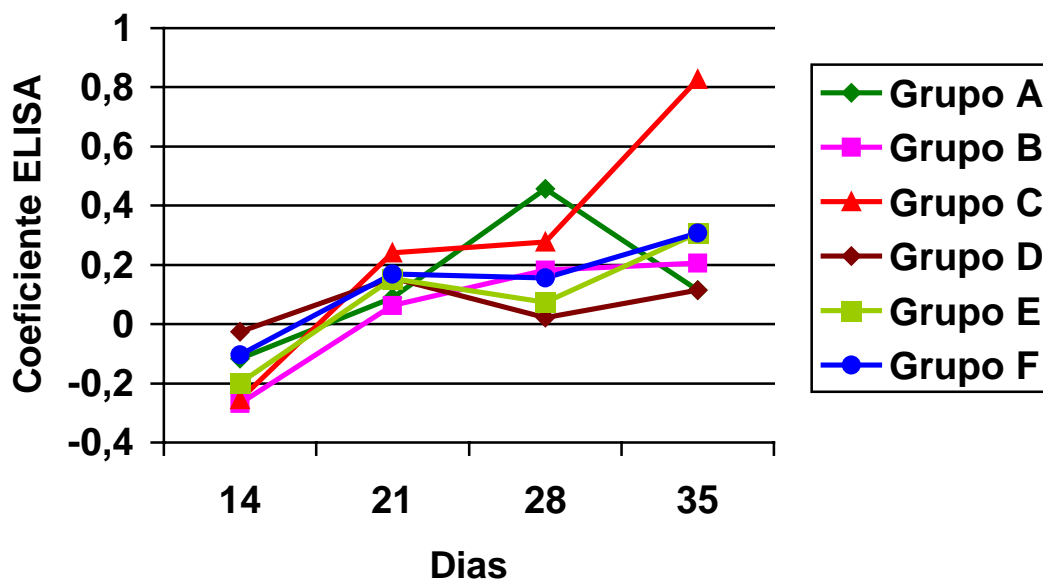


GRÁFICO 1. Detecção de Imunoglobulina A (IgA) no fluido intestinal das aves. Médias dos coeficientes ELISA em cada tratamento e momento de coleta.

## 5.2. Contagem cecal de *Salmonella* Enteritidis:

Os resultados obtidos nas contagens bacterianas em UFC/grama de ceco foram convertidos para  $\text{Log}_{10}$  representados em medianas para cada tratamento/momento (Tabela 3).

TABELA 3. Quantidade de *S. Enteritidis* nos cecos de aves tratadas com *Lactobacillus* spp. e desafiadas. Medianas das unidades formadoras de colônia (UFC) em cada tratamento e momento de coleta.

Tratamento	Momento (dias)			
	14	21	28	35
L+S 3/21	5,0* A a**	0,0 B a	3,1 B a	0,0 B a
L+S 3	5,2 A a	4,6 B a	0,0 C a	0,0 C a
L+S 21	0,0 A a	0,0 A a	0,0 A a	0,0 A a
L	0,0 A a	0,0 A a	0,0 A a	0,0 A a
S 3/21	5,8 A a	3,5 B a	0,0 C a	0,0 C a
Controle	0,0 A a	0,0 A a	0,0 A a	0,0 A a

\* Quantidade de UFC/grama de ceco ( $\text{Log}_{10}$ ).

\*\*Letras maiúsculas comparam médias de momentos em cada tratamento (linha).

\*\*Letras minúsculas comparam médias de tratamento em cada momento (coluna).

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

Os grupos D e F, que não receberam desafio, não apresentaram a bactéria nos cecos em nenhum dos momentos pesquisados.

Os grupos A, B e E todos com desafio no 3º dia de vida, apresentaram contagem elevada de *Salmonella* no 14º dia, independente do tratamento com *Lactobacillus* spp., demonstrando a suscetibilidade de aves jovens nas primeiras três semanas de vida, sendo que no grupo A houve diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) da quantidade bacteriana da primeira para as demais coletas, que não diferiram entre si. Nos grupos B e E também ocorreu diminuição da quantidade bacteriana no período de 14 a 21 dias, e também aos 28 e 35 dias de idade.

No grupo C, que foi tratado e desafiado somente aos 21 dias de idade, não se observou a presença de *S. Enteritidis* aos 28 dias e 35 dias de idade. Em relação aos diferentes tratamentos utilizados neste experimento, não se observou nenhuma diferença significativa.

### 5.3. Medida de vilosidade intestinal:

Foram medidas 30 vilosidades em cada ave, obtendo-se a média do comprimento/ave (Tabela 4 e Gráfico 2).

TABELA 4. Medida das vilosidades do duodeno ( $\mu\text{m}$ ) de aves tratadas com *Lactobacillus* spp. e desafiadas com *S. Enteritidis*. Médias das vilosidades em cada tratamento e momento de coleta.

Tratamento	Momento (dias)			
	14	21	28	35
L+S 3/21	x*822,90 A b**	1136,46 B b	1246,94 C c	1487,44 D c
L+S 3	x 761,18 A b	802,43 A a	1271,67 B c	1556,06 C d
L+S 21	x 1035,30 A d	1110,92 B b	1214,91 C b	1405,88 D b
L	x 1016,11 A d	1136,33 B b	1407,00 C d	1565,18 D d
S 3/21	x 700,88 A a	807,41 B a	1100,54 C a	1320,27 D a
Controle	x 947,65 A c	1146,74 B b	1422,65 C d	1571,27 D d

\*Média aritmética (x) de oito repetições para cada tratamento/momento.

\*\*Letras minúsculas comparam médias de tratamentos em cada momento (coluna) e letras maiúsculas comparam médias de momentos em cada tratamento (linha).

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

Todos os grupos experimentais demonstraram médias crescentes da medida de vilosidade intestinal com a idade, devido ao desenvolvimento das aves.

Aos 14 dias de idade, os grupos desafiados com *S. Enteritidis* apresentaram médias de vilosidades significativamente menores que os demais e, dentre os grupos desafiados, o grupo que não recebeu tratamento com *Lactobacillus* spp. apresentou a menor média. Os grupos tratados somente com *Lactobacillus* spp. apresentaram médias significativamente maiores que os demais grupos.

Na segunda coleta, realizada aos 21 dias de idade, os grupos B (L+S 3) e E (S 3/21) apresentaram médias significativamente menores que os demais.

Os grupos que não foram desafiados com *S. Enteritidis* (grupos D e F) apresentaram vilosidades duodenais maiores aos 28 dias de idade, enquanto o grupo E apresentou a menor média de vilosidades entre todos os grupos experimentais.

Aos 35 dias de idade, os grupos B, D e F, apresentaram maiores vilosidades intestinais, quando comparados com os demais grupos. Nestas idades, o grupo E apresentou as médias das vilosidades intestinais significativamente menores entre os demais grupos.

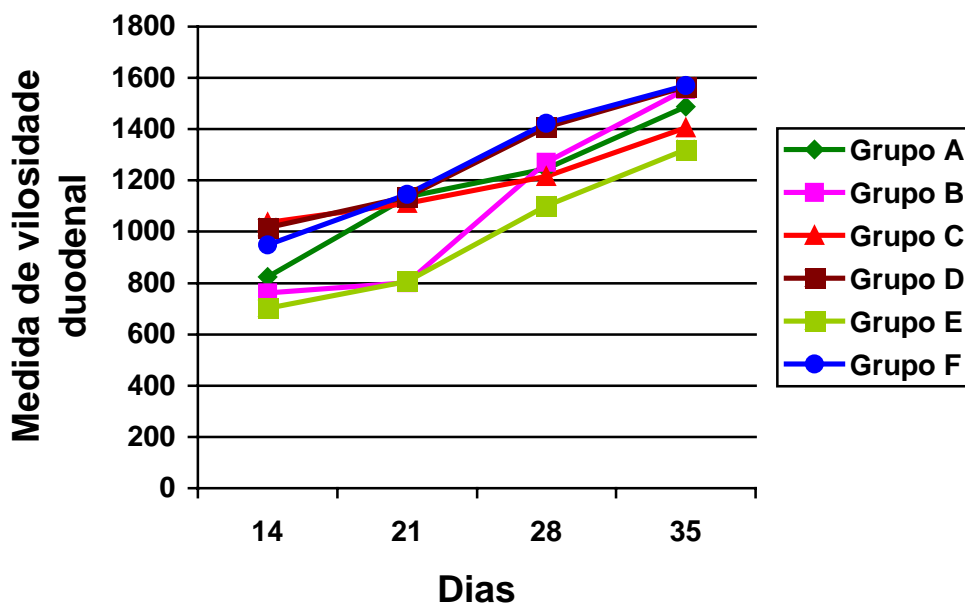


GRÁFICO 2. Medida das vilosidades intestinais (duodeno) de aves tratadas com *Lactobacillus* spp. e desafiadas com *S. Enteritidis*. Média (µm) de oito repetições em cada tratamento e momento de coleta.

#### 5.4. Índice de aves infectadas:

A quantidade de aves infectadas por *S. Enteritidis* em cada tratamento e momento de coleta está expressa na Tabela 5.

TABELA 5. Índice de aves infectadas por *S. Enteritidis* em cada tratamento e momento de coleta. Resultados expressos em número de aves infectadas/número de aves desafiadas (percentual).

Tratamento	Momento (dias)			
	14	21	28	35
L+S 3/21	8/8 (100) A a*	2/8 (25) B a	5/8 (62,5) C a	3/8 (37,5) B a
L+S 3	8/8 (100) A a	5/8 (62,5) B b	2/8 (25) C b	1/8 (12,5) C b
L+S 21	0/8 (0) A b	0/8 (0) A c	2/8 (25) B b	3/8 (37,5) B a
L	0/8 (0) A b	0/8 (0) A c	0/8 (0) A c	0/8 (0) A b
S 3/21	8/8 (100) A a	6/8 (75) B b	2/8 (25) C b	0/8 (0) D b
Controle	0/8 (0) A b	0/8 (0) A c	0/8 (0) A c	0/8 (0) A b

\*Letras maiúsculas comparam médias de momentos em cada tratamento (linha).

\*Letras minúsculas comparam médias de tratamento em cada momento (coluna).

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

Aos 14 dias de idade, todos os grupos desafiados com *S. Enteritidis* no terceiro dia de idade apresentaram 100% de aves infectadas.

No segundo momento (21 dias), o grupo A (L+S 3/21) foi o que apresentou o menor índice de aves infectadas dentre os grupos desafiados, seguido pelos grupos B (L+S 3) e E (S 3/21).

Aos 28 dias de idade, o grupo A (L+S 3/21) foi o que apresentou o maior índice de aves infectadas.

Aos 35 dias de idade, os grupos A e C (L+S 21) apresentaram índices significativamente maiores de aves infectadas, quando comparados com os demais.

O grupo C (L+S 21) até o segundo momento (21 dias), e os grupos D (L) e F (controle), em todos os momentos, não apresentaram aves infectadas.

Em todos os grupos onde as aves foram desafiadas com *S. Enteritidis* houve tendência à redução do índice de aves infectadas, concomitante com o crescimento destas.

### 5.5. Pesagem das aves:

O peso corporal das aves tratadas com *Lactobacillus* spp. e desafiadas com *S. Enteritidis* em cada tratamento e momento de coleta está expresso na Tabela 6 e Gráfico 3.

TABELA 6. Média do peso corporal das aves tratadas com *Lactobacillus* spp. e desafiadas com *S. Enteritidis* em cada tratamento e momento de coleta.

Tratamento	Peso médio corporal (gramas)				
	Coletas (dias)				
	0	14	21	28	35
L+S 3/21	39,06	101,95* A a**	151,31 B a	177,25 B a	452,50 C a
L+S 3	48,35	138,60 A a	221,75 B bc	346,25 C c	537,60 D b
L+S 21	47,84	132,46 A a	242,37 B bc	370,60 C c	447,12 D a
L	39,79	120,52 A a	197,74 B ab	261,88 C b	700,00 D c
S 3/21	50,20	128,57 A a	250,00 B c	376,00 C c	511,87 D b
Controle	47,45	144,92 A a	202,25 B bc	327,37 C c	415,75 D a

\* Média aritmética de oito repetições para cada tratamento.

\*\*Letras maiúsculas comparam médias de momentos em cada tratamento (linha).

\*\*Letras minúsculas comparam médias de tratamento em cada momento (coluna).

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

Em todos os grupos foram observados aumentos gradativos de peso corporal com a idade das aves, em conformidade com o desenvolvimento destas.

Aos 14 dias de idade, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais.

Aos 21 dias de idade, o grupo A apresentou o menor peso corporal entre todos os grupos experimentais, o mesmo ocorrendo no terceiro momento aos 28 dias de idade. Aos 35 dias, o grupo D apresentou a maior média de peso corporal, enquanto as aves dos grupos A, C e F, apresentaram as menores médias de peso corporal.

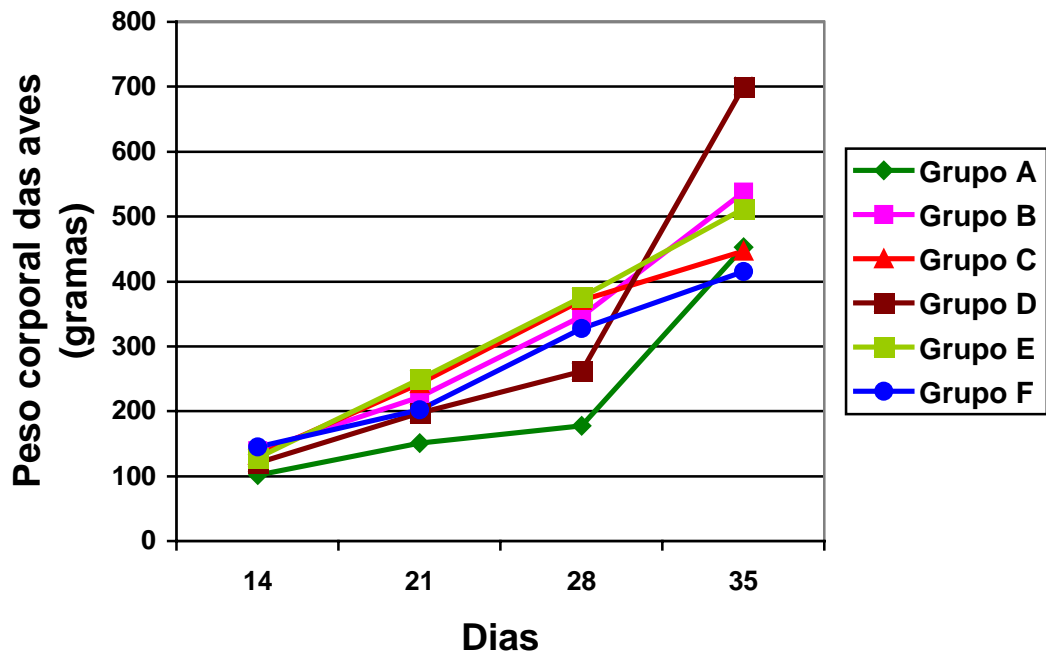


GRÁFICO 3. Peso corporal médio, em gramas, das aves tratadas com *Lactobacillus* spp. e desafiadas com *S. Enteritidis*, de acordo com a idade em dias.

### 5.6. Exame histopatológico:

O exame histopatológico do duodeno de aves tratadas com *Lactobacillus* spp. e desafiadas com *S. Enteritidis*, em cada tratamento e momento de coleta, está apresentado na Tabela 7 e nas Figuras 2 a 6.

TABELA 7. Exame histopatológico do duodeno de aves tratadas com *Lactobacillus* spp. e desafiadas com *S. Enteritidis* em cada tratamento e momento de coleta. Somatória das lesões observadas em oito repetições.

Tratamento	Exame histopatológico do duodeno			
	Momentos			
	14	21	28	35
L+S 3/21	necrose moderada edema moderado congestão	necrose acentuada edema acentuado congestão	edema moderado congestão	congestão
L+S 3	necrose leve edema moderado	necrose moderada edema acentuado congestão	edema leve congestão	SLA*
L+S 21	SLA	SLA	necrose acentuada edema acentuado congestão	necrose leve edema moderado congestão
L	edema moderado congestão	edema leve congestão	SLA	SLA
S 3/21	necrose moderada edema moderado congestão	necrose leve edema moderado congestão	edema leve congestão	SLA
Controle	SLA	SLA	SLA	SLA

\* Sem lesão aparente

As lesões observadas em todos os grupos desafiados foram mais evidentes e acentuadas logo após os desafios, com diminuição da intensidade das lesões e até mesmo o seu desaparecimento, com o avanço da idade das aves.

O grupo C (L+S 21) até 21 dias de idade, e o grupo F (controle), em todas as idades, não apresentaram lesões aparentes.

Dentre todos os grupos, o grupo A (L+S 3/21) foi o que apresentou as lesões mais graves.

O grupo D, que somente recebeu tratamento com *Lactobacillus* spp., apresentou lesões de intensidade moderada a leve, as quais desapareceram a partir do 28º dia de idade das aves.



FIGURA 2. Congestão moderada dos vasos da lâmina própria (→) e edema moderado subepitelial (→) em vilosidades duodenais de aves com 28 dias de idade, tratadas com *Lactobacillus* spp. e desafiadas com *S. Enteritidis* no terceiro e 21º dias (grupo A) (HE-200X).

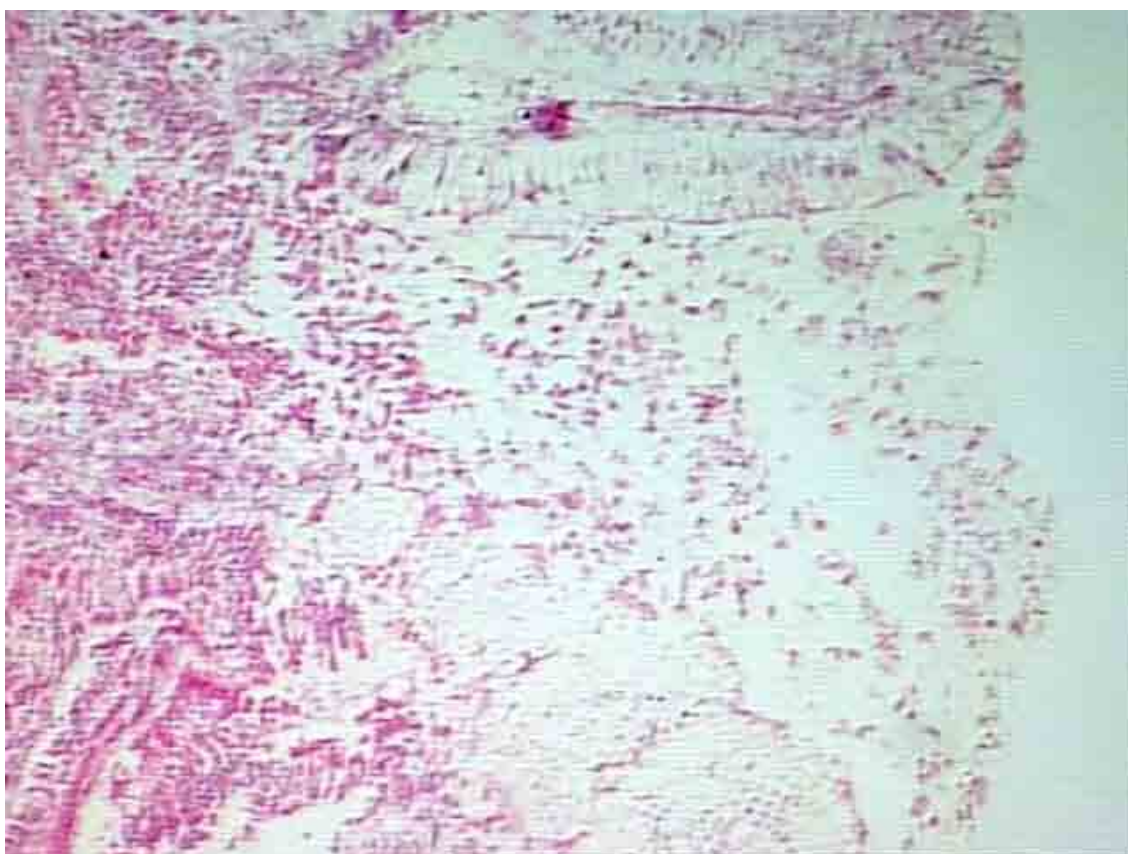


FIGURA 3. Necrose e hemorragia difusas na mucosa duodenal de aves com 28 dias de idade, tratadas com *Lactobacillus* spp. e desafiadas com *S. Enteritidis* no 21<sup>o</sup> dia (grupo C) (HE-200X).

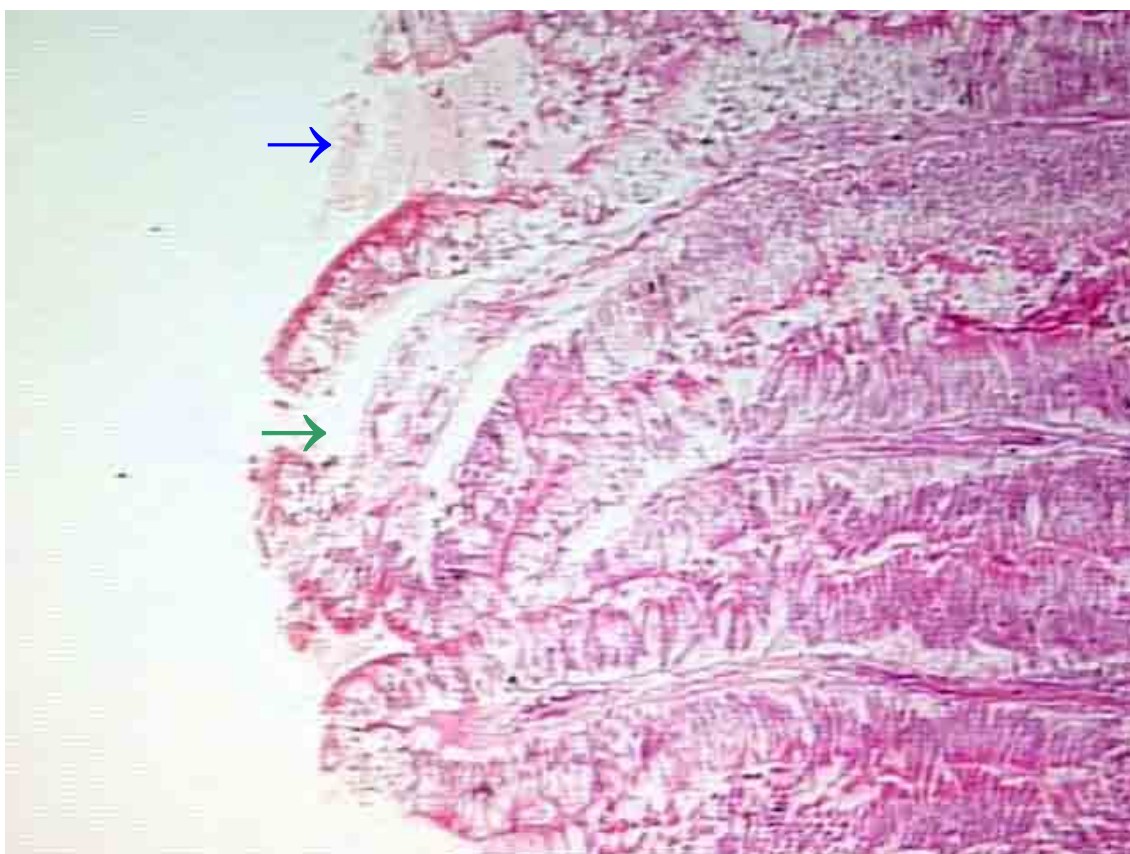


FIGURA 4. Necrose moderada (→) e edema acentuado subepitelial (→) em vilosidade duodenal de aves com 21 dias de idade, tratadas com *Lactobacillus* spp. e desafiadas com *S. Enteritidis* no terceiro dia (grupo B) (HE-200X).

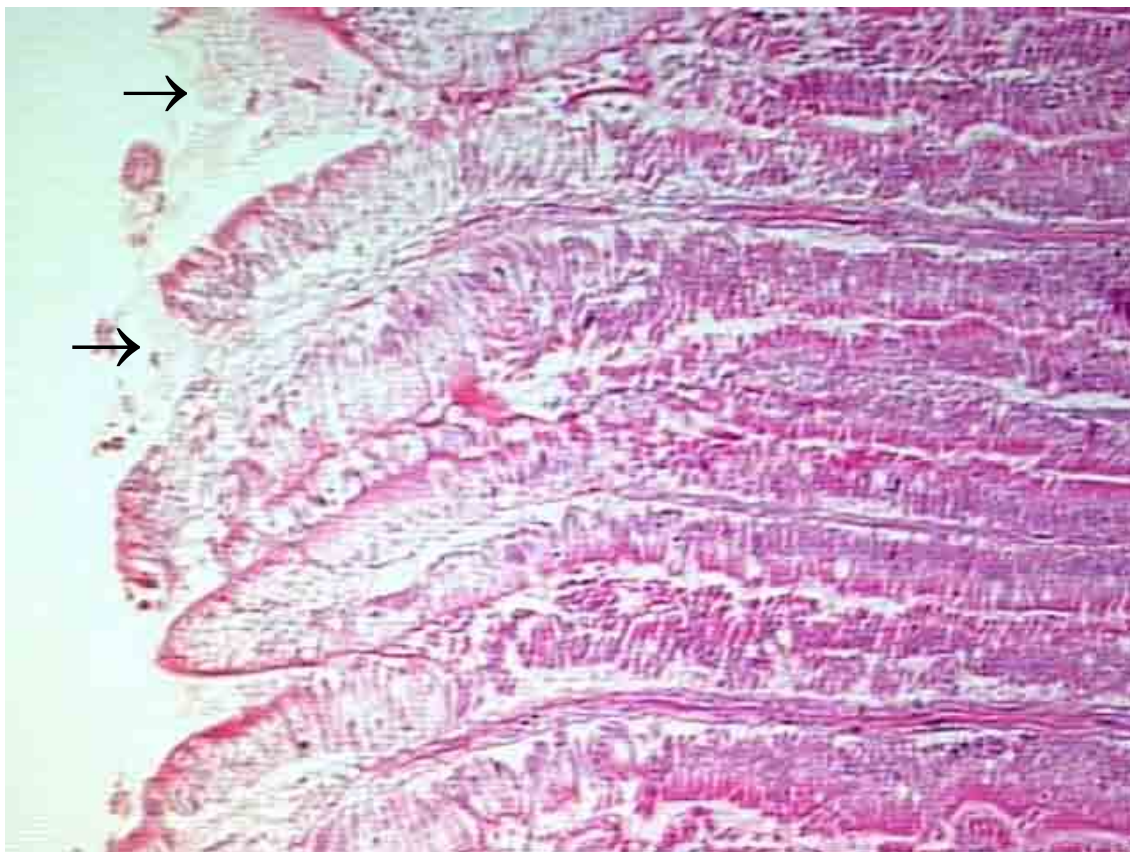


FIGURA 5. Necrose acentuada (→) em vilosidades duodenais de aves com 28 dias de idade, tratadas com *Lactobacillus* spp. e desafiadas com *S. Enteritidis* no 21º dia de idade (grupo C) (HE-200X).



FIGURA 6. Acúmulo de material necrótico (←) no lúmen duodenal de aves com 21 dias de idade, tratadas com *Lactobacillus* spp. e desafiadas com *S. Enteritidis* no terceiro e 21º dias (grupo A) (HE-400X).

“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto, hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver”

(Dalai Lama)

## **DISCUSSÃO**

---

## 6. DISCUSSÃO:

Produtos avícolas de origem avícola representam uma das principais fontes de transmissão da *Salmonella* para humanos (GAST, 1997; TODD, 1997). Neste trabalho, utilizou-se amostra de *Salmonella* Enteritidis devido à sua crescente participação nos surtos de infecção alimentar (FERNANDES et al., 1995; TAUNAY et al., 1995; HOFER et al., 1997), e pelo fato do fagotipo 4 ser um dos mais patogênicos e prevalentes (DOHERTY, 1997; HUMPHREY, 1990; NASTASI et al., 1997, 1998; RUSHDY et al., 1997). Muitos países não possuem um sistema de vigilância epidemiológica eficaz, dificultando a avaliação da real incidência das salmoneloses. Na maioria das vezes, os casos esporádicos e leves não são notificados. Os países que têm registrado casos crescentes de surtos são aqueles em que existe uma maior notificação dos casos (ACHA & SZYFRES, 1992).

O custo com as salmoneloses, principalmente as paratifóides, pode ser dividido em dois grupos: o primeiro é relacionado ao custo do tratamento dos pacientes e a perda da produtividade (UNITED STATE..., 1995), enquanto o segundo refere-se às perdas da indústria avícola, resultado da soma da redução do crescimento, mortalidade, predisposição a outras doenças, gastos com programas de biosegurança que visam impedir a disseminação a outras aves e ao ser humano e o impacto causado pela divulgação nos meios de comunicação, afetando o consumo de ovos e carne de frango (GAST, 1997).

Geralmente, as infecções paratifóides determinam sinais clínicos e lesões somente em aves jovens e que estejam sob condições de estresse. Na grande maioria, os casos são assintomáticos, que tendem a persistir durante a criação, chegando até a idade de abate e, conseqüentemente, determinando a contaminação de outras aves nos abatedouros, durante as diversas fases do processamento industrial (GAST, 1997; RAMPLING et al., 1989).

A dose infectante de *Salmonella* spp. utilizada experimentalmente em pintos de um dia varia na literatura entre  $10^2$  a  $10^8$  UFC por ave (CORRIER et al., 1994c; SNOEYENBOS et al., 1985; STAVRIC et al., 1985; ZIPRIN et al., 1990). Neste experimento a reprodução da infecção paratifóide nos pintos de um dia, se deu através da inoculação intraesofágica de *S. Enteritidis* na dose infectante variando de  $10^7$  a  $10^8$  UFC/ave, determinando um elevado número de aves

infectadas e maior colonização cecal nos grupos desafiados, aos 14 dias de idade.

No presente estudo, o tratamento com *Lactobacillus* spp. antes do desafio das aves com *S. Enteritidis*, não demonstrou resultado significativo quanto à produção de IgA, índice de aves infectadas e colonização cecal. Estes dados estão de acordo com Snoeyenbos et al. (1985), que afirmam que a colonização do intestino com microbiota intestinal normal, antes do desafio, limita eficazmente a infecção por *Salmonella* spp., mas, não previne totalmente quando o desafio for superior a  $10^6$  UFC/ave. Segundo Stavric et al. (1985), quanto maior a dose desafio, maior será a colonização e infecção por *Salmonella* spp.

As formas de administração dos probióticos, ou produtos de exclusão competitiva, podem ser via oral (ANDREATTI FILHO et al., 1997; CORRIER et al., 1991, 1992b; SNOEYENBOS et al., 1985), *in ovo* (COX et al., 1992; EDENS et al., 1997), *ex ovo* (EDENS et al., 1997), liofilizada em cápsulas (CORRIER et al., 1994a), via cama reutilizada (CORRIER et al., 1992a), via cloaca (CORRIER et al., 1994b), e por pulverização (GOREN et al., 1984; CORRIER et al., 1994b; SCHNEITZ, 1992). Nesse experimento, optou-se pela via oral (inoculação intraesofágica), visando garantir que cada ave recebesse a dose preconizada.

Há diversos materiais relacionados à produção de aves, utilizados para verificar a presença de *Salmonella* spp., podendo ser isolamento e/ou contagem, a partir da cama do aviário, suabe de arrasto, vísceras, ou similares como baço, fígado, vesícula biliar, gônadas, sangue cardíaco, inglúvio, intestino (cecos, tonsilas cecais, cloaca, reto) e/ou fezes (ANDREATTI FILHO et al., 1997, 2000; CORRIER et al., 1991, 1992ab; GLEESON, 1989; SNOEYENBOS et al., 1985). Porém, experimentalmente é mais freqüente a utilização da colonização cecal, para avaliar a eficácia de diferentes tratamentos, por serem os cecos locais de maior colonização por *Salmonella* spp. e por outras espécies patogênicas da família *Enterobacteriaceae* (ANDREATTI FILHO et al., 1993). As salmonelas paratífoides apresentam-se mais persistentes, em ordem crescente de colonização no inglúvio, reto e cecos (ANDREATTI FILHO et al., 1997; 2000). Neste experimento quantificou-se a colonização cecal para determinar o índice de aves infectadas por *S. Enteritidis*.

Não houve mortalidade nas aves infectadas por *S. Enteritidis* neste experimento, bem como naquele realizado por Navarro (1995) e Silva (1992), que relataram baixa ou nenhuma mortalidade, exceto quando as aves estão imunossuprimidas ou em condições de estresse (GAST, 1997; RAMPLING et al., 1989). Segundo Andreatti Filho et al. (1997; 2000), além do exposto acima, as salmonelas paratífóides possuem a característica de serem auto limitantes, o que pôde ser observado neste experimento através do índice de aves infectadas por *S. Enteritidis*. O grupo E (S 3/21), apresentou diminuição na quantidade de aves infectadas e da bactéria nos cecos (Tabelas 3 e 5) no decorrer do tempo, mostrando, dessa forma, em conformidade com Andreatti Filho et al. (1997, 2000), a característica auto limitante da *S. Enteritidis* em aves.

Aos 14 dias de idade, todas as aves desafiadas aos três dias de idade, apresentaram positividade para *S. Enteritidis*, com elevada quantidade bacteriana nos cecos (Tabelas 3 e 5), de acordo com Bailey et al. (1994) e Byrd et al. (1998), que relataram que aves recém nascidas sem tratamento são altamente suscetíveis à colonização intestinal.

No segundo desafio, aos 21 dias de idade, apenas o grupo A, (L+S 3/21), apresentou aumento no índice de aves infectadas, mostrando que o tratamento com *Lactobacillus* não foi eficaz, uma vez que o grupo controle, não tratado e não desafiado com *S. Enteritidis*, também aos 21 dias de idade, obteve índice semelhante. O mesmo foi observado por Snoeyenbos et al (1985), quando concluíram que a microbiota intestinal não previne totalmente a infecção por *S. Enteritidis*, quando o desafio for superior a  $10^6$  UFC/ave.

Nos grupos desafiados, não se observou diferença significativa ( $P>0,05$ ) no peso corporal das aves, tratadas ou não com *Lactobacillus* spp. Resultado semelhante foi observado por Andreatti Filho et al. (1997; 1999), indicando que a presença de *S. Enteritidis* não interferiu na produtividade das aves.

O grupo D, de aves tratadas somente com *Lactobacillus* spp., foi o que apresentou peso corporal significativamente maior no final do experimento, devido o maior desenvolvimento das vilosidades intestinais, aumentando assim a absorção de nutrientes, com conseqüente aumento de peso das aves. O mesmo pode ser observado por Ramirez Reyes, et al. (2005) e Henrique, et al. (1998), quando estudaram probióticos no desenvolvimento de aves comerciais. Santin et

al. (2000) também demonstraram o ganho de peso de frangos de corte dos 21 aos 42 dias devido ao aumento das vilosidades intestinais proporcionado pelo uso de probióticos. Maiorka et al. (2001) também verificaram um melhor ganho de peso e rendimento de carcaça em aves tratadas com probióticos, quando estas foram submetidas a diferentes tratamentos com probiótico, prebiótico, simbiótico e antibiótico como promotores de crescimento.

No grupo C, de aves tratadas e submetidas apenas ao segundo desafio com *S. Enteritidis* aos 21 dias de idade, não se detectou a bactéria nos cecos nos períodos de 28 e 35 dias de idade, demonstrando a eficácia do tratamento com *Lactobacillus* spp. no primeiro dia de idade das aves, o que, possivelmente contribui para a formação e equilíbrio mais precoce da microbiota intestinal.

A produção de IgA nas aves é crescente de acordo com o aumento da idade, conforme observado no grupo controle. Este fato está relacionado ao aumento de estímulos na mucosa intestinal (NAGY et al., 1979; WOLD & HANSON, 1994).

O grupo A, apresentou maior produção de IgA (Tabela 2), quando comparado com os outros grupos após o segundo desafio (21 dias), demonstrando que quanto maior o desafio, maior o estímulo do sistema imune e, assim como Nagy et al. (1979) verificaram, este estímulo aumenta a produção de IgA. Porém, nesta mesma idade, a presença de *S. Enteritidis* no ceco e o índice de aves infectadas foram elevados (Tabelas 3 e 5), reiterando a reduzida eficácia do tratamento com *Lactobacillus* spp. diante de desafios superiores a  $10^6$  UFC/ave (SNOEYENBOS et al., 1985).

Ao final do experimento, 35 dias de idade, o único grupo que apresentou elevada produção de IgA foi o grupo C, o qual foi tratado e recebeu apenas o segundo desafio (21 dias), provavelmente devido à formação equilibrada da microbiota intestinal já neste momento.

Em relação à medida das vilosidades duodenais, estas apresentaram médias menores nos grupos desafiados no terceiro dia e mensurados no 14º dia, devido principalmente às lesões determinadas pela *S. Enteritidis*.

Na idade de 35 dias, os grupos que não receberam o segundo desafio aos 21 dias de idade, apresentaram vilosidades maiores do que as observadas nos grupos desafiados, mostrando que o desafio recente com *S. Enteritidis*, além de determinar lesão à vilosidade, também diminui o seu comprimento. Ficou

demonstrado que com o passar do tempo, a vilosidade se restabelece, voltando ao tamanho normal, o que pode ser observado no grupo B, que recebeu apenas o primeiro desafio, e após 32 dias deste, recuperou o seu comprimento, mostrando-se semelhante aos grupos que não receberam desafio.

Não foi observada diferença na medida de vilosidades entre os grupos tratados com *Lactobacillus* spp. e não desafiados, e o grupo sem tratamento e sem desafio, da mesma forma que Simon et al. (1984), que relataram não haver danos envolvendo estes microrganismos.

As lesões observadas no exame histopatológico das aves foram selecionadas em virtude da predominância e alta incidência em cada tratamento/momento (Tabela 7 e Figuras 2 a 6). Outras lesões foram observadas esporadicamente, porém sem significância, devido a pequena incidência.

As lesões nos grupos desafiados apresentaram intensidade decrescente com o decorrer da idade das aves, e concomitante com a regeneração das vilosidades intestinais. Esta observação também foi verificada por Andreatti Filho et al. (1997; 2000), demonstrando a característica auto limitante das salmonelas paratífóides.

No grupo C, de aves tratadas e desafiadas no 21º dia de vida, até o período de 21 dias e no grupo F, de aves não tratadas e não desafiadas, em todas as idades, a ausência de lesão está relacionada à ausência de desafio.

No grupo D, apenas tratado com *Lactobacillus* spp., também observou-se lesões, porém, sem severidade e desaparecendo rapidamente. Já o grupo A, que recebeu tratamento e os dois desafios com *S. Enteritidis*, apresentou as lesões mais acentuadas.

O efeito benéfico dos *Lactobacillus* spp., como ação probiótica frente a colonização bacteriana, já foi comprovado por autores (GUSILS et al., 1999; MAASSEN, 2000; SCHIFFRIN, 1999), porém, neste experimento, pouca ação benéfica foi observada em alguns grupos. Diversas variáveis existentes nos protocolos experimentais empregados, como tempo de cultivo, número de passagens no meio de cultura, espécies de bactérias utilizadas, via de administração, sorotipo de *Salmonella* desafio, dose infectante, entre outras, podem ter concorrido para os resultados obtidos.

“O amor não consiste em olhar um  
para o outro, mas sim em olhar  
juntos para a mesma direção”  
(Antoine de Saint-Exupéry)

## **CONCLUSÕES**

---

## 7. CONCLUSÕES

- Aves mais jovens são mais sensíveis à infecção com *S. Enteritidis*, quando desafiadas no terceiro dia de vida.
- Aves tratadas apenas com *Lactobacillus* spp. e não desafiadas apresentaram maior ganho de peso corporal.
- A produção de IgA é significativamente maior a partir de 28 dias de idade, nas aves tratadas com *Lactobacillus* spp., e desafiadas com *S. Enteritidis* no 21º dia de idade.
- O desafio com *S. Enteritidis* provoca a redução do comprimento das vilosidades intestinais, regenerando-se posteriormente.
- As lesões histopatológicas mostraram-se mais acentuadas após os desafios, com posterior regeneração.

“O amor para ser verdadeiro, tem de doer.  
Não basta dar o supérfluo a quem necessita,  
é preciso dar até que isso nos machuque”  
(Madre Teresa de Calcutá)

## **REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**

---

## 8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA\*

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. 2ª ed. (pub. cient. nº 503), Washington: OPAS, 1992. 989p.

ANDREATTI FILHO, R.L.; SILVA E.N.; BALEN, Efeito da via de inoculação na patogenicidade de amostras patogênicas e apatogênicas de *Escherichia coli* em galinhas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.45, p.475-486, 1993.

ANDREATTI FILHO R.L.; SILVA E.N.; CURI P.R. Ácidos orgânicos e microbiota cecal anaeróbia no controle da infecção experimental de frangos por *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.49, p.661-672, 1997.

ANDREATTI FILHO, R.L.; et al. Efeito da vacina contra coccidiose sobre a colonização de *Salmonella enteritidis* em frangos de corte tratados com microbiota cecal anaeróbia. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.51, p.311-316, 1999.

ANDREATTI FILHO, R.L.; SAMPAIO, H.M. Probióticos e prebióticos: realidade na avicultura industrial moderna. **Rev. Educ. Contin. CRMV-SP.**, São Paulo, v.2, n.3, p.59-71, 1999.

ANDREATTI FILHO R.L.; et al. Use of anaerobic cecal microflora, lactose and acetic acid for the protection of broiler chicks against experimental infection with *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis, **Brasilian J. Microbiol.**; v.31, p.107 – 112, 2000.

ARUNACHALAM, K.; GILL, H.S.; CHANDRA, R.K. Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN 019). **Eur. J. Clin. Nutr.**, Houston, v. 54, p. 1-5, 2000.

BAQUERO, F. Microflora normal del hombre. In: Perea E.J. (Ed) **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**. Doyma, 1992. p.31-39.

BARBÉS, M. C. Microbiota and gastrointestinal system. **Rev. Esp. Enferm. Dig.**, Madrid, v. 93, p. 325-327, 2001.

BARROW, P. A.; et al. Detection of *Salmonella* infection by ELISA. **The Veterinary Record**, London, p.586, 1989.

BARROW, P. A. Experimental infection of chickens with *Salmonella enteritidis*. **Avian Pathology**, v.20, p.145-153, 1991.

---

\* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2000. 22p.

BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

BARROW, P. A.; BERCHIERI Jr., A.; Al-HADDAD, O. The serological response of chickens to *Salmonella gallinarum*-*Salmonella pullorum* detected by enzyme-linked immunosorbent assay. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 36, p. 227-236, 1992.

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

BARROW, P. A. Monitorias e controle das salmonelas em reprodutoras na Europa. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1998, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 1998, p.1-7.

BARROW, P. A. *Salmonella* em avicultura – Problemas e novas idéias sobre possibilidades de controle. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.1, p.9-16, 1999.

BARROW, P. A. The paratyphoid salmonellae. **Revue Scientifique et Technique Officef International des Epizooties**, v. 19; p. 351-375, 2000.

BAILEY, J.S.; COX, N.A.; BERRANG, M.E. Hatchery-acquired Salmonellae in broiler chicks. **Poult. Sci.**, Champagne, v.73, p.1153-1157, 1994.

BERCHIERI Jr, A.; BARROW, P. A. Patologia e métodos de diagnóstico de *Salmonella enteritidis*. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 1995, Curitiba. **Anais...** Curitiba: FACTA, 1995. p. 14-19.

BOURLIOUX, P. Ecologie microbienne du tractus digestif humain. En: ROISSART, H.; LUQUET, F.M., (Ed). **Bactéries lactiques**. Lorica, 1994. p. 369-381.

BRASSART, D.; SCHIFFRIN, E.J. The use of probiotics to reinforce mucosal defence mechanisms. **Trends Food Sci. Technol.**, Cambridge, v. 8, p. 321- 326, 1997.

BYRD, J.A.; CORRIER, D.E.; DeLOACH, J.R. et al. Horizontal transmission of *Salmonella typhimurium* in broiler chicks. **J. Appl. Poult. Res.**, v.7, p.75-80, 1998.

CASAS, I.A.; EDENS, F.W.; DOBROGOSZ, W.J.; *Lactobacillus reuteri*: An effective probiotic for poultry and other animals. In: SALMINEN, S. and von WRIGHT, A. M.D. (Eds.) **Lactic Acid Bacteria**, second edition. New York. p. 475-518. 1998.

CHADFIELD, M. S.; et al. Comparison of intestinal invasion and macrophage response of *Salmonella Gallinarum* and other host-adapted *Salmonella enterica* serovars in the avian host. **Veterinary Microbiology**, v. 92, p. 49-64, 2003.

CODY, S. H.; et al. Two outbreaks of multidrug-resistant *Salmonella* serotype Typhimurium DT 104 infections linked to raw-milk cheese in Northern California. **J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.281, p 1805-1810, 1999.

COOPER, G. L. Salmonellosis infections in man and the chicken: pathogenesis and the development of live vaccines – a review. **Veterinary Bulletin**, v. 64, p. 123-143, 1994.

CORRIER, D. E.; et al. Effect of anaerobic cecal microflora and dietary lactose on colonization resistance of layer chickens to invasive *Salmonella enteritidis*. **Avian Dis.**, Kennett Square, v.35, p.337-343, 1991.

CORRIER, D. E.; et al. Effect of used litter from floor pens of adult broilers on *Salmonella* colonization of broiler chick. **Avian Dis.**, Kennett Square, v.36, p.897-902, 1992a.

CORRIER, D. E.; et al. Effect of anaerobic cecal microflora and dietary lactose on *Salmonella* colonization in bobwhitequail (*Colinus virginianus*) d. **Poult. Sci.**, Champagne, v.71, p.2022-2026, 1992b.

CORRIER, D. E.; et al. Competitive exclusion of *Salmonella enteritidis* in leghorn chicks: comparison of treatment by crop gavage, drinking water, spray, or lyophilized alginate beads. **Avian Dis.**, Kennett Square, v.38, p.297-303, 1994a.

CORRIER, D. E.; et al. Resistance against *Salmonella enteritidis* cecal colonization in leghorn chicks by vent lip application of cecal bacteria culture. **Poult. Sci.**, Champagne, v.73, p.648-652, 1994b.

CORRIER, D. E.; et al. Inhibition of *Salmonella enteritidis* cecal and organ colonization in leghorn chicks by defined culture of cecal bacteria and dietary lactose. **J. Food. Protec.**, Ames, v. 57, p.377-381, 1994c.

COX, N. A.; et al. *In ovo* administration of a competitive exclusion culture treatment to broiler embryos. **Poult. Sci.**, Champagne, v.71, p.1781-1784, 1992.

DADRAS, H.; HESKETH, R.; TAYLOR, D. J. Egg yolk antibody detection in identification of *Salmonella* infected poultry. **The Veterinary Record**, v.126, p.219, 1990.

DAY, C.A. **Competitive exclusion in poultry**: a review. Worcessershire: Life-Care Prod., 1992. p. 18.

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

DIRECTIVA 92/117/CEE DO CONSELHO DE 17 DE DEZEMBRO DE 1992. **Relativa às medidas de proteção contra zoonoses e certos agentes zoonóticos em animais e produtos de origem animal a fim de evitar focos de infecção e de intoxicação de origem alimentar.** 1992. Disponível em: <<http://europa.eu.int/comm/food/fs/sfp/mr/mr07pt.pdf>>. Acesso em: 03 jun. 2002.

DOHERTY, L.; et al. An outbreak of *Salmonella enteritidis* phage type 4 in a rural community in Northern Ireland. **Commun Dis. Rep. CDR. Rev.**, London, v.7, p.73-76, 1997.

EDENS, F. W.; et al. Principles of *Ex Ovo* competitive exclusion and *In Ovo* administration of *Lactobacillus reuteri*. **Poult. Sci.**, Champagne, v.76, p. 179-196, 1997.

EDITORA SAFRAS. Frango: Rússia foi o maior comprador em abril; **Safra e Mercado Boi**. Porto Alegre, v. 25, n. 347, jun. 2002. Disponível em: <<http://www.safra.com.br/publicacoes/boicarne/texboi.htm#4>> . Acesso em: 03 jun. 2002.

ELIA, C.; SOUZA, H. **Imunologia da mucosa intestinal**. 2002. Disponível em: <[http://orbita.starmedia.com/~dia-a-diagastro/entrevistas\\_base.html](http://orbita.starmedia.com/~dia-a-diagastro/entrevistas_base.html)>. Acesso em: 04 jun. 2002.

EWING, W.H. **Edwards and Ewing's: identification of Enterobacteriaceae**. 4. ed. New York: Elsevier Science Publ., 1986. p.181-245.

FEARON, D. T.; LOCKSLEY, R. M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. **Science**, London, v. 272, p. 50-52, 1996.

FERNANDES, S. A.; et al. *Salmonella enteritidis*: atual sorotipo no estado de São Paulo e susceptibilidade aos agentes antimicrobianos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18., 1995, Santos. **Anais...** Santos, 1995. p.103.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity. **Microbiological Reviews**, v. 53, p. 210-230, 1989.

FUKUSHIMA, Y.; et al. Effect of a probiotic formula on immunoglobulin A production in healthy children. **Int. J. Food Microbiol**, Amsterdam, v. 42, p. 39-44, 1998.

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

FULLER, R. The importance of *Lactobacilli* in maintaining normal microbial balance in the crop. **Br. Poultry Sci.**, London, p. 1335-1394, 1997.

GAST, R. K. Paratyphoid Infections. In: Calnek, B. W.(Ed.) **Diseases of poultry**. 10 ed. Ames: Iowa State University Press, p.81-121, 1997.

GAST, R. K. Serology and *Salmonella*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FOOD-BORNE SALMONELLA IN POULTRY, 1998, Baltimore. **Proceedings...** Baltimore: R. K. Gast & C. L. Hofacre, 1998. p. 154-160.

GILL, H.S.; RUTHERFURD, K.J. Probiotic supplementation to enhance natural immunity in the elderly: effects of a newly characterized immunostimulatory strain *Lactobacillus rhamnosus* HN 001 (DR 20<sup>TM</sup>) on leucocyte phagocytosis. **Nutr. Res.**, Elmsford, v. 21, p. 183-189, 2001.

GLESSON, T. M.; STAVRIC, S.; BLANCHFIELD, B. Protection of chicks against *Salmonella* infection with a mixture of pure cultures of intestinal bacteria. **Avian Dis.**, Kennett Square, v.33, p.636-642, 1989.

GORBACH, S.L.; NAHA, L.; LERNER, P.I. Studies of intestinal microflora. In: Effects of diet, age and periodic sampling on numbers of faecal microorganisms in man. **Gastroenterology**, Duluth, v.53, p. 845-855, 1967.

GOREN, E.; et al. Protection of chicks against *Salmonella infantis* infection induced by strict anaerobically cultured intestinal microflora. **Vet. Q.**, Dordrecht, v.6, p.22-26, 1984.

GUSILS, C.; GONZALEZ, S.N.; OLIVER, G. Some probiotic properties of chicken *Lactobacilli*. **Can. J. Microbiol.**, Othawa, v. 45. p. 981-987, 1999.

GREIN, T. et al. Redução dos riscos de salmonelose originada por ovos. **Nota Editorial**, v. 2, n.11, 1997.

HASSAN, J.O. et al. Detection of *Salmonella typhimurium* infection of chickens by indirect ELISA. **Vet. Rec.**, London, v. 126, p. 519-522, 1990.

HILL, M.J. Factors controlling the microflora of the healthy upper gastrointestinal tract. In: HILL, M.J.; MARSH, P.D. **Human microbial ecology**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 57-85.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S.J.; REIS, E.M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v.2, p.55-62, 1997.

HOLMES, B.; GROSS, R.J. Coliform bacteria: various other members of the Enterobacteriaceo. In: PARKER, M.T.; COLLIER, L.H. (Ed). **Topley & Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity**. 8 ed. London: Eduard Arnold, 1990. v.2, p.415-441.

HOLT, J. G.; et al. **Bergey's**: manual of determinative bacteriology. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994, p. 186-187.

HORMAECHE, C.; et al. Immunity mechanisms in experimental salmonellosis. In: CABELLO, F.; HORMAECHE, C.; MASTROENI, P.; BORINA, L. **The Biology of Salmonella**. 1993. p.223-235 (NATO ASI Series, Série A, Life Sciences, 2445).

HUDAULT, S.; et al. Efficiency of various bacterial suspensions derived from cecal floras of conventional chickens in reducing the population level of *Salmonella typhimurium* in gnotobiotic mice and chicken intestines. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v.31, p.832-838, 1985.

HUMPHREY, T. J. Public health implications of the infection of egg laying hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. **World's Poultry Sci. J.**, Huntington, v.46, p.5-13, 1990.

HUMPHREY, J.H. & WHITE, R.G. **Immunology for students of medicine**. 3. ed. Londres: Blackwell Scientific Publications, 1970. p. 195-197.

HUSBAND, A.; MUIR, W. Development of DNA vaccines and techniques for cytokine manipulation for improved mucosal immunity in chickens. In: **RIRDC Completed Projects in 1998-1999 e Research in Progress as at June 1999**. Rural Industries Research e Development Corporation. 1999. Disponível em: <<http://www.Rirdc.gov.au/99comp/cm1.htm>> . Acesso em: 03 jun.2002.

IBA, A. M.; et al. Utilização do ELISA (teste imunoenzimático) na detecção de portadores de *Salmonella gallinarum* e *Salmonella pullorum*. **Ars Veterinária**, v.7, p.126-134, 1991.

IMPEY, C. S.; MEAD, G. C.; GEORGE, S. M. Competitive exclusion of salmonellas from the chick cecum using a defined mixture of bacterial isolates from the cecal microflora of an adult bird. **J. Hyg.**, London, v.89, p.479-490, 1982.

ISOLAURI, E. et al. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* spp. Strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. **Pediatrics**, Elk Grove Village, v. 88, p. 90-97, 1991.

JUNQUEIRA, O.M. et al. **Substituição da proteína do leite em pó desnatado pelo isolado protéico de soja sobre características morfométricas intestinais de leitões no período de 21 a 35 dias de idade**. 2002. Jaboticabal. Disponível em: <<http://www.sian.info.ve/porcinos/publicaciones/viencuent/mack.htm>>. Acesso em: 21.mai.2002.

KAILA, M. et al. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. **Pediatr. Res.**, Baltimore, v. 32, p. 141-144, 1992.

KIRJAVAINEN, P.V. et al. New aspects of probiotics- a novel approach in the management of food allergy. **Allergy**, Copenhagen, v. 54, p. 909-915, 1999.

LAX, A. J.; et al. Current perspectives in salmonellosis. **British Veterinary Journal**, v. 151, p. 351-377, 1995.

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

LOPES FILHO, O.; MIGAÇA, I. Imunologia do anel linfático de Waldeyer. In: LOPES FILHO, O.; CAMPOS, C.A.H. **Tratado de otorrinolaringologia**. São Paulo: Roca, 1994. p. 148-162.

MAASSEN, C. B.M.; et al. Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. **Vaccine**, v.18, p. 2613-2623, 2000.

MACHADO, J.N. Tendências atuais e futuras de colonizadores bacterianos intestinais na avicultura industrial. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE CIÊNCIAS AVIÁRIAS, 4., 2000, Campinas. **Anais...** Campinas, 2000. p. 18-27.

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

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

MCDONOUGH, P. L.; SHIN, S. J.; LEIN, D. H. Diagnostic and public health dilemma of lactose-fermenting *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in cattle in the Northeastern United States. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.38, p.1221-1226, 2000.

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

MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY ON-LINE. **Immunology Lecture Four- Immunoglobulins- Structure and Function**. Carolina do Sul, 2002. Disponível em: <<http://www.med.sc.edu:85/mayer/Igstruct2000.htm>>. Acesso em: 04 jun. 2002.

MOLBAK, K.; et al. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT 104. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.341, p.1420-1425, 1999.

NAGY, I.K.; BOGAL, B.S.; MACKENZIE, T. Duration of anti-adhesive and bactericidal activities of milk from vaccinated sows on *Escherichia coli* O149 in the digestive tract of piglets during the nursing period. **Res. Vet. Sci.**, London, v. 27, p. 289-296, 1979.

NASTASI, A.; et al. Epidemiological analyses of strains of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from foodborne outbreaks occurring in Italy: 1980-1994. **J. Med. Microbiol.**, England, v.46, p.377-382, 1997.

NAVARRO, M.P.; Infecção por *Salmonella* Enteritidis em repordutoras pesadas na América Latina. In: CONFERENCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1995, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 1995. p.7-16.

NICHOLAS, R. A. J.; CULLEN, G. A. Development and application of an ELISA for detecting antibodies to *Salmonella enteritidis* in chickens flocks. **The Veterinary Record**, v.128, p.74-76, 1991.

NORONHA, I.L. et al. Nefropatia mesangial primária de IgA : aspectos clínicos e imunopatológicos. **J. Bras. Nefrol.**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 21-29, 1995.

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

OYAZARBAL, O. A.; CONNER, D. E. *In vitro* fructooligosaccharide utilization and inhibition of *Salmonella* spp. by selected bacteria. **Poult. Sci.**, Champagne, v.74, p.1418-1425, 1995.

PARRA, F.E. Exclusion competitive in Salmonellosis: Revisão In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PATOLOGIA AVIAR, 1994, Athenas. **Anais...** Athenas, 1994. p. 433-469.

PERDIGON, G. et al. Immunomodulating effects of lactic acid bacteria on mucosal and tumor immunology. **Int. Immunotherapy**, v. 9, p. 29-52, 1993.

PERDIGON, G. et al. Effect of per orally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. **Infect. Immun.**, Washington, v. 53, p. 404-410, 1986.

PIVNICK, H.; et al. Comparison of fresh feces with lyophilized and frozen cultures of feces as inocula to prevent *Salmonella* infection in chicks. **J. Food Protect.**, Ames, v.45, p.1188-1194, 1982.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; HICKMAN-BRENNER, F. W. Kauffmann-White scheme. **Research Microbiology**, v.147, n.39, p.765-769, 1996. Supplement.

POPPE, C. *Salmonella enteritidis* in Canadá. **Int. J. Food Microbiol.** Amsterdam, v. 21, p. 1-5, 1994.

POXTON, I.R. et al. An ELISA to measure mucosal IgA specific for *Bacteroides* surface antigens in whole gut lavage fluid. **Microb. Ecol. Health Dis.**, New York, v. 8, p. 129-136, 1995.

PUUWELS, P.H.; LEER, R.J.; BUERSMA, W.J.A. The potential of *Lactobacillus* as a carrier for oral immunization: Development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigens. **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v. 44, p.183-192, 1996.

RAMPLING, A.; et al. *Salmonella enteritidis* phage type 4 infection of broiler chickens: a hazard to public health. **Lancet**, London, v.2, p.436-438, 1989.

REVISTA ENFASIS ARGENTINA. Probióticos, algo mas que bactérias. uma era funcional., Buenos Aires, v. 6, n. 5, oct./nov. 2000. Disponível em: <[http://www.enfasis.com/ar\\_alim/2000\\_05/NOTA.html](http://www.enfasis.com/ar_alim/2000_05/NOTA.html)>. Acesso em: 03 jun. 2002.

ROWLANDS, B.J.; SOONG, C.V.; GARDINER, K.R. The gastrointestinal tract as a barrier in sepsis. **Br. Med. Bull.**, Edinburgh, v.55, n. 1, p. 196-211, 1999.

RUSHDY, A. A.; et al. Application of molecular methods to a nosocomial outbreak of *Salmonella enteritidis* phage type 4. **J. Hosp. Infect.**, San Diego, v.36, p.123-131, 1997.

RYCHLIK, I.; LOVELL, M. A.; BARROW, P. A. The presence of genes homologous to the K88 genes *faeH* on the virulence plasmid of *Salmonella gallinarum*. **Microbiology Letters**, v.159, p.255-260, 1998.

SAADIA, R. et al. Gut barrier function and the surgeon. **Br. J. Surg.**, Surrey, v. 77, p. 487-492, 1990.

SAAVEDRA, J.M.N. et al. Feeding of *Bifidobacterium* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of Rotavirus. **Lancet**, London, v. 344, p. 1046-1049, 1994.

SALMONELLA VILOSIDADES INTESTINAIS: PATOGÊNESE E VIRULÊNCIA. 2002. Disponível em: <<http://www.delphianos.com.br/biologia/microbiologia/arquivo.php?file=4>>. Acesso em: 01.jun.2002.

SCHAAF SMA, G. State of the art concerning probiotic strains in milk products. **Nutr. News**, Chicago, v.5, p. 23-24, 1996.

SCHIFFRIN, E. Los probioticos en la alimentación infantil. In: REUNIÓN SOBRE PROBIÓTICOS, 1999, Madrid. Madrid, 1999.

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

SILVA, E. N. Salmoneloses em galinhas. In: CURSO DE SANIDADE AVÍCOLA. Campinas: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola, 1992.

SMITH J.W.G. Memorandum of evidence to the agricultural committee inquiry on *Salmonella* in eggs. **Public Health Lab. Serv. Microbiol. Digest**, v. 6, p. 1-9, 1989.

SNOEYENBOS, G. H. Pullorum diseases. In: CALNEK, B. W.; et al. **Diseases of Poultry**. 9 ed. Ames: Iowa State University Press, 1991. p.73-86.

SNOEYENBOS, G. H.; et al. Large-scale trials to study competitive exclusion of *Salmonella* in chickens. **Avian Dis.**, Kennett Square, v.29, p.1004-1011, 1985.

STAAT, H. F.; MC GHEE, J. R. Application of basic principles of mucosal immunity in vaccine development. In: KIYONO, H.; OGRA, P.L.; MC GHEE, J.R. (Ed). **Mucosal vaccines**. San Diego, Academic Press, 1996.p.17-39.

STATISTICAL ANALYSES SYSTEM-SAS. Language guide for personal computer, 603, **Cary**: 1988.

STAVRIC, S.; et al. Competitive exclusion of *Salmonella* from new hatched chicks by mixture of pure bacterial cultures isolated from fecal and cecal contents of adult birds. **J. Food Protect.**, Ames, v.48, p.778-782, 1985.

SIITAS, Y.; HURME, M.; ISOLAURI, E. Downregulation of anti CD3 antibody induced IL-4 production by bovine caseins hydrolysed with *Lactobacillus* GG-derived enzymes. **Scand. J. Immunol.**, Oxford, v. 43, p. 687-689, 1996.

SIMON, G.L.; GORBACH, S.L. Intestinal flora in health and diseases. **Gastroenterology**, New York, v. 86, p. 174-193, 1984.

TANNOCK, G. W. Studies of the Intestinal Microflora: A Prerequisite for the Development of Probiotics. **Int. Dairy J.**, Barking, v.8, p.527-533, 1998.

TAUNAY, A. E.; et al. O laboratório de Saúde Pública e o problema da Salmonelose no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18., 1995, Santos. **Anais...** Santos, 1995. p.104.

TEJADA-SIMON, M. V.; USTUNOL, Z.; PESTKA, J. J.; Ex vivo effects of *Lactobacilli*, *Streptococci* and *Bifidobactéria* ingestion on cytokina and nitric oxide production in a murine model. **J. Food Prot.** 62, p. 162-169, 1999.

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

TRAVI ALIMENTOS. PROBIÓTICOS. Porto Alegre, 2002. Disponível em: <<http://www.travialimentos.com.br/probioticos.htm>>. Acesso em: 05.jun.2002.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS. **Atividades Acadêmicas UEG em 2001**. Patologia / Patógenos e Doenças do trato gastrointestinal / SALMONELLA ENTERITIDIS / SALMONELOSE. Goiânia, 2001. Disponível em: <http://www.shopping1.radiologico.nom.br/trabalho/estudo/patology/patogeno/salmone1.htm>. Acesso em : 03.fev.2005.

UNIVERSITY OF CAMBRIDGE. DEPARTMENT OF CLINICAL VETERINARY MEDICINE. **Mechanisms of immunity to food poisoning and vaccine serotypes of *Salmonella* in chickens**. Cambridge: Cambridge United Kingdom, 2001. Disponível em: <<http://www.vet.cam.ac.uk/research/sig.html>>. Acesso em: 01 jul. 2002.

UNITED STATE DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Pathogen reduction; hazard analysis and critical point (HACCP) systems. **Fed. Regist.**, Washington, v.60, p.6774-6889, 1995.

Van ZIJDERVELD, F. G.; et al. Serological detection of chicken flocks naturally infected with *Salmonella enteritidis*, using an enzyme-linked immunosorbent assay based on monoclonal antibodies against the flagellar antigen. In: ELISA FOR SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF *SALMONELLA* INFECTIONS IN POULTRY, 1993, United Kingdom. **Proceedings...** United Kingdom: Commission European, 1993. p.71-76.

VILLAR, R. G.; et al. Investigation of multidrug-resistant *Salmonella* serotype Typhimurium DT104 infections linked to raw-milk cheese in Washington State. **J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.281, p.1811-1816, 1999.

WEINACK, O.M. et al. Reciprocal competitive exclusion of *Salmonella* and *Escherichia coli* by native intestinal microflora of the chicken and turkey. **Avian Dis.**, Kennett Square, 1982 v.26, p.585-95.

WILLIAMS, R.C.; GIHHANS, R.J. Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: a mechanism of antigen disposal, **Science**, Washington, v. 177, p. 697, 1972.

WILLINER. Efecto de uma fórmula de probióticos sobre la producción de inmunoglobulinas A em niños normales. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 42, n. 1-2, p. 39-44, jun.1998.

WOLD, A.; HANSON, L.A. Defense factors in human milk. **Curr. Opin Gastroenterol.**, Philadelphia, v. 10, p. 652-658, 1994.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice Hall, 1996. 718 p.

ZHANG-BARBER, L.; TURNER, A. K.; BARROW, P. A. Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. **Vaccine**, v. 17, p. 2538-2545, 1999.

ZIPRIN, R. L.; et al. Intracloacal *Salmonella typhimurium* infection of broiler chickens: reduction of colonization with anaerobic organisms and dietary lactose. **Avian Dis.**, Kennett Square, v.34, p.749-753, 1990.

ZIPRIN, R.L. et al. Colonization control of lactose fermenting *Salmonella typhimurium* in young broiler chickens by use of dietary lactose. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 52, p. 833-837, 1991.

ZIPRIN, R. L.; CORRIER, D. E.; DeLOACH, J. R. Control of established *Salmonella typhimurium* intestinal colonization with in vivo-passaged anaerobes. **Avian Dis.**, Kennett Square, v.37, p.183-188, 1993.