**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

# MORFOLOGIA DOS CECOS DE PINTOS DE CORTE SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM MICROBIOTA CECAL ANTES E APÓS INFECÇÃO POR *Salmonella* Enteritidis

Elton Vinicius Sterzo
Médico Veterinário

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL**
**Fevereiro de 2011**

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

# MORFOLOGIA DOS CECOS DE PINTOS DE CORTE SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM MICROBIOTA CECAL ANTES E APÓS INFECÇÃO POR *Salmonella* Enteritidis

Elton Vinicius Sterzo

Orientadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Boleli

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Área de Patologia Animal)

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL**
**Fevereiro de 2011**

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**ELTON VINICIUS STERZO -** nascido em 24 de setembro de 1978, no Município de Leme, Estado de São Paulo. Ingressou em março de 2000 no Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal (FCAV-UNESP-Jaboticabal), concluindo-o em dezembro de 2004. Em março de 2005, iniciou o Curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Animal na FCAV-UNESP-Jaboticabal, concluindo-o em fevereiro de 2007. Ingressou em março de 2007 no Curso de Doutorado do mesmo programa. Em setembro de 2007, após aprovação em concurso público na Prefeitura do Município de Leme/SP atuou como Médico Veterinário no Centro de Controle de Zoonoses até 2009, e atualmente é o Responsável Técnico do Parque Ecológico Mourão (Zoológico) em Leme-SP. Também é docente do curso de Medicina Veterinária (Disciplinas de Patologia Geral e Ornitopatologia) da Anhanguera Educacional S.A. desde 2008.

**“Nós não somos o que gostaríamos de ser. Nós não somos o que ainda iremos ser. Mas, graças a Deus. Não somos mais quem nós éramos.”**

**Martin Luther King**

## DEDICATÓRIA

**A minha família sem os quais nada do que eu faço teria a menor importância.**

**Dedico.**

## OFERECIMENTO

**A Fernanda Michele Satake Sterzo cujo apoio, dedicação, paciência e amor me ajudaram a superar as dificuldades e apreciar as conquistas alcançadas.**

**Ofereço**

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

**A professora Dra. Isabel Cristina Boleli que me mostrou o valor do aprendizado e o amor ao ensinamento**

*“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”*

*(Cora Coralina)*

## AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, especialmente ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal e Patologia Veterinária, pela acolhida e aprendizagem.

A Profa. Dra. Isabel Cristina Boleli, pela orientação e confiança durante todos esses anos de trabalho, meu muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Ângelo Berchieri Júnior, a quem muito admiro, pela disponibilidade, incentivo e amizade.

Aos professores Antonio Carlos Paulillo, Julieta Engracia Ruas de Moraes, Vera Maria Barbosa de Moraes e Laura Satiko Okada Nakaghi pela participação na banca de qualificação.

Aos Professores Antonio Carlos Alessi, Maria Rita Pacheco, Adriano Sakai Okamoto e Ana Maria Iba pela participação na defesa da tese.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia e de Patologia, sobretudo Sr. Orandi, Sr. Antônio e D. Cida.

Aos meus pais Ethocles (*in memorian*) e Elza, por sempre me apoiarem nas minhas escolhas pessoais e profissionais.

Ao meus irmãos Clayton, Christiane e Everton, que sempre me encorajavam e demonstravam apoio.

A minha esposa Fernanda. Suas palavras de conforto e incentivo me ajudaram a concluir este trabalho.

Às minhas cunhadas Lucídia e Ana, meus cunhados Franco, Rafael e Sandro e Michele, Sr. Tossao e D. Julia, minha família de escolha.

Aos meus sobrinhos, Carolina, Arthur, Sofia e Theo.

A Prefeitura do Município de Leme, em especial o pessoal da Zoonoses e do Zoológico.

Ao pessoal da Anhanguera Educacional.

A Jack Boldrin e Aline Mesquita, pela amizade e pelo auxílio no laboratório.

À FAPESP pela concessão de auxílio pesquisa.

Ao Ensino Público Brasileiro

Agradeço a todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho e que a memória me fez esquecer de mencionar.

## SUMÁRIO


| | PAG |
|---|---|
| LISTA DE ABREVIAÇÕES ..... | xiii |
| LISTA DE TABELAS ..... | xiv |
| LISTA DE FIGURAS ..... | xvi |
| RESUMO ..... | xix |
| SUMARY ..... | xx |
| 1. INTRODUÇÃO ..... | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA ..... | 3 |
| *2.1.Salmonella* ..... | 3 |
| 2.2. Salmoneloses Aviárias ..... | 4 |
| 2.3. Epidemiologia da *Salmonella* ..... | 5 |
| 2.4. Patogenia ..... | 7 |
| 2.5. Desenvolvimento e Saúde Intestinal ..... | 9 |
| 2.6. Exclusão Competitiva ..... | 11 |
| 2.7. Células caliciformes ..... | 13 |
| 3. OBJETIVOS ..... | 15 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS ..... | 16 |
| 4.1. Aves e Manejo Experimental ..... | 16 |
| 4.2. Delineamento Experimental ..... | 17 |
| 4.3. Suspensão Bacteriana para Inoculação ..... | 17 |
| 4.4. Contagem de Colônias de Bactérias ..... | 17 |
| 4.5. Suspensão Bacteriana de Exclusão Competitiva (EC) para Inoculação ..... | 18 |

4.6. Condições Clínicas e Mortalidade, e Exame Histológico e Ultra-estrutural dos Cecos ..... 19
4.7. Analise Estatística ..... 21
5. RESULTADOS ..... 22
5.1. Condições Clínicas e Mortalidade ..... 22
5.2. Achados de necropsia ..... 22
5.3. Descrição Morfológica dos Cecos ..... 22
5.4. Descrição Histológica dos Ceco ..... 28
5.5. Análise morfométrica dos Cecos ..... 38
5.6. Quantificação de células inflamatórias ..... 49
5.7. Quantificação de Células caliciformes ..... 53
6. DISCUSSÃO ..... 57
6.1. Condições Clínica, Dados de Necropsia e Mortalidade..... 57
6.2. Características Histológicas, Morfométricas e Contagens de Células Inflamatórias e Células Caliciformes..... 58
7. CONCLUSÕES ..... 63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 64
ANEXO I – RAÇÃO ..... 78
ANEXO II – DADOS MICROBIOLÓGICOS ..... 79

## LISTA DE ABREVIAÇÕES

| | |
|---|---|
| Exclusão Competitiva ..... | EC |
| Microbiota cecal ..... | MC |
| *Salmonella* Enteritidis ..... | SE |
| Infectados ..... | I |
| Machos ..... | M |
| Fêmeas ..... | F |
| Células caliciformes Alcian Blue Positivas ..... | AB+ |
| Células caliciformes Ácido Periódico de Schiff Positivas ..... | PAS+ |
| Hematoxilina – Eosina ..... | HE |
| Microscopia Eletrôinica de Varredura ..... | MEV |

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Efeitos dos sexos e tratamentos sobre a altura (µm) e largura (µm) das pregas cecais, em pintos de corte no 1º, 3º, 5º e 7º dpi ..... 40

**Tabela 2.** Interação entre os sexos e tratamentos sobre a altura (µm) e largura das pregas cecais, em pintos de corte no 7º dpi. ..... 41

**Tabela 3.** Efeitos dos sexos e tratamentos sobre a espessura da parede cecal (µm) nas pregas cecais, em pintos de corte no 1º, 3º, 5º e 7º dpi..... 43

**Tabela 4.** Interação entre os sexos e tratamentos sobre a espessura da parede cecal (µm) nas pregas cecais, em pintos de corte no 7º dpi..... 44

**Tabela 5.** Efeitos dos sexos e tratamentos sobre espessura (µm) das túnicas mucosa e muscular, em pintos de corte no 1º, 3º, 5º e 7º dpi..... 47

**Tabela 6.** Interação entre os sexos e tratamentos sobre a espessura da túnica mucosa (µm) e muscular, em pintos de corte..... 48

**Tabela 7.** Efeitos dos sexos e tratamentos sobre o número de células inflamatórias em 1000 µm$^2$ de mucosa e submucosa das pregas cecais, em pintos de corte no 1º, 3º, 5º e 7º dpi..... 51

**Tabela 8.** Interação entre os sexos e tratamentos sobre o número de células inflamatórias em 1000 µm$^2$ de mucosa e submucosa das pregas cecais em pintos de corte..... 52

**Tabela 9.** Efeitos dos sexos e tratamentos sobre o número de células caliciformes (AB+) e (PAS+) em 300 µm de epitélio das pregas cecais, em pintos de corte no 1º, 3º, 5º e 7º dpi..... 55

**Tabela 10.** Interação entre os sexos e tratamentos sobre o número de células caliciformes AB+ e PSA+ em 300 $\mu m^2$ de epitélio cecal de pintos de corte..... 56

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Eletronmicrografias de varredura da superfície luminal do epitélio cecal de pintos machos (A-D) e fêmeas (E-H) não infectados com SE (A e E), infectados com SE (B e F), submetidos a exclusão competitiva após (C e G) e antes (D e H) da infecção com SE, no 1º dia pós-infecção. Barras: 100µm ..... 24

**Figura 2.** Eletronmicrografias de varredura da superfície luminal do epitélio cecal de pintos machos (A-D) e fêmeas (E-H) não infectados com SE (A e E), infectados com SE (B e F), submetidos a exclusão competitiva após(C e G) e antes (D e H) da infecção com SE, no 3º dia pós-infecção. Barras: 100µm..... 25

**Figura 3.** Eletronmicrografias de varredura da superfície luminal do epitélio cecal de pintos machos (A-D) e fêmeas (E-H) não infectados com SE (A e E), infectados com SE (B e F), submetidos a exclusão competitiva após(C e G) e antes (D e H) da infecção com SE, no 5º dia pós-infecção. Barras: 100µm..... 26

**Figura 4.** Eletronmicrografias de varredura da superfície luminal do epitélio cecal de pintos machos (A-D) e fêmeas (E-H) não infectados com SE (A e E), infectados com SE (B e F), submetidos a exclusão competitiva após(C e G) e antes (D e H) da infecção com SE, no 7º dia pós-infecção. Barras: 100µm ..... 27

**Figura 5.** Seções histológicas dos cecos de pintos machos não infectados com SE (NI, A-D), infectados com SE (I, E-H), submetidos à exclusão competitiva após (IEC, I-L) e antes (ECI, M-P) da infecção com SE, no 1°, 3°, 5° e 7° dias pós-tratamentos. Coloração HE. Barras: 500µm..... 30

**Figura 6.** Seções histológicas dos cecos de pintos fêmeas não infectados com SE (NI, A-D), infectados com SE (I, E-H), submetidos à exclusão competitiva após (IEC, I-L) e antes (ECI, M-P) da infecção com SE, no 1°, 3°, 5° e 7° dias pós-tratamentos. Coloração HE. Barras: 500 µm. ..... 31

**Figura 7.** Cortes histológicos dos cecos de pintos machos não infectados com *Salmonella* Enterititis, mostrando detalhe da dobra cecal (A), dos vilos e criptas de sua camada mucosa (B) e da rara infiltração de leucócitos (LEU) na mucosa. C: cripta, Mm: Muscular da Mucosa, M: camada muscular, Mu: camada mucosa, SMU: camada sub-mucosa S: camada serosa, V: vilos. Coloração HE. Barras: 200 µm (A), 200 µm (B), 50 µm (C)..... 32

**Figura 8.** Cortes histológicos do ceco de pintos machos infectados com *Salmonella* Enterititis no 1°, 3°, 5° e 7° dia pós infecção (figuras A, B, C e D, respectivamente), mostrando a proliferação do tecido conjuntivo da submucosa e o aumento de tamanho e perda das características morfológicas das pregas cecais, após infecção. C: cripta, Mm: Muscular da Mucosa, M: camada muscular, SMU: camada sub-mucosa, Mu: camada mucosa, S: camada serosa, V: vilos. Coloração HE. Barras: 200 µm..... 33

**Figura 9**. Cortes histológicos dos cecos de pintos de corte infectados com *Salmonella* Enterititis, mostrando a alta infiltração de leucócitos polimorfonucleares (PMN) na mucosa (A) detalhe das criptas da camada mucosa e camada submucosa (B), e perda de células epiteliais (C). C: cripta, Mm: Muscular da Mucosa, LEU: leucócitos, M: camada muscular, Mu: camada mucosa, SMU: camada submucosa. Coloração HE. Barras: 50 µm ..... 34

**Figura 10.** Cortes histológicos dos cecos de pintos machos, submetidos a exclusão competitiva após infecção com *Salmonella* Enteritidis, mostrando detalhe das dobras cecais no 1°, 3°, 5° e 7° dia pós infecção (figuras A, B, C e D, respectivamente), (A). C: cripta, Mm: Muscular da Mucosa, M: camada muscular, SMU: camada sub-mucosa, Mu: camada mucosa, V: vilos. Coloração HE. Barras: 200 µm..... 35

**Figura 11**. Cortes histológicos dos cecos de pintos de corte machos submetidos a exclusão competitiva após infecção com *Salmonella* Enteritidis mostrando a alta infiltração de leucócitos na mucosa (A) detalhe dos vilos e criptas da camada mucosa (B), perda de células epiteliais (C). C: cripta, Mm: Muscular da Mucosa, LEU: leucócitos, Mu: camada mucosa, V: vilos. Coloração HE. Barras: 50 µm..... 36

**Figura 12.** Cortes histológicos do ceco de pintos machos, submetidos à exclusão competitiva antes da infecção com *Salmonella* Enteritidis, mostrando detalhe das dobras cecais no 1°, 3°, 5° e 7° dia pós infecção (figuras A, B, C e D, respectivamente), (A). C: cripta, M: camada muscular, SMU: camada submucosa, Mu: camada mucosa, S: camada serosa, V: vilos. Coloração HE. Barras: 200 µm..... 37

# MORFOLOGIA DOS CECOS DE PINTOS DE CORTE SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM MICROBIOTA CECAL ANTES E APÓS INFECÇÃO POR *Salmonella* Enteritidis

**RESUMO –** O presente estudo teve por objetivo descrever as alterações morfológicas ocorridas nos cecos de pintos de corte, machos e fêmeas, tratados com Microbiota Cecal (MC) antes e após infecção por *Salmonella enterica enterica* sorovar Enteritidis (SE) durante a primeira semana de vida. No 1º dia de vida, os pintos foram tratados com MC antes e depois da infecção por SE. Durante todo o período experimental as condições clínicas, assim como a taxa de mortalidade foram observadas. No 1º, 3º, 5º e 7º dias pós infecção (dpi) quatro aves de cada sexo/tratamentos foram sacrificadas por meio de deslocamento cervical para obtenção de amostras do ceco para análises morfológicas (histologia e microscopia eletrônica de varredura), morfométricas e contagem do número de células inflamatórias e células caliciformes PAS+ e AB+. Os dados mostraram alguns episódios de diarréia e quadros de depressão nos pintos infectados com SE no 5º e 7º dpi; nesse período não foi observada mortalidade. No tocante às análise morfológicas, os pintos infectados por SE respondem ao processo infeccioso com um processo inflamatório agudo no 1º dpi, e a partir do 3º dpi, o processo se cronifica. A Microbiota Cecal (MC) antes da infecção, evita as alterações morfofuncionais causadas pela bactéria nos cecos dos pintos de corte, além disso, a MC induz a proliferação de células caliciformes PAS+ e AB+ e, conseqüentemente aumenta a produção de muco, sendo um fator de proteção ao epitélio cecal.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ceco, microbiota cecal, morfologia, *Salmonella* Enteritidis

# MORPHOLOGY OF BROILER CHICKENS CAECUM SUBMITTED TO CECASL MICROBIOTA TREATMENT BEFORE AND AFTER INFECTION WITH *Salmonella* Enteritidis

**ABSTRACT** - This study aimed to describe the morphological changes occurred in the caecu, of males and females broiler chickens treated with Cecal Microbiote (CM) before and after the infection with *Salmonella enterica enterica* serovar Enteritidis (SE) during the first week of life. On the first day of life, chickens were treated with CM before and after the infection with SE. Throughout the experimental period, the clinical conditions as much as the mortality rates were observed. On 1st, 3rd, 5th and 7th days post infection (dpi), four birds of each sex/treatment were slaughtered by cervical dislocation in order to obtain samples from the caecum for morphological analysis (histology and scanning electron microscopy), morphometrical analysis and counting of the number of inflammatory and goblet cells PAS+ and AB+. The data showed some diarrhea episodes and depression symptoms in the chickens infected with SE on 5th and 7th dpi; in this period it was not observed any mortality. Concerning the morphological analysis, the chicks infected with SE respond to infectious process with and acute inflammatory process on 1st dpi and after the 3rd dpi the process gets chronicle. The Cecal Microbiote (CM) prior to infection avoid the morphological and functional alterations caused by the bacteria in broiler chickens caecum, in addition, the CM induces the proliferation of goblet cells PAS+ and AB+ and consequently increases mucus production being a protection factor to the caecum epithelium.

**KEYWORDS:** Caecum, cecal microbiote, morphology, *Salmonella* Enteritidis

## 1. INTRODUÇÃO

A indústria avícola brasileira organizou-se de forma intensiva no início da década de 1960 e, atualmente, ocupa o lugar de maior exportador e terceiro produtor mundial de carne de aves (ABEF, 2010). Ela emprega quase cinco milhões de pessoas, e é a 6º cadeia econômica mais importante do país no tocante às exportações (BAMPI, 2010).

O desenvolvido da atividade avícola decorre do desenvolvimento tecnológico, no qual se destaca a utilização de técnicas modernas de manejo e nutrição durante a criação das aves (DICKEL, 2004). A potencialização da criação no menor espaço possível, entretanto, tem favorecido a introdução e a disseminação de patógenos que são responsáveis por enfermidades aviárias como as salmoneloses, que por meio de produtos de origem avícola, podem causar doenças de origem alimentar em seres humanos.

*Salmonella* Enteritidis (SE) emergiu como um grande problema avícola e de saúde pública no Brasil a partir de 1993 (SILVA & DUARTE, 2002). Segundo ROBERTS & SOCKETT (1994), o impacto econômico causado pela *Salmonella* Enteritidis não atinge somente a indústria avícola, mas também a economia dos países. Em 1993, nos Estados Unidos, estima-se que foram gastos cerca de 3,5 milhões de dólares decorrentes de gastos médicos.

A prevenção de salmonelas constitui-se em preocupação prioritária dos profissionais envolvidos no processo de criação e exploração de aves. Esta área da sanidade avícola tem recebido nos últimos anos maior relevância, por sua relação com saúde pública. Dessa forma, métodos de controle e o estabelecimento da biossegurança nas integrações avícolas tornaram-se ferramentas imprescindíveis na criação comercial de aves e uma exigência para atender as demandas no comércio internacional de produtos avícolas.

Vários métodos têm sido testados a fim de combater ou controlar a colonização do trato intestinal por salmonelas. Um deles, e que vem mostrando-se eficaz durante anos, é o método da Exclusão Competitiva (EC) ou Conceito de "Nurmi". Ele consiste na administração oral de microbiota intestinal de aves adultas em aves recém eclodidas, com o objetivo de acelerar a colonização

intestinal por microrganismos benéficos, evitando a infecção por bactérias indesejáveis (NURMI & RANTALA, 1973).

Segundo SCHNEITZ & MEAD (2000), o tratamento com EC, cria um ambiente fisiológico restritivo, envolvendo a produção microbiana de ácidos graxos voláteis (AGV) e um baixo potencial de oxi-redução, concorrência entre os micróbios por receptores específicos, produção de substâncias antibióticas (tais como bacteriocinas por alguns microrganismos) e concorrência microbiana por nutrientes essenciais. Contudo, parece improvável que apenas um único mecanismo seja inteiramente responsável pelo efeito protetor do tratamento com Exclusão Competitiva.

Embora a identidade exata dos organismos-chave de proteção seja desconhecida, há evidências que eles ocorram em níveis de $10^7$-$10^8$/g de peso úmido do ceco ou material fecal em aves doadoras (BLANCHFIELD *et al*., 1984; ZIPRIN *et al*., 1990)

A complexidade da microbiota parece ser importante para a proteção da ave. STRAVIC (1987) citado por REVOLLEDO *et al* (2006) demonstrou que os probióticos, com culturas definidas de microrganismos, têm sido menos eficientes que as culturas microbians indefinidas de EC na proteção contra a colonização intestinal por *Salmonella*.

Segundo BARNES & IMPEY (1970), BARNES & IMPEY (1972) e MEAD & ADAMS (1975), o ceco das aves são os locais privilegiados para a colonização por enteropatógenos, tais como *Salmonella*, porque as condições químicas e físicas são relativamente constantes, e há um abundante fornecimento de nutrientes endógenos e exógenos.

No entanto, o ceco também contém a maior e mais complexa microbiota de qualquer outra região do trato gastrointestinal, e é com esses organismos que as salmonelas devem concorrer para a sua sobrevivência (REVOLLEDO *et. al*., 2006).

# 2. REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1. Caracterização do gênero *Salmonella*

As salmonelas são microorganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Na classificação apresentada pelo Manual Bergey, todos os sorotipos de *Salmonella* pertencem a duas espécies: *Salmonella bongori*, que contém menos de 10 sorotipos extremamente raros, e *Salmonella cholerasuis,* com 2500 sorotipos que dividem-se fenotípica e genotipicamente em seis subespécies (HOLT, 1994; GAST, 1997). POPOFF *et al*. (1996) apresentaram uma proposta de reclassificação do gênero *Salmonella*, que passou a apresentar duas espécies: *Salmonella enterica* com seis subespécies (*enterica*, *salamae, diarizonae, arizonae*, *houtenae* e *indica*) e *Salmonella bongori*. Assim, com essa reclassificação, a designação da salmonela utilizada no presente estudo passou a ser *Salmonella entérica* subespécie *enterica* sorotipo Enterititis, podendo ser utilizada a forma simplificada *Salmonella* Enterititis.

Por definição, os organismos do gênero *Salmonella* são bastonetes curtos (0,7 - 1,5µ/ 2,0 - 5,0µ), gram-negativos, móveis com flagelos petríquios, sendo alguns imóveis. Eles são aeróbios e facultativamente anaeróbios, catalase positiva, oxidase negativa, fermentam açúcares com produção de gás, são produtores de $H_2S$. As salmonelas possuem uma complexa constituição antigênica (antígeno somático "O", flagelar "H", capsular "K") (HOLT, 1994; GAST, 1997).

A maior parte das culturas de *Salmonella sp* crescem em meio contendo citrato. Em meios comuns com nutrientes podem ser confundidos com coliformes. Sua detecção deve ser feita em órgãos de eleição, como o fígado, baço e ceco. As amostras podem ser plaqueadas diretamente em meios sólidos, seletivos para enterobactérias ou passar por processo de enriquecimento em caldos seletivos (Selenito, Tetrationato, Rappaport- Vassiliadis) (HOLT, 1994; GAST, 1997).

As salmonelas são mortas pelo calor, 55º por 1 hora ou 60º durante 15 a 20 minutos. Sua resistência a antibióticos foi observada inicialmente em 1958 por HUEY & EDWARDS, que estudaram amostras de *Salmonella* resistentes as tetraciclinas. Logo após, em 1962, cepas de *Salmonella* Typhimurium mostraram-

se resistentes a ampicilina, estreptomicina e sulfonamidas (HOLT, 1994; GAST, 1997).

A identificação das salmonelas como importantes causadoras de doença ocorreu há mais de 100 anos (LAX *et al*., 1995). Segundo dados do Center for Disease Control (CDC), bactérias do gênero *Salmonella* foram responsáveis por 43% dos surtos de doença em seres humanos causados por agentes bacterianos presentes em alimentos contaminados e por 51,3% dos casos clínicos de doenças dessa categoria, ocorridos nos Estados Unidos durante o período de 1973 a 1987 (BEAN, 1996). Anualmente, nesse mesmo país, cerca de 4 milhões de pessoas são infectadas por *Salmonella*, gerando custos médicos de até 3,8 bilhões de dólares/ano, constituindo-se no mais oneroso agente infeccioso transmitido por alimentos contaminados (ISAACSON *et al*., 1999). No ano de 2004, só na União Européia, 192.703 casos de salmonelose humana foram registrados (EFSA, 2005). Isso é facilmente compreendido, visto que as infecções por *Salmonella* também são difundidas através do comércio internacional de ração animal, animais vivos e alimentos (FORSHELL & WIERUP, 2006). A necessidade de cooperação global no controle da salmonelose tem sido enfatizada pela Organização Mundial da Saúde. No Brasil há poucos estudos detalhados que comprovam ser a *Salmonella* o principal agente etiológico causador das toxinfecções alimentares, uma vez que, além de existirem muitas subnotificações, também faltam confirmações diagnósticas.

## 2.2. Salmoneloses Aviárias

As salmonelas são agentes de infecções que afetam as aves, gerando prejuízos diretos ou indiretos à produção avícola, e que podem comprometer a saúde pública (BERCHIERI JÚNIOR *et al*., 2001; BUCHALA *et al*., 2006).

Nas aves, as salmonelas podem causar três enfermidades distintas: a pulorose, cujo agente é a *Salmonella* Pullorum; o tifo aviário, causado pela *Salmonella* Gallinarum; e o paratifo aviário, causado por salmonelas não espécie específicas (BERCHIERI JÚNIOR, 2000). São conhecidos mais de 2500 sorotipos de *Salmonella*, contudo cerca de 80 a 90 são os mais comuns em casos de

infecções em seres humanos e em animais. Dentre as salmonelas paratíficas, as mais comuns são: *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Montevideo, *Salmonella* Senftenberg e *Salmonella* Saint Paul (BERCHIERI JÚNIOR, 2000).

Pesquisas em países industrializados (Inglaterra, Estados Unidos da América e Canadá) têm mostrado aumento na ocorrência de *Salmonella* Enteritidis nos últimos anos (GAST & BEARD, 1990; BARROW, 1993). Segundo TAUNAY *et al.* (1996), no Brasil, esse passou a ser o sorotipo mais identificado nos casos de toxinfecção alimentar em seres humanos a partir da década de noventa, sendo que antes a *Salmonella* Typhimurium era a que mais prevalecia nos estudos relacionados aos produtos de origem animal destinados ao consumo humano.

### 2.3. Epidemiologia da *Salmonella*

As salmonelas, incluindo-se a *Salmonella* Enteritidis, além de causarem o paratifo aviário também são os principais agentes de toxinfecção alimentar em seres humanos, por intermédio da ingestão de alimentos de origem animal contaminados (BERCHIERI JÚNIOR, 2000).

Elas são carreadas por uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo animais silvestres, domésticos e o ser humano. Nas aves, muitos plantéis infectados por *Salmonella* Enteritidis não revelam sintomas da doença, o que dificulta seu diagnóstico e controle (SONCINI & BITTENCOURT, 2003). A bactéria é altamente invasiva nas aves, uma vez que entra por via oral e ganha rapidamente o intestino onde coloniza a mucosa (especialmente nos cecos) e invade a corrente sanguínea para chegar até os órgãos viscerais como fígado, baço e ovário (SONCINI & BITTENCOURT, 2003).

A infecção dos pintainhos com *Salmonella* Enteritidis ocorre de duas maneiras: verticalmente, por meio de ovos incubados que contém a bactéria em seu interior, e horizontalmente, pelas fezes do portador que elimina a bactéria infectando os indivíduos susceptíveis (SONCINI *et al.,* 2000).

De acordo com SONCINI *et al*. (2000), durante a fase de incubação, no momento de nascimento, pintainhos que excretam a bactéria no mecônio ainda

dentro dos nascedouros contribuem para a difusão do patógeno no ambiente. Desta forma, o número de pintainhos positivos multiplica-se devido à susceptibilidade dos mesmos. A infecção por *Salmonella* Enteritidis pode ingressar nestas aves por via oral, respiratória, umbigo ou cloaca.

A difusão horizontal ocorre pela exposição das aves às bactérias que ingressam na granja veiculadas por vetores animados ou inanimados. Inumeráveis fômites são causadores da entrada das salmonelas nas granjas, mas três deles são considerados os grandes veículos geradores da infecção: entrada de pintainhos de um dia provenientes de lotes de matrizes infectadas com *Salmonella* Enteritidis, entrada de ração contaminada e ambiente contaminado. No primeiro deles, apesar de poucos ovos serem portadores da bactéria, no momento da postura a contaminação destes acontece no ambiente, onde a bactéria penetra pelos poros da casca, favorecida pela falta de higiene do local, fezes nos ninhos, manipulação com mãos sujas e outros (SONCINI *et al*., 2000). No caso da contaminação ambiental, todos os elementos que constituem o entorno da granja podem estar contaminados, incluindo a estrutura física da granja, pessoas, vetores (roedores, pássaros, outros animais domésticos ou insetos), veículos e água (SONCINI & BITTENCOURT, 2003).

Os alimentos de origem animal são os principais responsáveis pela infecção humana; No caso dos alimentos de origem avícola (SANTOS *et al*. 2000; OLIVEIRA e SILVA, 2000), destaca-se os ovos e seus derivados (RODRIGUE *et al*.,1990; HUMPHREY,1994), principalmente a maionese caseira (SILVA & DUARTE, 2002). Segundo SIMÕES *et al*. (2001), ovos, seus derivados e pratos contendo os mesmos mal cozidos, foram os principais responsáveis por 115 surtos alimentares por SE ocorridos na região de Campinas-SP, sendo que a maionese caseira e a cobertura de bolos foram responsáveis por 57% e 15% dos casos, respectivamente.

A primeira evidência do envolvimento de *Salmonella* Enteritidis com infecção originada do consumo de alimentos preparados com ovos, ocorreu em um grande surto nos Estados Unidos em 1986, relacionado a uma massa

comercial congelada e recheada com uma mistura de queijo, condimentos esterilizados e ovos crus (SILVA & DUARTE, 2002).

No Brasil, o primeiro relato da ocorrência de sorotipo em aves, com sinais clínicos e mortalidade, foi apresentado por pesquisadores da Universidade de São Paulo (USP) em 1990 (FERREIRA *et al*., 1990). Estudos epidemiológicos, incluindo a fagotipagem e sonda complementar de rRNA, sugerem que a entrada de *Salmonella* Enteritidis no Brasil, deveu-se à importação de material genético avícola contaminado, provavelmente no final da década de 80 (SILVA & DUARTE, 2002).

A infecção de aves por *Salmonella* Enteritidis é tema de grande importância devido aos problemas relacionados à saúde animal e humana e às implicações disso sobre as exportações (AMENT *et al*., 1993), bem como pelos altos custos de seu diagnóstico e tratamento. Em um surto de toxinfecção alimentar por esse sorotipo, ocorrido na Inglaterra e no País de Gales e envolvendo 1482 indivíduos infectados, 73% dos custos foi diretamente associado com diagnóstico, tratamento e faltas ao trabalho (ROBERTS & SOCKETT, 1994).

## 2.4. Patogenia

O gênero *Salmonella* inclui sorotipos que produzem doença sistêmica e raramente estão envolvidos em infecção alimentar, como por exemplo *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Gallinarum, e sorotipos que produzem infecção alimentar e só ocasionam doença sistêmica sob circunstâncias particulares em animais muito jovens ou velhos e após algumas infecções de origem viral, e que correspondem à maioria das sorovares (BARROW *et al.,* 1997; UZZAU *et al.,* 2000; BARROW, 2007).

Após a ingestão oral, a *Salmonella* chega até a célula alvo que são as células epiteliais do intestino grosso, podendo ocasionar doença se a célula alvo estiver “vaga” em relação ao número de salmonelas. A disponibilidade da célula alvo depende do estado da flora intestinal normal (HIRSC, 2003). Se a microbiota for suprimida (estresse, antibióticos), então a dose infectante não precisa ser tão alta para a salmonela ter acesso à célula alvo (HIRSC, 2003).

Adesão, mediada por adesinas codificadas por um ou mais genes da bactéria, é o primeiro passo no processo de instalação da doença. Em seguida, as salmonelas são interiorizadas pela indução de ondulações na membrana das células alvo. A formação de ondulações também resulta em ativação da fosfolipase C, aumento subseqüente de cálcio intracelular, ativação da proteína cinase C e fosforilação das proteínas dos canais de íons cloreto e das proteínas de transporte iônico associadas à membrana, envolvidas na absorção de Na e Cl (HIRSC, 2003). Após invadir o tecido linfóide, incluindo placas de Peyer e tonsilas cecais das aves (ZHANG-BARBER *et al*., 1999), a *Salmonella,* migra da submucosa para vasos linfáticos, sendo fagocitada por células do sistema imune (HORMAECHE *et al*., 1993). A seguir, ela alcança a corrente sanguínea e instala-se no fígado, baço e medula óssea, onde ocorre sua multiplicação, cuja intensidade depende do sorotipo e da resistência genética do hospedeiro (HORMAECHE *et al*., 1993).

Aves enfermas podem ou não apresentar sinais clínicos que possibilitam detectar a infecção por salmonelas paratíficas (BARROW, 2000). Em aves jovens os sinais clínicos são: sonolência, diarréia, asas caídas e refugagem (BERCHIERI JÚNIOR, 2000). Nas aves adultas, raramente se observam sinais clínicos, mas as aves podem apresentar queda na produção de ovos, devido à alterações no ovário e oviduto, que podem apresentar-se atrofiados ou com folículos irregulares, hemorrágicos e necróticos (BLAXLAND *et al*., 1982; GAST, 1994; BERCHIERI JÚNIOR, 2000).

Segundo GAST (1997), a contaminação de ovos por *Salmonella* pode provocar mortalidade embrionária e de aves recém-nascidas, sem que ocorra a manifestação de sinais clínicos. Entretanto, estes sinais diminuem com a idade e são raramente observados em aves com mais de duas semanas de vida (BERCHIERI JÚNIOR, 2000), o que dificulta a detecção da infecção caso isso não tenha ocorrido nos primeiros dias de vida das aves.

## 2.5. Desenvolvimento e Saúde Intestinal

A alta produtividade da avicultura decorrente da grande demanda por produtos de origem avícola depende, dentre outros fatores, do rápido ciclo de produção e, principalmente, da obtenção adequada de nutrientes pela ave. Nesse contexto, de grande importância é a manutenção da sanidade das aves, principalmente no que se refere aos agentes que atuam sobre o trato gastrintestinal, pois esse responde pela digestão e absorção dos nutrientes para o desenvolvimento das aves.

Considerando que a ração representa de 70 a 80% dos custos de produção, a integridade dos mecanismos digestivos e absortivos dos nutrientes no trato digestivo, ou seja, a integridade das células epiteliais da mucosa gastrintestinal é de vital relevância para o bom desempenho das aves (MAIORKA *et al*., 2002).

A manutenção da integridade morfofuncional da mucosa gastrintestinal está diretamente relacionado com o processo contínuo e dinâmico de renovação de seu epitélio. Esse processo envolve dois eventos citológicos: proliferação e diferenciação celular, resultantes das divisões mitóticas sofridas por células indiferenciadas localizadas na cripta e ao logo dos vilos (UNI *et al*, 1998), e perda de células (extrusão), que ocorre normalmente no ápice dos vilos. As células resultantes das mitoses são impelidas para o vilo, diferenciam-se em um dos três tipos celulares (enterócitos, células neuro-endócrinas e células caliciformes) que formam o epitélio interno do intestino, e quando chegam ao topo do vilo (zona de extrusão) descamam para a luz do intestino. Neste caso, segundo CUNNINGHAN (1992), a população celular do epitélio é mantida em equilíbrio dinâmico, no qual as células geradas nas criptas são equivalentes ao número de células perdidas na zona de descamação.

A mucosa gastrintestinal, entretanto, possui grande plasticidade de resposta adaptativa à presença quantitativa e qualitativa de alimento e de microbiota no trato gastrintestinal, o que pode determinar uma taxa de proliferação e diferenciação celular diferente da taxa de extrusão, promovendo alterações no tamanho dos vilos. Assim, se ocorrer um aumento na taxa de mitose

concomitantemente com ausência, diminuição ou manutenção da taxa de extrusão, deverá ocorrer um aumento no tamanho dos vilos e até dobramento da parede dos mesmos. Se o estímulo levar a um aumento na taxa de extrusão, havendo manutenção ou diminuição da taxa de proliferação, a mucosa intestinal deverá responder com uma redução na altura dos vilos e, conseqüentemente, com uma diminuição em sua capacidade de digestão e absorção.

O maior ou menor desenvolvimento da mucosa é avaliado por meio de dados morfométricos do tamanho dos vilos, da profundidade das criptas, do número de vilos, altura do epitélio, altura e número de microvilos enterocíticos e integridade da mucosa (perda de epitélio).

Apesar do mecanismo proliferativo da mucosa ter sido mostrado já faz algum tempo, o *status* de diferenciação celular das células epiteliais (novos enterócitos) tem sido assunto de muitos estudos, e ainda não se encontra elucidado. A capacidade destes novos enterócitos em responder de forma aguda, ou seja, apresentarem “capacidade absortiva precoce” é assunto sob investigação. Trabalhos têm sugerido que a proliferação celular na cripta determina o aparecimento de “enterócitos imaturos” que apresentam baixa capacidade absortiva, bem como reduzida atividade das enzimas na bordadura em escova (GLEESON *et al*., 1972; MENGE & ROBINSON, 1978; BUTS *et al*., 1987).

Segundo ITO *et. al*., (2004), o termo saúde intestinal quer dizer que no intestino está havendo um equilíbrio dinâmico entre a mucosa gastrintestinal e o conteúdo luminal e que as características estruturais e funcionais da mucosa estão preservadas ou mantidas dentro do padrão esperado para o tipo, espécie e linhagem de ave e para uma determinada fase do seu ciclo vital.

Para compreender porque a saúde gastrintestinal é perdida, é importante lembrar que a mucosa e os enterócitos constituem uma barreira dinâmica e metabolicamente ativa que apresenta permeabilidade seletiva. Esta barreira possui função múltipla, que envolve a digestão, a captação seletiva e o transporte de substâncias específicas e de nutrientes e a exclusão de toxinas e de microorganismos através da imunidade inata e adquirida (ITO *et. al*., 2004).

Após a perda de grandes áreas na mucosa intestinal responsáveis pela digestão e absorção de nutrientes, seja pela ressecção de parte do intestino ou pela ação de agentes patogênicos, o epitélio remanescente torna-se hiperplásico com maior altura de vilo e profundidade de cripta (PORUS, 1965; DOWLING, 1992).

No caso de injúrias à mucosa intestinal, o processo de reconstituição inicia-se rapidamente após a lesão (5 a 30 minutos), sendo dependente da secreção de uma espessa camada de muco sobre a área injuriada (MAIORKA *et al*. 2002).

É importante entender que a barreira da mucosa é capaz de responder rapidamente e extensivamente através de adaptações morfológicas e funcionais em resposta às demandas do desenvolvimento ontogenético e desafios ambientais, nutricionais e patológicos.

No que se refere especificamente aos cecos intestinais, a manutenção da integridade morfofuncional de sua mucosa é essencial para a absorção de água e a digestão de aminoácidos, proteínas e celulose por uma microbiota cecal (MORTENSEN, 1984; CHAPLIN, 1989). Entretanto, faltam dados de literatura sobre a dinâmica funcional dos cecos, bem como sobre sua plasticidade de resposta frente a infecções por *Salmonella*.

## 2.6. Exclusão Competitiva

A indústria avícola é provida de um sistema de higiene e desinfecção bastante eficiente, principalmente nos incubatórios, o que torna o ambiente onde nascem as aves praticamente estéril. Desse modo, a colonização do trato digestório das aves demora mais tempo, deixando-as expostas a microrganismos indesejáveis nos primeiros dias de vida (FOWLER & MEAD, 1989).

Em condições naturais, aves jovens obtêm sua microbiota intestinal por contato direto com a mãe e com o meio ambiente. Entretanto, no dia a dia das granjas avícolas, as bactérias que colonizam o trato intestinal no início, tendem a persistir ao longo da vida da ave, passando a compor a microbiota intestinal.

Segundo SAVAGE (1987) e MILES (1993), os microrganismos que primeiro se estabelecem, na maioria dos casos, são aqueles que colonizam e persistem

durante toda a vida do animal. Assim, a colonização ocorre nas primeiras horas após o nascimento, desenvolvendo-se rapidamente e formando uma barreira de defesa, prevenindo o estabelecimento e multiplicação das bactérias patogênicas, como as do gênero *Salmonella* (FOWLER & MEAD, 1989; OLIVEIRA *et al*., 2000).

O termo “microbiota” é usado para descrever a população bacteriana que habita o intestino. A microbiota intestinal forma um sistema complexo e dinâmico, responsável por influenciar decisivamente fatores microbiológicos, imunológicos, fisiológicos e bioquímicos do hospedeiro (TANNOCK, 1998). A microbiota intestinal desempenha papel crucial no processo digestório, favorecendo o metabolismo dos carboidratos, intensificando a digestão do amido, metabolismo das proteínas, lipídios e minerais, síntese de vitaminas e digestão cecal dos componentes fibrosos. Indiretamente, a microbiota bacteriana equilibrada contribui com a exclusão e/ou competição com bactérias patogênicas como *Escherichia coli*, *Clostridium* sp. e *Salmonella* sp. (ITO *et al*., 2004).

MILES (1993) relata que a população microbiana normal do trato intestinal age no hospedeiro como uma barreira de defesa, através da criação de um meio ambiente nocivo aos microrganismos patogênicos. Essa população microbiana normal, formada por microrganismos protetores, é adquirida durante as seis primeiras semanas de vida por aves de exploração comercial.

A exclusão competitiva (EC) ou conceito de Nurmi consiste na administração de microbiota intestinal de aves adultas em aves recém eclodidas no intuito de acelerar a colonização intestinal por microrganismos benéficos, excluindo aqueles indesejáveis (NURMI & RANTALA, 1973). O mecanismo de exclusão competitiva ainda não está elucidado, mas sabe-se que a proteção das aves por meio de EC é efetiva contra uma série de sorotipos de *Salmonella*, incluindo aqueles que podem causar mortalidade em aves muito jovens e também toxinfecção alimentar em seres humanos (LLOYD *et al*., 1997).

A microbiota pode ser considerada um “órgão” metabolicamente ativo, sujeito a variação na composição e número de espécies presentes (SAAVEDRA & TSCHERMIA, 2002). Os benefícios da microbiota equilibrada proporcionam a inibição do crescimento de bactérias patogênicas, estímulo ao sistema imune

(influenciando o número, distribuição e grau de ativação da população de células do sistema imune intestinal), síntese de vitaminas (B, B9, K e E), redução da produção de gases e melhor digestão e absorção dos nutrientes. Por outro lado, variações extremas que resultam em excessiva oferta de substrato ou supressão das bactérias benéficas podem apresentar efeitos prejudiciais ao hospedeiro, como diarréia, infecções, distúrbios hepáticos, carcinogênese, putrefação intestinal, redução da digestão e absorção de nutrientes (WELTIZIEN, 2003).

O equilíbrio microbiano intestinal está relacionado a vários fatores, entre eles podemos citar: fatores nutricionais (proteínas enzimáticas intestinais, ácidos biliares conjugados e uréia), condições ambientais (oxigênio, temperatura, pH, peristaltismo, *turnover* da célula epitelial, muco, dieta, presença de células fagocíticas, genética e idade do hospedeiro) e fatores microbianos (ácido lático, ácidos graxos voláteis, motilidade, antibióticos, competição por nutrientes e aderência ao epitélio) (MILES *et al*., 1993).

### 2.7. Células caliciformes

Segundo JUNQUEIRA & CARNEIRO (2008), a célula caliciforme é uma glândula unicelular presente no revestimento interno do intestino e no trato respiratório. Esta célula caracteriza-se pela presença de núcleo oval na sua região basal e de numerosos grânulos de secreção de grande tamanho em sua região apical. Quando a secreção glicoprotéica é liberada pela célula, ela se torna altamente hidratada e forma uma camada de muco sobre a superfície do epitélio intestinal. Essa camada de muco protege os microvilos contra atritos provocados pela passagem da digesta, ação das enzimas digestivas, suco gástrico e agentes patogênicos (FORSTNER & FORSTNER, 1994; FORSTNER *et al*., 1995), assim como a perda de água através da parede intestinal (MURPHY, 2002). As mucinas, podem ser ácidas ou neutras, são sintetizadas e secretadas, pelas células caliciformes (UNI et al., 2003), as quais encontram-se distribuídas ao longo dos vilos e possuem um curto período de vida e são constantemente substituídas. Estas células são originárias de células totipotentes, localizadas nas criptas e que sofrem mitoses, cujas células filhas diferenciam-se dando origem aos diferentes

tipos celulares que compõem o epitélio do intestino delgado (CHENG & LEBLOND, 1974).

A mucina ácida funciona como barreira bacteriana (FONTAINE *et al.* 1996; ROBERTON & WRIGHT, 1997) ou sítio de ligação para a microbiota intestinal. Segundo PIRES (2008), aquisição precoce de microbiota pelos pintos de corte aumenta o número de células caliciformes produtoras de mucina neutra (PAS+) e ácida (AB+), e a porcentagem de vilos íntegros no intestino, que podem afetar as funções de absorção e de proteção do intestino delgado.

Pouco se sabe sobre os mecanismos de controle da síntese, secreção e distribuição das mucinas pelas células caliciformes no intestino, e sobre seu comportamento quanto às mudanças na dieta (SMIRNOV *et al*., 2004), processos patogênicos e se ocorrem diferenças entre os sexos, mas nada se conhece sobre isso nos cecos.

## 3. OBJETIVOS

Considerando a falta de dados na literatura e a importância do tema, o objetivo do presente trabalho foi:

### Gerais

Estudar o efeito da infecção por *Salmonella enterica enterica* sorotipo Enteritidis diante do tratamento com Microbiota Cecal antes e após a infecção sobre pintos de corte, machos e fêmeas, durante a primeira semana de vida, com ênfase na morfologia dos cecos.

### Específicos

Para atingir os objetivos gerais, foram analisados:

- Sinais clínicos;
- Porcentagem de mortalidade;
- Achados de necropsia;
- Morfologia cecal;
- Morfometria cecal (altura e largura das dobras cecais, espessuras da parede cecal, da mucosa e submucosa);
- Número de células caliciformes no ceco e,
- Infiltração de células inflamatórias no ceco.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental utilizado no presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal (protocolo n° 025222/10).

### 4.1. Aves e Manejo Experimental

Foram utilizados 128 pintos (64 machos e 64 fêmeas) recém-eclodidos, de linhagem de corte (Cobb® 500), obtidas de um Incubatório Comercial brasileiro. Os pintos não tinham *Salmonella* Enteritidis e foram provenientes de matrizes com 32 semanas de idade não vacinadas contra salmonelose. A ausência de *Salmonella* foi confirmada realizando-se exames microbiológicos por meio de suabes do mecônio presente nas caixas onde os pintos estavam alojados.

As aves foram alojadas em caixas de madeira teladas, previamente desinfetadas com amônia quaternária na concentração de 50% (AMQ-50® - Des-Vet), e mantidas durante todo o experimento na Unidade Experimental, do Departamento de Patologia Veterinária (DPV). As caixas contendo as aves foram mantidas em sala desinfetada, equipada com controle de luminosidade e temperatura (33ºC) e de um sistema de fluxo negativo, com filtros microbiológicos que não permite a saída e/ou entrada de microrganismos do e para o interior da sala. O acesso à sala de experimentos foi realizado através de uma ante-sala de troca de roupa e paramentação, utilizando-se máscaras, gorros, propés e jalecos plásticos, luvas de látex e óculos de proteção, descartáveis. Todos os equipamentos foram desinfetados diariamente com amônia quaternária a 50% (AMQ-50® - Des-Vet) e glutaraldeído a 30% (Obanol® Fatec S.A), e os demais resíduos (restos de ração, cama, etc) autoclavados, para posterior descarte. O manejo diário das aves seguiu as normas de biosseguridade preconizadas pelo Laboratório de Ornitopatologia, do DPV, para evitar-se contaminação cruzada entre os tratamentos experimentais e uma possível contaminação ambiental.

As aves foram alimentadas com água e ração comercial isenta de antimicrobianos e anticoccidianos (Anexo I) "*ad libitum*". A cama composta de maravalha foi autoclavada antes do uso.

**4.2. Delineamento Experimental**

As aves foram separadas em 2 grupos, machos e fêmeas (sexagem pelo empenamento). Para cada sexo, elas foram distribuídas homogeneamente pelo peso corporal em 4 tratamentos **(**não infectados com *Salmonella* Enteritidis: NI, infectados com *Salmonella* Enteritidis: I, infectados com *Salmonella* Enteritidis e tratados com Microbiota Cecal (MC) como Exclusão Competitiva (EC) 24 h após infecção: IEC, e tratados com Microbiota Cecal (MC) como Exclusão Competitiva (EC) e infectados com *Salmonella* Enteritidis 24 h após tratamento: ECI), sendo 4 repetições de 4 aves por tratamento por sexo. Dessa forma, o experimento seguiu um arranjo fatorial 2 (machos e fêmeas) x 4 (tratamentos), sendo cada ave uma parcela. Os dados foram obtidos no 1º, 3º, 5º e 7º dia pós-tratamentos.

**4.3. Suspensão Bacteriana para Inoculação**

Foi utilizado um mutante espontâneo de *Salmonella* Enteritidis, resistente ao ácido nalidíxico e a espectinomicina (SE Nal/Spec), mantido pelo Laboratório de Ornitopatologia, do DPV da FCAV-Unesp de Jaboticabal. O preparo da cultura e do inóculo bacteriano seguiu a metodologia utilizada por OLIVEIRA *et al.* (2000). A cultura foi preparada em caldo nutriente (OXOID CM 67) e incubada sob agitação (100 movimentos/minuto) a 37°C durante 24 horas. A partir desta cultura (1,2 x $10^9$ células viáveis por mL de cultivo), o inóculo foi preparado diluindo-se 1mL de cultura (1:1000) em caldo nutriente. A administração endoesofágica de 100 µL de SE Nal/Spec por ave foi ainda no primeiro dia de vida dos pintos e utilizando-se uma cânula de 3mm de diâmetro.

**4.4 Contagem de Colônias de Bactérias**

A contagem de *Salmonella* foi realizada segundo metodologia usada por BARROW *et al*. (1987), Para isso, o conteúdo cecal de cada ave foi diluído (1:10)

em tampão fosfato (PBS, 0,1 Molar e pH 7,4). Em seguida, 0,1mL desta suspensão foi submetida a 5 diluições decimais seriadas (até $1:10^6$) e 0,1mL de cada uma das diluições foi utilizado para plaqueamento sobre ágar verde brilhante contendo ácido nalidíxico (100μg/mL) e espectinomicina (100μg/mL). A contagem das colônias foi realizada após 24 horas de incubação a 37°C. Os dados foram expressos como número de unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de conteúdo cecal. Estes valores foram transformados em $\log_{10}$ para análise e interpretação dos resultados. Contagens (log10) inferiores a 2 UFC de SE foram indicativas de ausência da bactéria.

Como descrito por STERZO *et al*. (2008), as aves dos tratamentos I e IEC apresentaram infecção por SE durante todo o período experimental, enquanto que as aves dos tratamentos ECI não a apresentaram. Além disso, houve diferença entre os sexos no 7º dia pós-tratamento, no qual machos do tratamento I apresentaram contagem menor de *Salmonella* que as fêmeas do mesmo tratamento, machos do tratamento IEC tiveram maior contagem que as fêmeas do mesmo tratamento, machos do tratamento I tiveram maior a contagem de *Salmonella* que os machos do tratamento I e as fêmeas do tratamento I tiveram maior contagem que as fêmeas do tratamento IEC (Anexo II).

### 4.5. Suspensão Bacteriana de Exclusão Competitiva (EC) para Inoculação

O preparo da suspensão foi efetuado de acordo com a metodologia de OLIVEIRA *et al.* (2000) e ALMEIDA *et al*. (2002). A suspensão foi obtida misturando-se descarga cecal fresca, obtida de aves adultas saudáveis (mantidas no Aviário da FCAV-UNESP – Jaboticabal – SP), com caldo nutriente (OXOID CM 67, 1:10 Peso/Volume). A mistura foi mantida em estufa a 37°C por 24 horas, em aerobiose, para crescimento da microbiota intestinal. Cada pinto recebeu 0,1 mL da parte líquida inoculados endoesofagicamente, utilizando-se uma cânula. A mistura foi testada para confirmação de ausência de *Salmonella*.

**4.6. Condições Clínicas e Mortalidade, e Exame Histológico e Ultra-estrutural dos Cecos**

As condições clínicas e a mortalidade dos pintos foram registradas em todo o período experimental e durante a necropsia foram registradas as lesões macroscópicas.

No 1º, 3º, 5º e 7º dias pós-infecção, 4 pintainhos por tratamento por sexo (1 por repetição) foram sacrificados por meio de deslocamento cervical para a coleta dos cecos direito e esquerdo.

Para avaliação histológica, morfométrica e da presença de infiltração de células inflamatórias, fragmentos de aproximadamente 0,6 cm de comprimento foram obtidos da região mediana do ceco esquerdo. Elas foram imediatamente abertas longitudinalmente, estendidas pela túnica serosa e fixadas em solução de Bouin por 24 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram lavadas em álcool 70% para a retirada do fixador, desidratadas em série crescente de etanol, diafanizadas em mistura de etanol-xilol e em xilol, e incluídas em Histotec®, seguindo o método de rotina para microscopia de luz. Os cortes histológicos semi-seriados (6 µm de espessura) foram corados com Hematoxilia–Eosina (HE). O número de células polimorfonucleares (PMN) na mucosa e submucosa cecal foi determinado pela contagem celular em 10 campos de 1000 $\mu m^2$ por ave.

A altura e largura das dobras cecais e a espessura da parede cecal, mucosa e submucosa, foram obtidos a partir de 15 mensurações de cada parâmetro por ave.

Para a quantificação das células caliciformes, de acordo com o tipo de mucina produzida (neutra e ácida), fragmentos de aproximadamente 0,4 cm de comprimento foram retirados da região mediana do ceco direito de cada ave. Os fragmentos imediatamente foram abertos longitudinalmente, estendidos pela túnica serosa e fixados em Dietrick (4% de formalina, 28% de etanol, 0,34 N de ácido acético glacial). Cortes semi-seriados, de 6 µm de espessura, foram corados com PAS (para determinação da mucina neutra) ou Alcian Blue pH 2,5 (para determinação da mucina ácida), segundo McMANUS (1948) e LEV & SPICER

(1964). Os cortes foram desparafinizadas e reidratadas. Em seguida, para a identificação das células caliciformes PAS+, cortes foram incubados em ácido periódico 0,5% por 15 minutos, lavados e incubados com reagente de Schiff, por 30 minutos para obtenção da coloração PAS+. Para coloração com Alcian Blue, cortes foram incubados em ácido acético 3% por três minutos e, então, em solução de Alcian Blue (1% em ácido acético 3% pH 2,5). Após nova lavagem em água quente, os cortes foram desidratados e montados em Entellan®. O número de células caliciformes PAS+ e AB+ foi obtido como o número de células presentes ao longo de 300 µm de epitélio. Foram realizadas cerca de doze contagens por ave por tratamento por sexo.

O processamento das lâminas histológicas e suas respectivas análises foram realizadas a partir de março de 2007, no Laboratório de Histologia/Embriologia, do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da FCAV – UNESP – Jaboticabal. Os dados histológicos e morfométricos foram obtidos utilizando-se um sistema de análise de imagens (Leica-DM 2500).

Para a análise ultra-estrutural, em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), fragmentos de 0,5 cm de comprimento retirados do ceco esquerdo foram abertos longitudinalmente, estendidos pela túnica serosa, lavadas delicadamente com tampão fosfato 0,1M pH 7,4 e fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato por 24 horas a 4°C. Em seguida, eles foram lavados com tampão fosfato e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1 % por 2 horas. Após nova lavagem com tampão fosfato, os fragmentos foram desidratados em série de concentração crescente de etanol (50, 60, 70, 80, 90, 100%) e submetidas à obtenção do ponto crítico de secagem (BAL-TEC). Eles foram, então, fixados e orientados sobre suportes de alumínio ou cobre, metalizados com ouro paládio (denton vacum desk II), observados e eletronfotomicrografados utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (modelo Jeol JSM 25II®), pertencente ao laboratório de Microscopia Eletrônica da FCAV, UNESP, Jaboticabal.

Todo os resíduos animais, bem como os materiais utilizados (como placas-de-Petri, pipetas, tubos, luvas, gorros, mascaras, etc.) foram acondicionados em embalagens especiais e autoclavados, para posterior descarte em aterro sanitário.

### 4.7. Analise Estatística

Os dados foram submetidos, a cada dia pós-infecção, à análise de variância (ANOVA), sendo cada ave considerada como uma parcela. A comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey com nível de significância de 5% (SAS, 2004).

# 5. RESULTADOS

## 5.1. Condições Clínicas e Mortalidade

Apenas no 5º e 7º dpi, foram observadas sonolência, asas caídas e alguns episódios de diarréia nos pintos dos tratamentos MI (Machos Infectados), FI (Fêmeas Infectadas), MIEC (Machos Infectados e posteriormente tratados com EC) e FIEC (Fêmeas Infectadas e posteriormente tratadas com EC) - animais com contagens significativas de *S*. Enteritidis. Durante o período experimental, não ocorreu mortalidade em nenhum tratamento.

## 5.2. Achados de necropsia

No 1º e 3º dpi não foram constatadas alterações macroscópicas aparentes em nenhum dos tratamentos experimentais. Já no 5º e 7º dpi, pintainhos dos tratamentos MI, FI, MIEC e FIEC (animais com contagens significativas de *S*. Enteritidis) apresentaram congestão hepática e esplênica, além de lesões evidentes nos cecos (tiflite), com presença de exsudado caseoso de cor amarelada, além do espessamento da parede do órgão. Todavia, no pulmão e coração não foram observadas alterações patológicas aparentes em nenhum tratamento durante o período experimental.

## 5.3. Descrição Morfológica dos Cecos

As Figuras 1, 2, 3 e 4 são eletronmicrografias de varredura da superfície interna dos cecos de pintos machos e fêmeas infectados ou não com SE e tratados ou não com exclusão competitiva antes e após infecção por SE, no 1º, 3º, 5º e 7º dia pós-tratamentos, respectivamente.

No 1º dia pós-tratamentos (Figura 1), em ambos os sexos, os pintos dos 4 tratamentos apresentaram cecos com características morfológicas similares, ou seja, presença de pregas cecais longitudinais com várias evaginações superficiais da mucosa, correspondentes às extremidades apicais dos vilos.

No 3º dia pós-tratamentos (Figura 2), machos e fêmeas não infectados (NI) continuaram apresentando as características morfológicas cecais descritas no 1º dia. Pintos infectados (I), de ambos os sexos, não apresentaram evaginações na

superfície das pregas cecais longitudinais, o que lhes concedeu aspecto mais liso. Machos e fêmeas tratados com exclusão competitiva após e antes da infecção (IEC e ECI, respectivamente) apresentaram dobras da mucosa na superfície das pregas cecais, mas não tão salientes e evidentes como observado nas aves não infectadas.

No 5º dia pós-tratamentos (Figura 3), independentemente do sexo, pintos NI continuaram apresentando pregas cecais longitudinais contendo em sua superfície evaginações evidentes da mucosa. Pintos I, machos e fêmeas, apresentaram pregas cecais aparentemente mais largas e sem as evaginações da mucosa cecal. Pintos machos tratados com EC após infecção com SE também apresentaram pregas cecais com as características mencionadas anteriormente para os pintos I. As fêmeas desse mesmo tratamento, entretanto, apresentaram pregas cecais aparentemente mais largas e com as evaginações da mucosa. Pintos tratados com EC antes da infecção por SE apresentaram as mesmas características cecais observadas para os pintos não infectados, estando as evaginações da mucosa mais evidentes nas fêmeas.

No 7º dia pós-tratamento (Figura 4), em ambos os sexos, pintos não infectados com SE e os tratados com EC antes da infecção apresentaram pregas cecais longitudinais com evaginações evidentes da mucosa em sua superfície, enquanto que os pintos infectados e os tratados com EC após a infecção apresentaram pregas cecais ainda mais largas e sem as evaginações.

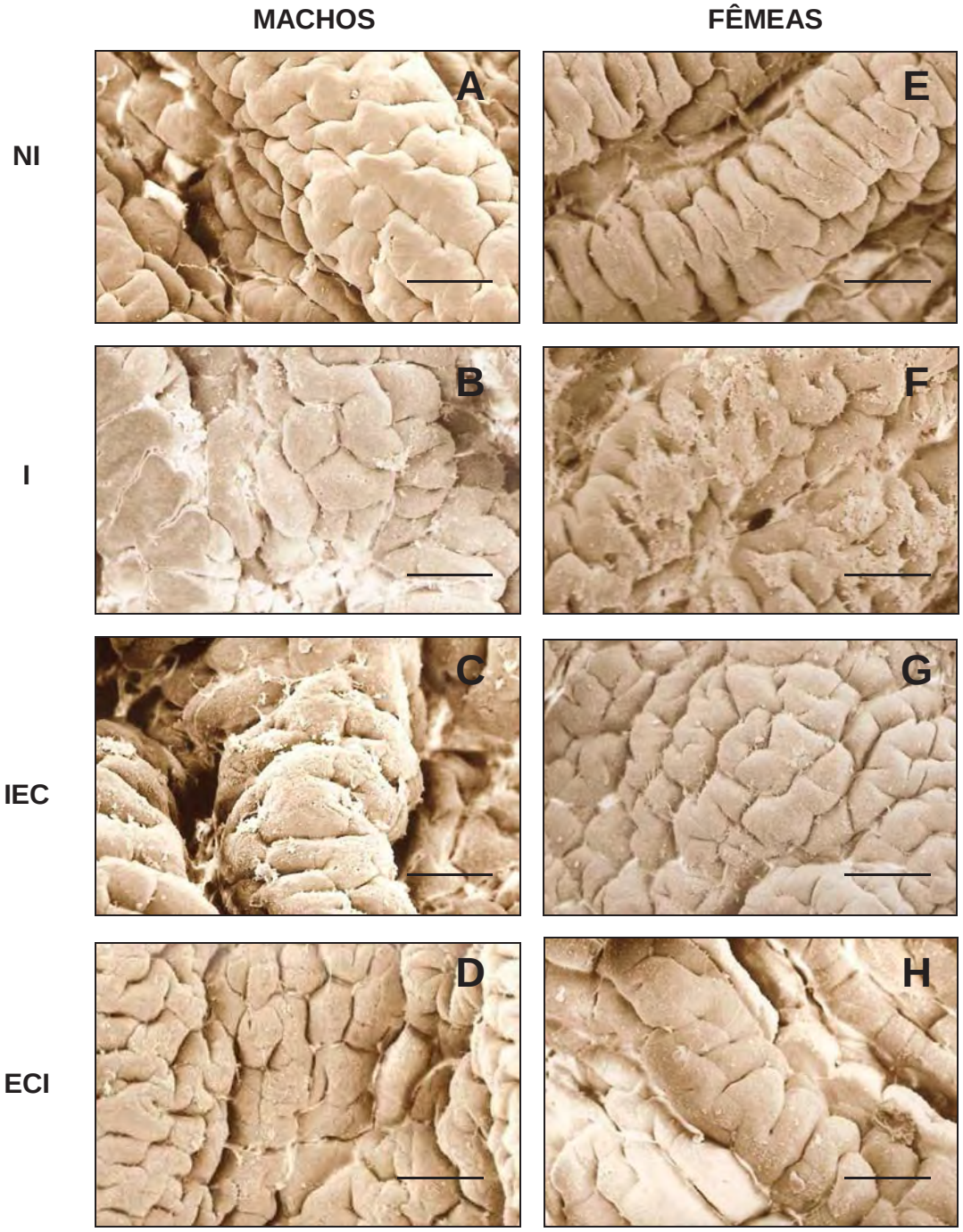


**Figura 1.** Eletronmicrografias de varredura da superfície luminal do epitélio cecal de pintos machos (A-D) e fêmeas (E-H) não infectados com SE (A e E), infectados com SE (B e F), submetidos a exclusão competitiva após (C e G) e antes (D e H) da infecção com SE, no 1º dia pós-infecção. Barras: 100µm.

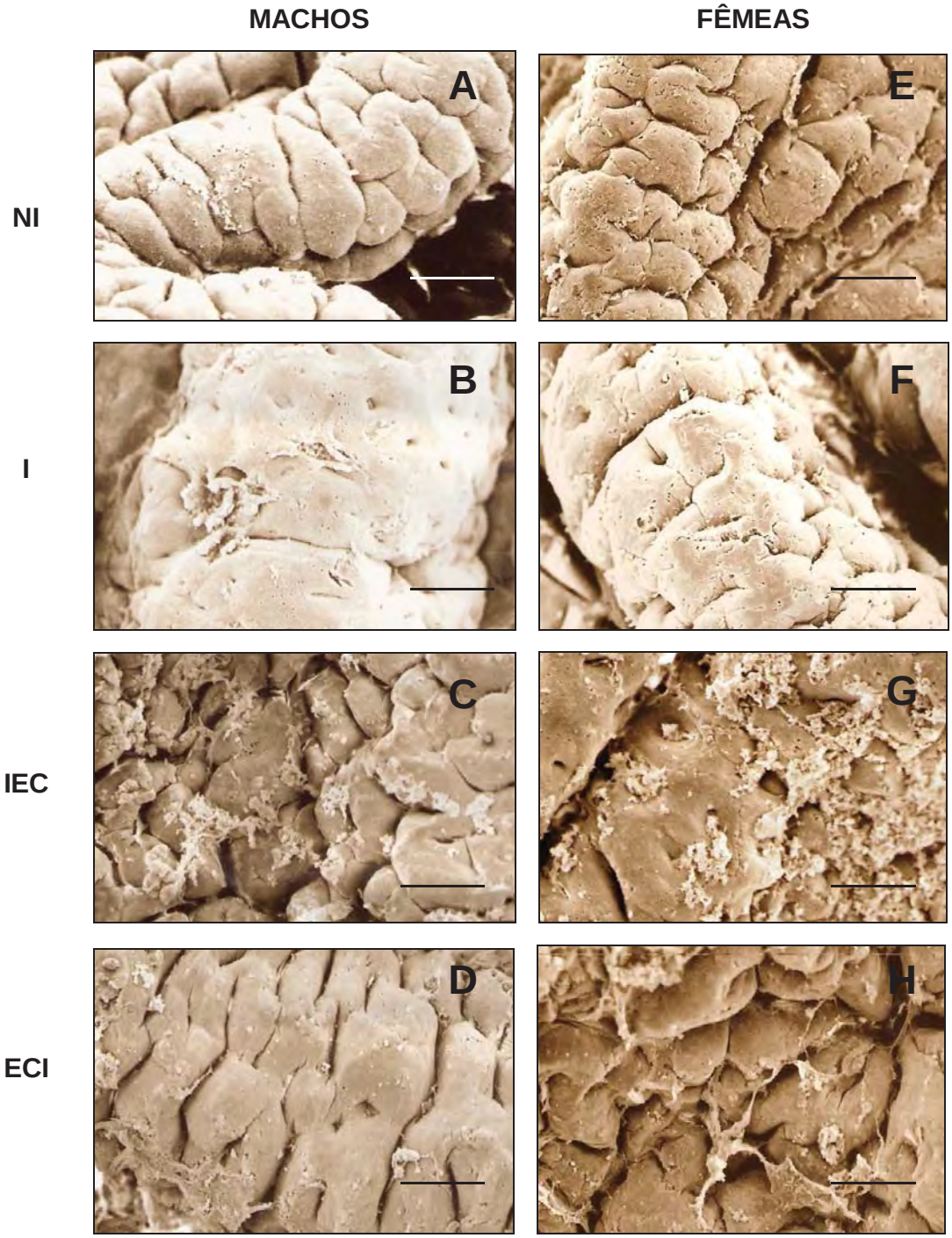


**Figura 2.** Eletronmicrografias de varredura da superfície luminal do epitélio cecal de pintos machos (A-D) e fêmeas (E-H) não infectados com SE (A e E), infectados com SE (B e F), submetidos a exclusão competitiva após(C e G) e antes (D e H) da infecção com SE, no 3º dia pós-infecção. Barras: 100µm.

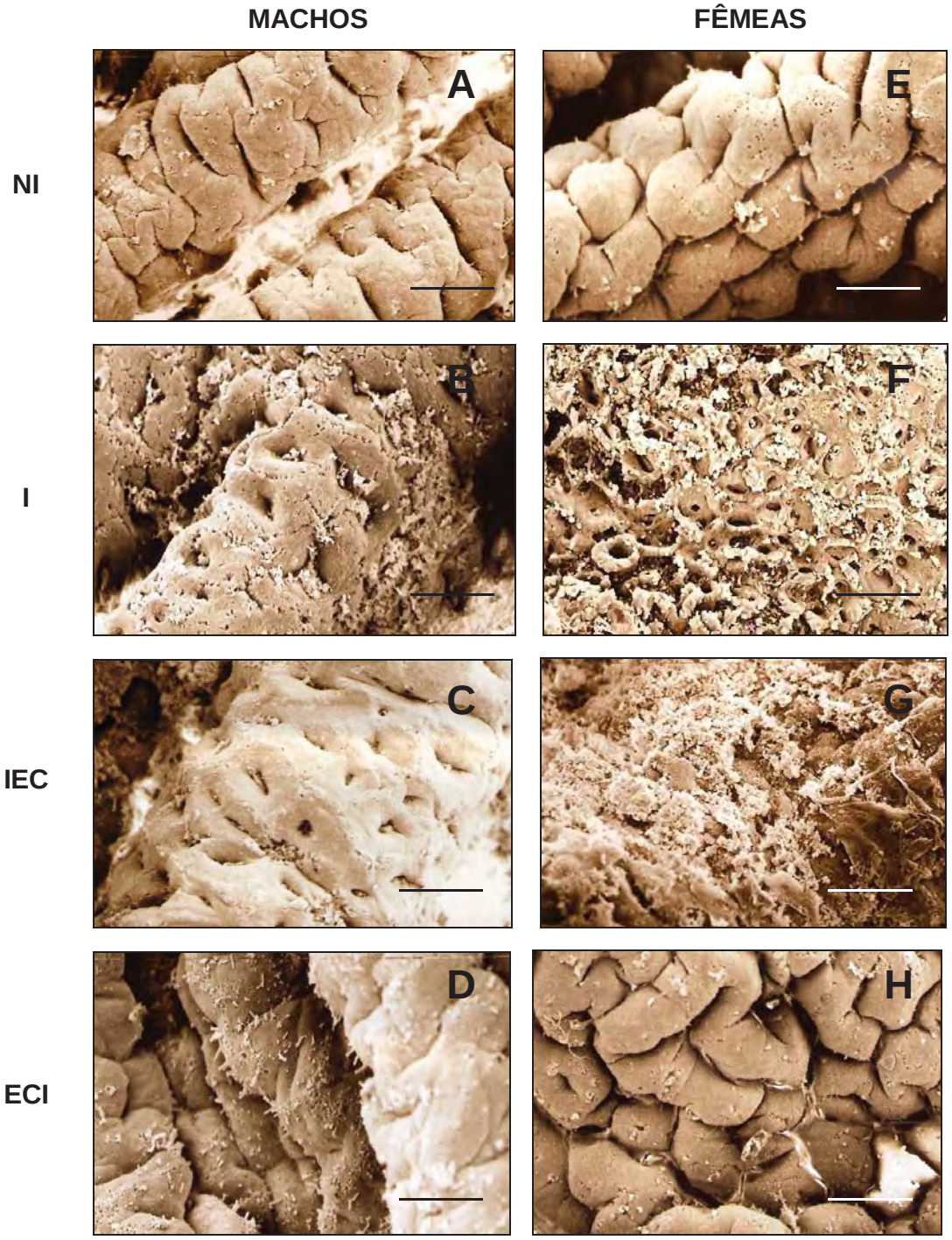


**Figura 3.** Eletronmicrografias de varredura da superfície luminal do epitélio cecal de pintos machos (A-D) e fêmeas (E-H) não infectados com SE (A e E), infectados com SE (B e F), submetidos a exclusão competitiva após(C e G) e antes (D e H) da infecção com SE, no 5º dia pós-infecção. Barras: 100µm.

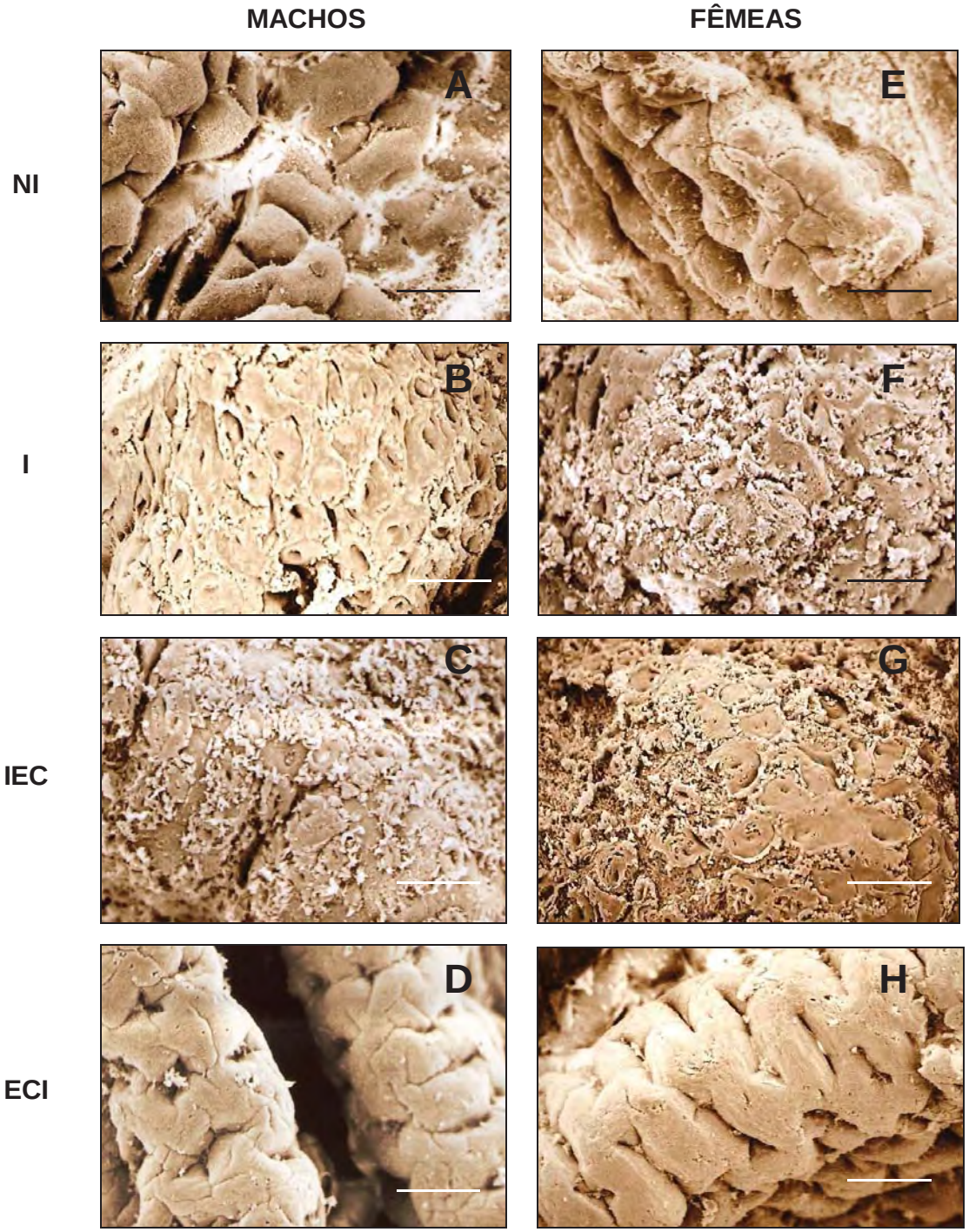


**Figura 4.** Eletronmicrografias de varredura da superfície luminal do epitélio cecal de pintos machos (A-D) e fêmeas (E-H) não infectados com SE (A e E), infectados com SE (B e F), submetidos a exclusão competitiva após(C e G) e antes (D e H) da infecção com SE, no 7º dia pós-infecção. Barras: 100µm.

### 5.4. Descrição Histológica dos Cecos

Como mostrado nas Figuras 5 A-D e 6 A-D, pintos machos e fêmeas não infectados com SE (NI), respectivamente, mantiveram as mesmas características histológicas cecais até o 7º dia pós-tratamento. A parede dos cecos intestinais apresentou-se histologicamente constituída por 4 túnicas denominadas, da parte externa para a interna do órgão, de: serosa, muscular, submucosa e mucosa (Fig. 7C). A serosa mostrou-se uma camada delgada e constituída por tecido conjuntivo frouxo e epitélio simples pavimentoso. A muscular foi constituída por duas camadas de músculos lisos, a camada externa, de fibras orientadas longitudinalmente, e a camada interna, de fibras orientadas de forma circular aos cecos. A sub-mucosa mostrou-se formada por tecido conjuntivo frouxo. Essa, juntamente com a mucosa, formou pregas preenchidas pelo tecido conjuntivo frouxo e revestidas pelo epitélio simples prismático, que se projetam no interior do lumen cecal. A mucosa cecal apresentou-se formada por vilos ou vilosidades, que são evaginações de seu epitélio simples prismático, que reveste a superfície interna dos cecos, e de sua lâmina própria, as quais concedem à superfície das pregas cecais um aspecto de borda em escova (Fig. 7A). Ainda na mucosa, observa-se as glândulas de Lieberkühn ou criptas, localizadas abaixo da base dos vilos e cujo epitélio apresenta continuidade com o epitélio de revestimento dos vilos adjacentes e a muscular da Mucosa (Mm) (Fig.7B).

Nas Figuras 5 E-H e 6 E-H, verifica-se que pintos machos e fêmeas infectados por *Salmonella* Enteritidis (I) apresentaram ao longo dos 7 dias pós-infecção aumento evidente do tamanho das pregas cecais, que deixaram de apresentar as saliências representadas pelos ápices dos vilos da mucosa e foram preenchidas por tecido conjuntivo denso. O aumento no tamanho das pregas cecais ocorreu pela intensa proliferação de tecido conjuntivo (Figura 8) e por alta infiltração de leucócitos na sub-mucosa e mucosa (Figura 9B), enquanto que a perda da visibilidade do ápices dos vilos na superfície das pregas cecais envolveu intensa infiltração de leucócitos na lâmina própria que preenche os vilos (Fig. 9A). Alta infiltração de leucócitos também foi observada por todo o epitélio dos vilos e, principalmente, em seus ápices, regiões em que observou-se grande perda de

células de revestimento (Fig. 9C). Muitos vilos apresentaram perda epitelial com exposição do tecido conjuntivo em seus ápices.

As Figuras 5 I-L e 6 I-L correspondem a cortes histológicos de cecos de aves tratadas com exclusão competitivas após infecção com SE, no 1°, 3°, 5° e 7° dia pós-tratamentos, respectivamente. Ambos os sexos apresentaram as alterações histológicas descritas para os pintos infectados, ou seja, aumento progressivo da proliferação de tecido conjuntivo na submucosa (início a partir do 1º dpi), aumento gradativo da largura das dobras cecais (a partir do 5º dpi) e total perda da morfologia dos vilos da mucosa (também a partir do 5º dpi). Como mostrados nas Figuras 10 e 11, a alta proliferação de tecido conjuntivo ocorreu na submucosa e mucosa, houve infiltração de células inflamatórias na lâmina própria e epitélio dos vilos, e locais de perda de epitélio próximo ao qual se concentravam leucócitos.

Nas Figuras 5 M-P e 6 M-P são apresentados cortes histológicos dos cecos dos pintos tratados com exclusão competitiva antes da infecção por SE (ECI), no 1°, 3°, 5° e 7° dia pós-tratamentos, respectivamente. Machos e fêmeas não diferiram nas características histológicas cecais, as quais corresponderam às características registradas para as aves não infectadas e foram mantidas ao longo dos 7 dias experimentais (Figura 12).

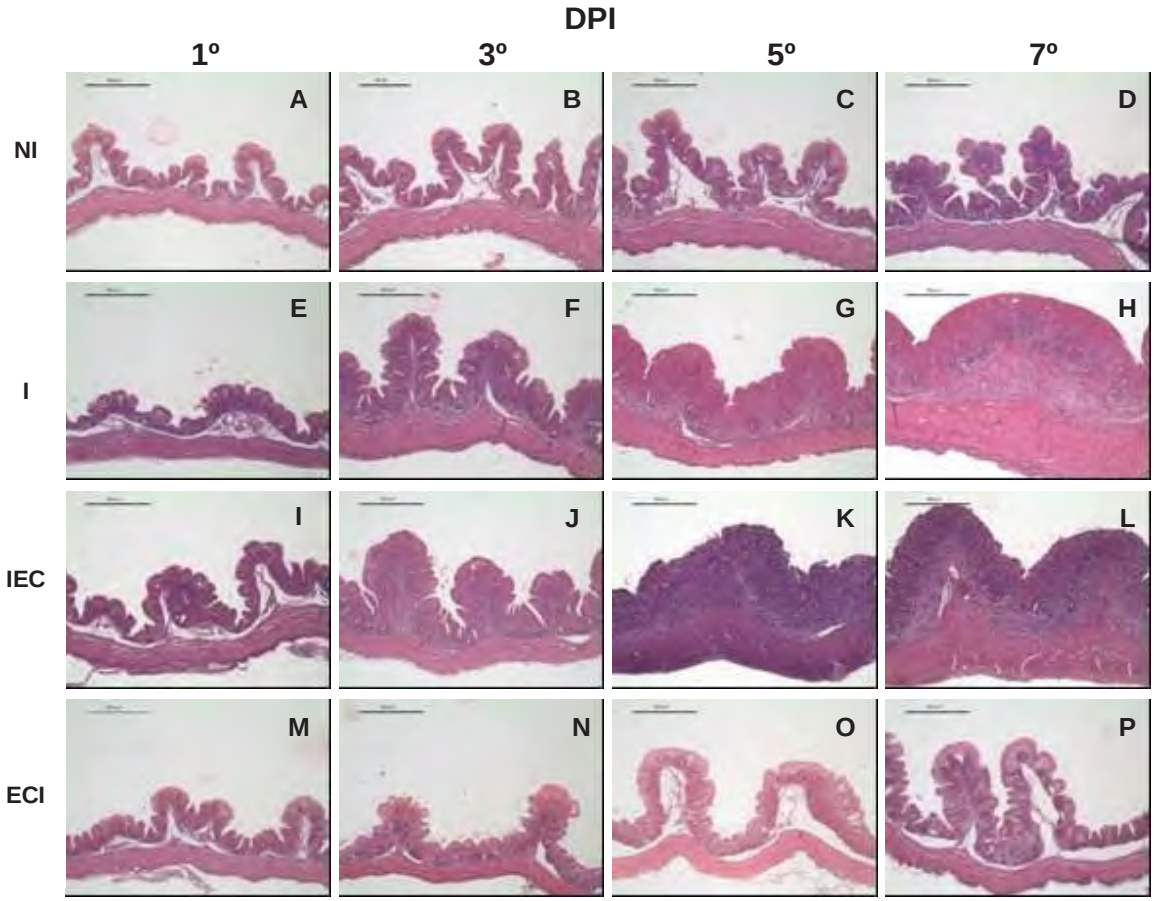


**Figura 5.** Fotomicrografia dos cecos de pintos machos não infectados com SE (NI, A-D), infectados com SE (I, E-H), submetidos à exclusão competitiva após (IEC, I-L) e antes (ECI, M-P) da infecção com SE, no 1°, 3°, 5° e 7° dias pós-tratamentos. Coloração HE. Barras: 500µm.

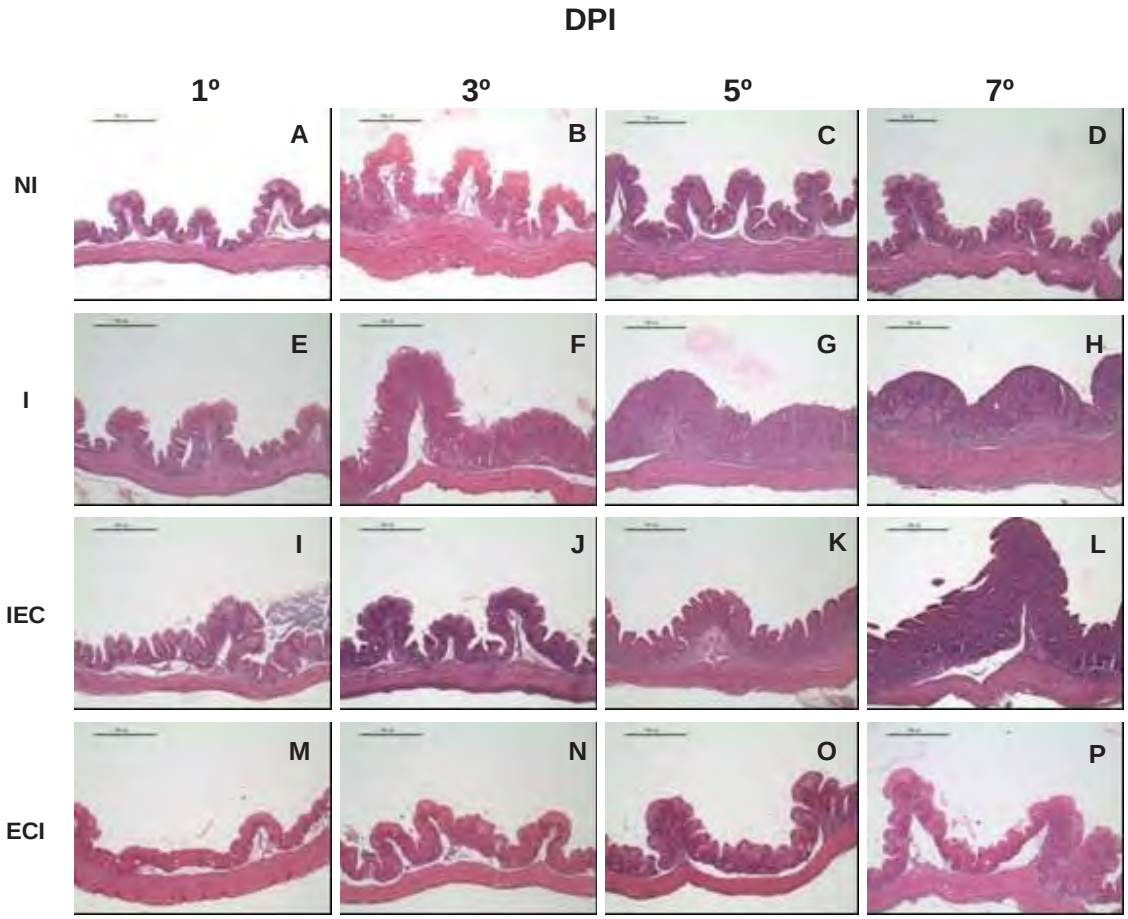


**Figura 6.** Fotomicrografia dos cecos de pintos fêmeas não infectados com SE (NI, A-D), infectados com SE (I, E-H), submetidos à exclusão competitiva após (IEC, I-L) e antes (ECI, M-P) da infecção com SE, no 1°, 3°, 5° e 7° dias pós-tratamentos. Coloração HE. Barras: 500 µm.

**Figura 7.** Fotomicrografias dos cecos de pintos machos não infectados com *Salmonella* Enteritidis, mostrando detalhe da dobra cecal (A), dos vilos e criptas de sua camada mucosa (B) e da rara infiltração de leucócitos (LEU) na mucosa. C: cripta, Mm: Muscular da Mucosa, M: camada muscular, Mu: camada mucosa, SMU: camada sub-mucosa S: camada serosa, V: vilos. Coloração HE. Barras: 200 µm (A), 200 µm (B), 50 µm (C).

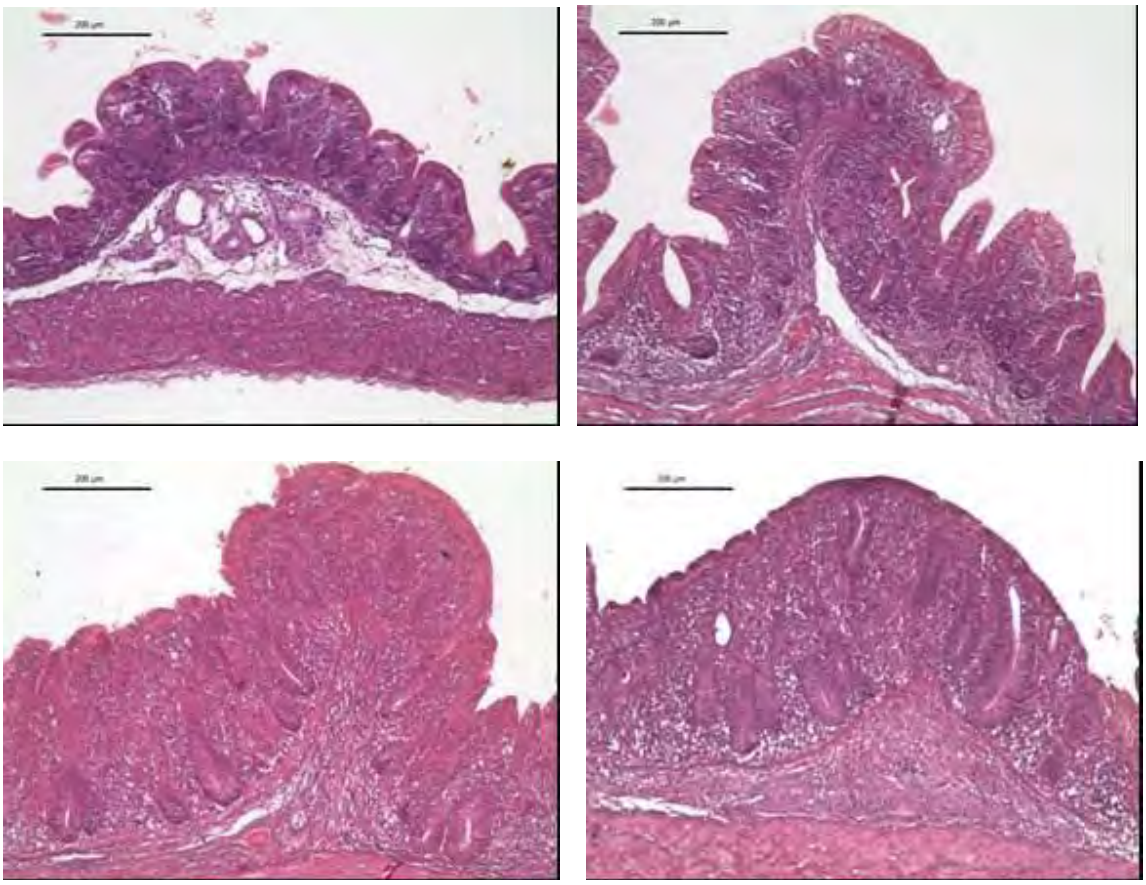

**Figura 8.** Fotomicrografias do ceco de pintos machos infectados com *Salmonella* Enteritidis no 1°, 3°, 5° e 7° dia pós infecção (figuras A, B, C e D, respectivamente), mostrando a proliferação do tecido conjuntivo da submucosa e o aumento de tamanho e perda das características morfológicas das pregas cecais, após infecção. C: cripta, Mm: Muscular da Mucosa, M: camada muscular, SMU: camada sub-mucosa, Mu: camada mucosa, S: camada serosa, V: vilos. Coloração HE. Barras: 200 µm.

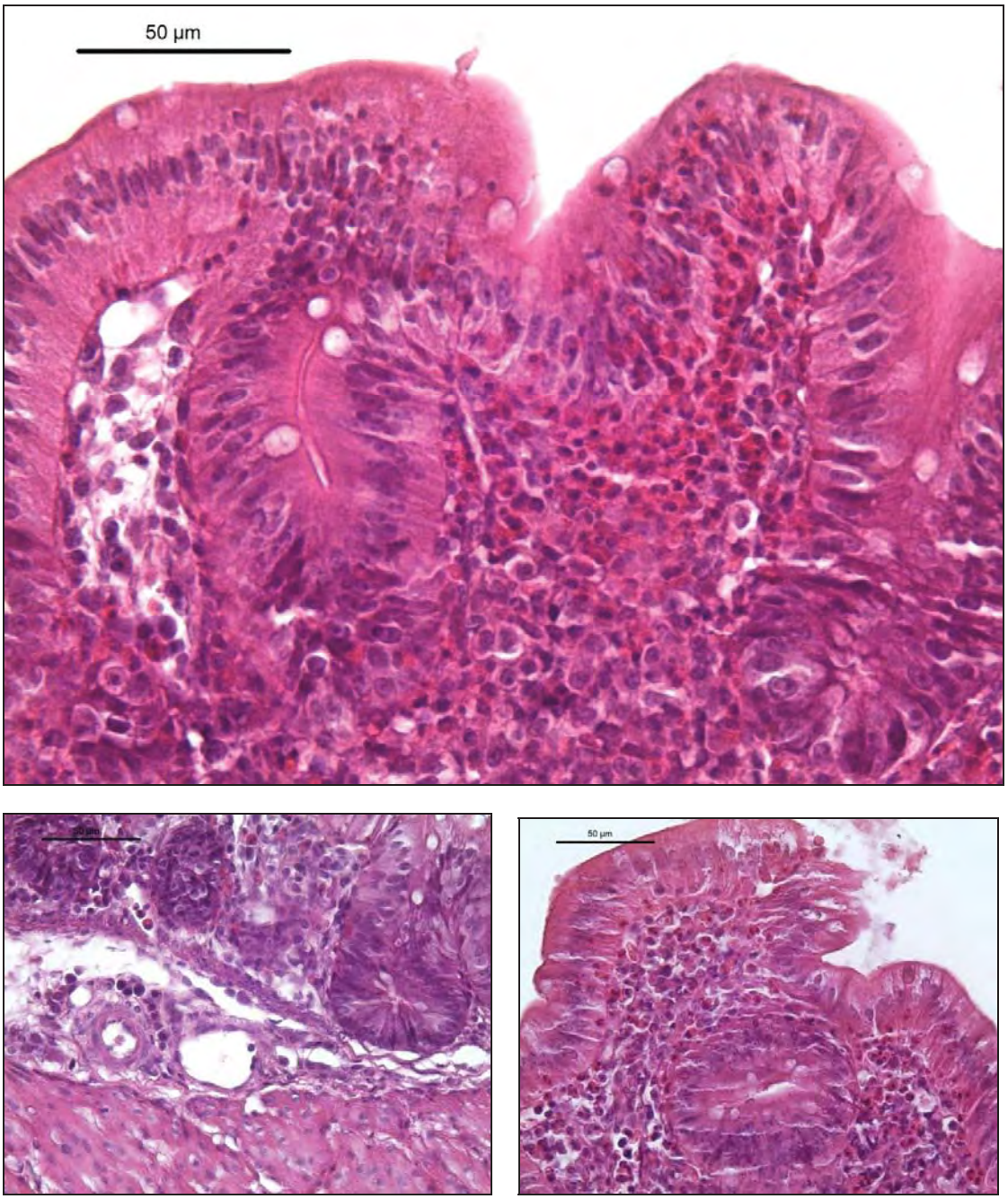


**Figura 9**. Fotomicrografias dos cecos de pintos de corte infectados com *Salmonella* Enteritidis, mostrando a alta infiltração de leucócitos polimorfonucleares (PMN) na mucosa (A) detalhe das criptas da camada mucosa e camada submucosa (B), e perda de células epiteliais (C). C: cripta, Mm: Muscular da Mucosa, LEU: leucócitos, M: camada muscular, Mu: camada mucosa, SMU: camada submucosa. Coloração HE. Barras: 50 µm.

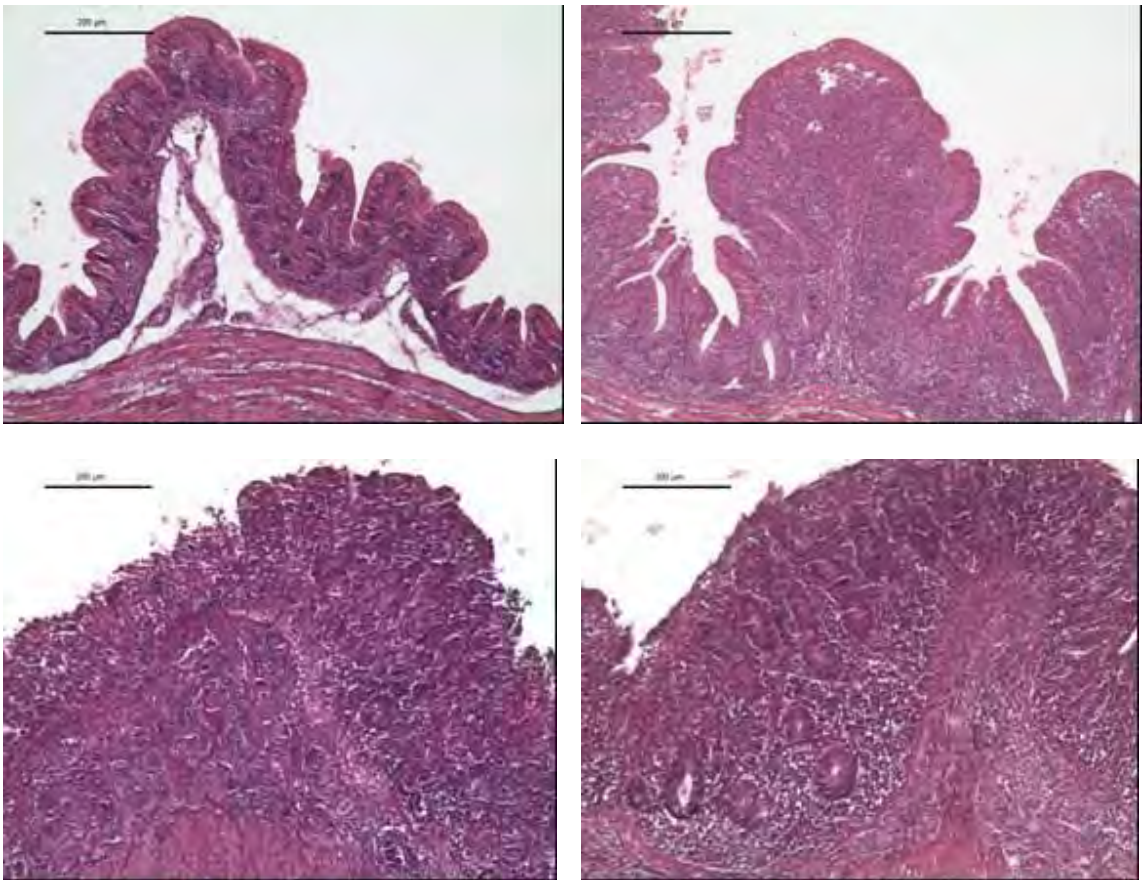

**Figura 10.** Fotomicrografias dos cecos de pintos machos, submetidos a exclusão competitiva após infecção com *Salmonella* Enterititis, mostrando detalhe das dobras cecais no 1°, 3°, 5° e 7° dia pós infecção (figuras A, B, C e D, respectivamente), (A). C: cripta, Mm: Muscular da Mucosa, M: camada muscular, SMU: camada sub-mucosa, Mu: camada mucosa, V: vilos. Coloração HE. Barras: 200 µm.

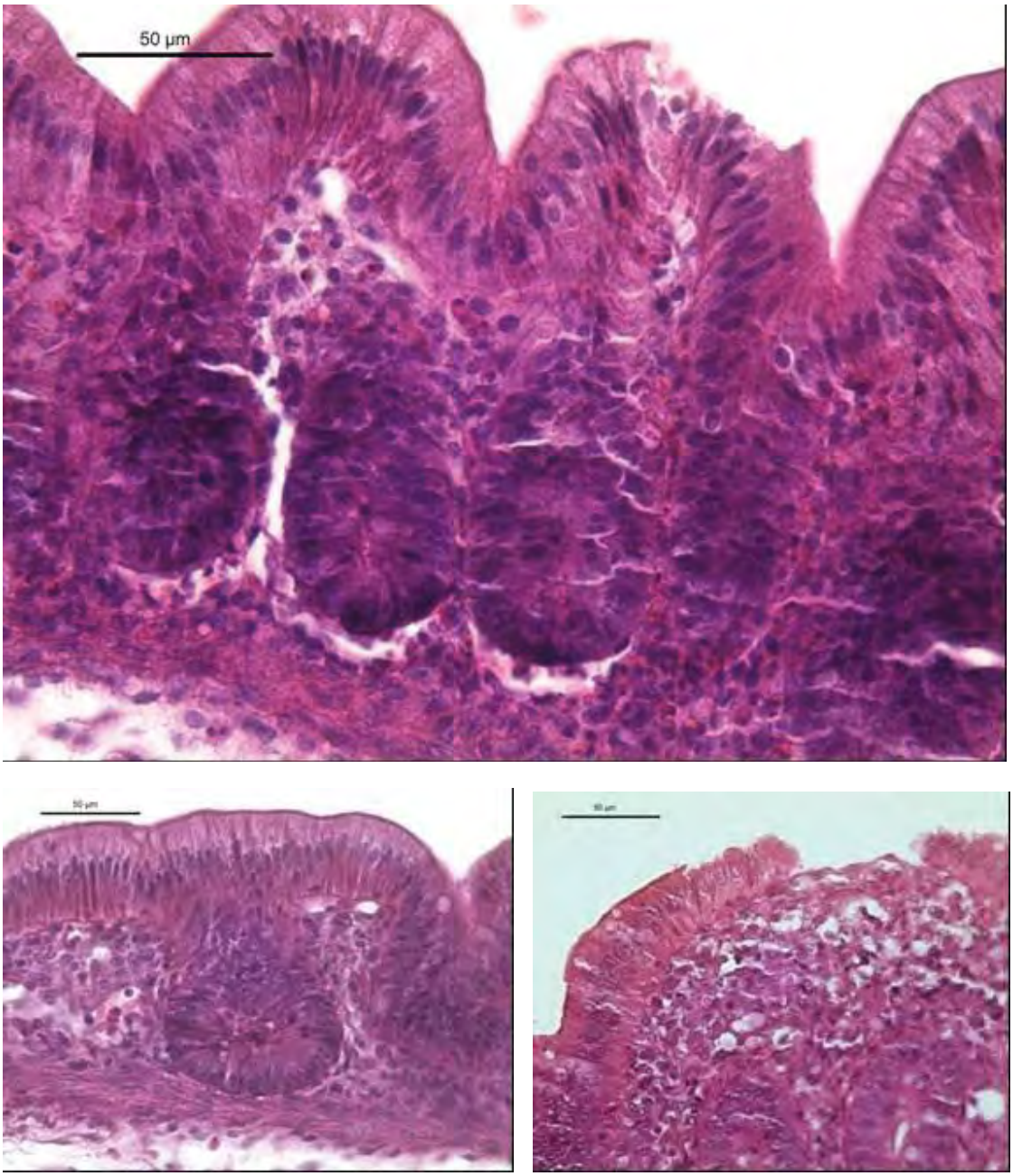


**Figura 11**. Fotomicrografias dos cecos de pintos de corte machos submetidos a exclusão competitiva após infecção com *Salmonella* Enteritidis mostrando a alta infiltração de leucócitos na mucosa (A) detalhe dos vilos e criptas da camada mucosa (B), perda de células epiteliais (C). C: cripta, Mm: Muscular da Mucosa, LEU: leucócitos, Mu: camada mucosa, V: vilos. Coloração HE. Barras: 50 µm.

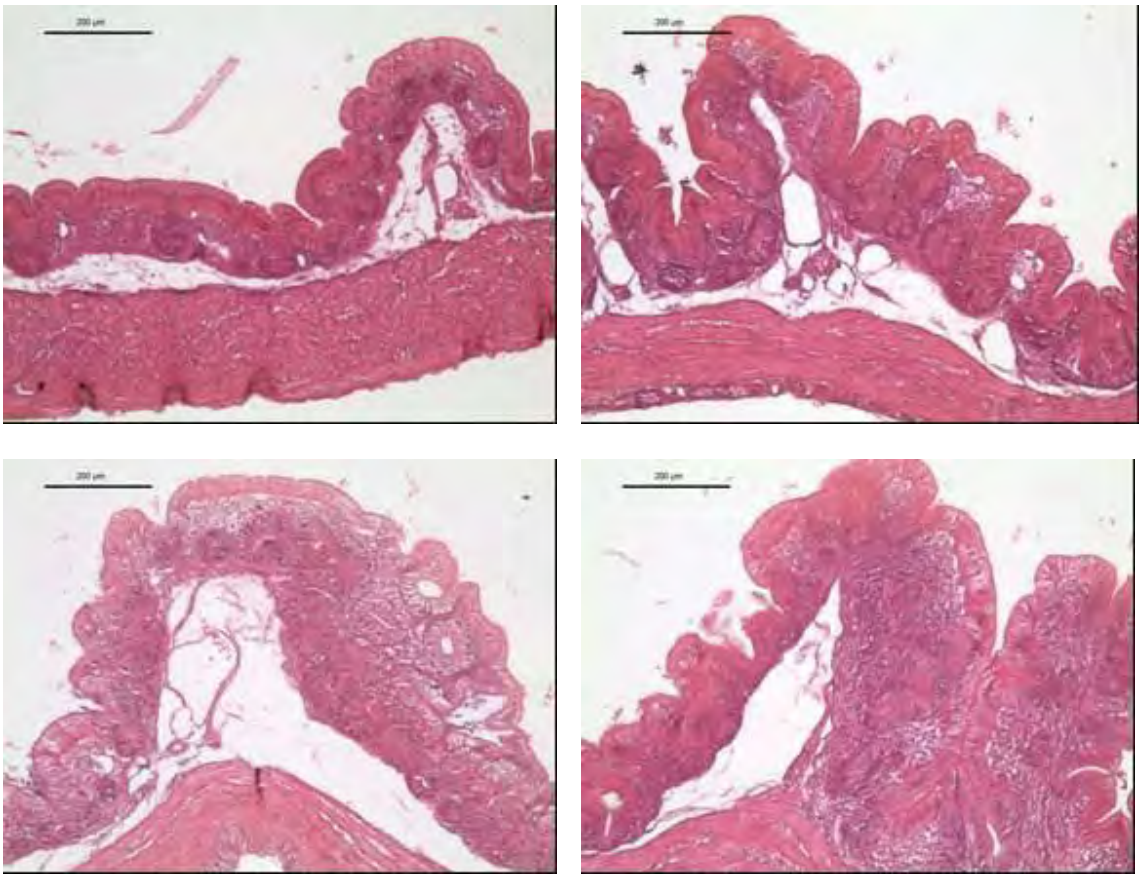

**Figura 12.** Fotomicrografias do ceco de pintos machos, submetidos à exclusão competitiva antes da infecção com *Salmonella* Enteritidis, mostrando detalhe das dobras cecais no 1°, 3°, 5° e 7° dia pós infecção (figuras A, B, C e D, respectivamente), (A). C: cripta, M: camada muscular, SMU: camada submucosa, Mu: camada mucosa, S: camada serosa. Coloração HE. Barras: 200 µm.

### 5.5. Análise Morfométrica dos Cecos

Nas Tabelas 1 e 2 estão apresentados os resultados referentes à altura e largura das pregas cecais.

Em relação à altura das pregas cecais (Tabela 1), verificou-se efeito do sexo (S) no 1º e 3º dpi, nos quais as fêmeas apresentaram pregas cecais mais altas que as pregas dos cecos dos machos. O efeito do tratamento (T) sobre a altura das pregas cecais (Tabela 1) foi observado no 1º e 5º dpi. No 1º dpi, as pregas cecais foram mais altas nos pintos tratados com exclusão competitiva (IEC) após infecção por SE do que nos pintos dos demais tratamentos, que por sua vez, não apresentaram diferenças significativas nesse parâmetro entre si. Já no 5º dpi, a altura das pregas cecais dos pintos não infectados (NI) foi similar à dos pintos não infectados (NI) e menor que a dos cecos dos pintos tratados com exclusão competitiva (IEC) após a infecção por SE. Além disso, não houve diferença ($p>0,05$) na altura das pregas cecais entre os pintos infectados (I) e os pintos tratados com EC (ECI e IEC). No 7º dpi, ocorreu interação significativa ($p<0,05$) entre sexo (S) e tratamentos (T) (Tabelas 1 e 2), a qual mostrou que pintos machos infectados por *Salmonella* Enteritidis (I) apresentaram os maiores valores de altura das pregas cecais quando comparados com os machos dos demais tratamentos. No caso das fêmeas, os pintos infectados por SE (I) e os tratados com exclusão competitiva antes (ECI) e após (IEC) a infecção com SE apresentaram as maiores alturas de pregas cecais. Diferenças entre machos e fêmeas foram observadas nos pintos não infectadas (NI) e infectados (I) por SE, nos quais machos apresentaram pregas cecais mais altas que as dos cecos das fêmeas.

Para largura das pregas cecais (Tabela 1), houve efeito dos tratamentos (T) no 1º, 3º e 5º dpi. No 1º dpi, os pintos não infectados (NI) apresentaram pregas cecais com largura menores que as registradas para as pregas cecais dos pintos dos demais tratamentos. A largura das pregas cecais dos pintos infectados (I) foi menor que a dos pintos tratados com EC após infecção por SE (IEC), os quais não diferiram dos pintos tratados com EC antes da infecção por SE (ECI) nesse parâmetro. No 3º dpi, pintos infectados (I) e os tratados com EC antes da infecção

(IEC) apresentaram pregas cecais com largura similar, porém e significativamente maiores que a largura das pregas dos cecos dos demais tratamentos. No 5º dpi, pintos infectados (I) apresentaram pregas cecias com largura similar à registrada para os cecos dos pintos tratados com EC após infecção (IEC), e significativamente mais largas que as dos cecos dos pintos dos dois outros tratamentos. Por outro lado, os pintos tratados com EC antes da infecção (ECI) apresentam pregas cecais mais largas que dos pintos não infectados (NI).

Ainda para largura das pregas cecais, no 7º dpi foi observada interação significativa ($p<0,05$) entre sexo (S) e tratamentos (T) (Tabelas 1 e 2). De acordo com a mesma, pintos machos infectados e os tratados com EC após infecção apresentaram as maiores larguras das pregas cecais, quando comparados aos demais tratamentos. Nas fêmeas, a largura das pregas cecais dos pintos infectados (I) foi significativamente menor que as dos pintos tratados com EC após infecção (IEC). Além disso, as pregas cecais dos pintos infectados (I) foram mais largas que as dos cecos dos pintos não infectados e dos tratados com EC antes da infecção. Diferenças entre machos e fêmeas nesse parâmetro foram observadas apenas nos pintos infectados e nos tratados com EC pós infecção. Nos primeiros, machos apresentaram pregas cecais mais largas que as fêmeas. No últimos machos tratados tiveram pregas cecais mais estreitas que as fêmeas.

**Tabela 1.** Efeitos dos sexos e tratamentos sobre a altura (µm) e largura (µm) das pregas cecais, em pintos de corte no 1º, 3º, 5º e 7º dpi.

| | Dias pós-infecção | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **1º** | **3º** | **5º** | **7º** |
| Altura (µm) | | | | |
| **Sexo (S)** | | | | |
| **M** | 406,27 b | 564,89 b | 709,18 a | 784,60 |
| **F** | 450,67 a | 644,83 a | 692,44 a | 718,87 |
| **Tratamentos (T)** | | | | |
| **NI** | 422,02 b | 609,54 a | 604,61 c | 633,83 |
| **I** | 374,90 b | 670,17 a | 728,58 ab | 813,47 |
| **IEC** | 526,06 a | 564,43 a | 794,13 a | 773,40 |
| **ECI** | 390,90 b | 575,29 a | 675,91 bc | 806,24 |
| **Probabilidades** | | | | |
| **S** | 0,0310 * | 0,0220 * | 0,5990 $^{ns}$ | <0,0001 * |
| **T** | <0,0001 * | 0,1310 $^{ns}$ | 0,0010 * | <0,0001 * |
| **S x T** | 0,1530 $^{ns}$ | 0,1970 $^{ns}$ | 0,0760 $^{ns}$ | <0,0001 * |
| **C.V. (%)**[1] | 12,00 | 10,30 | 19,99 | 15,75 |
| Largura (µm) | | | | |
| **Sexo (S)** | | | | |
| **M** | 457,05 a | 529,35 a | 701,22 a | 844,24 |
| **F** | 456,85 a | 504,76 a | 710,13 a | 788,05 |
| **Tratamentos (T)** | | | | |
| **NI** | 360,75 c | 457,06 b | 406,60 c | 477,06 |
| **I** | 441,29 b | 585,78 a | 931,87 a | 1055,39 |
| **IEC** | 561,05 a | 554,85 a | 997,19 a | 1183,02 |
| **ECI** | 464,70 ab | 470,53 b | 572,48 b | 549,13 |
| **Probabilidades** | | | | |
| **S** | 0,9950 $^{ns}$ | 0,4450 $^{ns}$ | 0,5500 $^{ns}$ | 0,1890 $^{ns}$ |
| **T** | 0,0010 * | 0,0120 * | <0,0001 * | <0,0001 * |
| **S x T** | 0,1910 $^{ns}$ | 0,2330 $^{ns}$ | 0,1440 $^{ns}$ | <0,0001 * |
| **C.V. (%)**[1] | 18,36 | 10,84 | 18,71 | 15,16 |

[1] = Coeficiente de variação; $^{ns}$ = não significativo; * = Significativo; a – c: Médias seguidas de letras distintas (colunas) diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$); M: macho, F: fêmea NI: não infectado com SE, I: infectado com SE, IEC: infecção com SE e tratado com EC, ECI: tratado com EC e infectado com SE.

**Tabela 2.** Interação entre os sexos e tratamentos sobre a altura (µm) e largura das pregas cecais, em pintos de corte no 7º dpi.

| Sexos | Tratamentos | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **NI** | **I** | **IEC** | **ECI** |
| | | Altura (µm) | | |
| **M** | 713,90 Ba | 925,40 Aa | 726,40 Ba | 772,80 Ba |
| **F** | 553,80 Bb | 701,60 Ab | 820,40 Aa | 839,70 Aa |
| | | Largura (µm) | | |
| **M** | 481,20 Ba | 1276,90 Aa | 1061,80 Ab | 557,00 Ba |
| **F** | 472,90 Ca | 833,90 Bb | 1304,20 Aa | 541,20 Ca |

A-B, a – b: Médias seguidas de letras distintas (linhas e colunas, respectivamente) diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$); M: macho, F: fêmea NI: não infectado com SE, I: infectado com SE, IEC: infecção com SE e tratado com EC, ECI: tratado com EC e infectado com SE.

A Tabela 3 mostra os resultados referentes à espessura da parede cecal. Houve efeito principal ($p<0,05$) do sexo apenas no 1º dpi, no qual as fêmeas apresentaram parede cecal mais espessa que os machos. Efeito significativo ($p<0,05$) do tratamento sobre esse parâmetro foi observado no 1º, 3º e 5º dpi. No 1º dpi, os pintos tratados com exclusão competitiva após infecção por SE (IEC) apresentaram parede cecal mais espessa que os pintos submetidos aos demais tratamentos, que não diferiram entre si nesse parâmetro. No 3º dpi, a maior espessura da parede cecal foi apresentada pelos pintos infectados, não ocorrendo diferença nesse parâmetro entre as aves dos 3 outros tratamentos. Já no 5º dpi, a maior espessura da parede cecal foi apresentada pelos pintos tratados com EC após a infecção por SE, não ocorrendo diferença nesse parâmetro entre as aves dos outros tratamentos. No 7º dpi, ocorreu interação significativa ($p<0,05$) entre sexo e tratamentos (Tabelas 3 e 4). De acordo com essa interação, pintos machos infectados apresentaram paredes cecais mais espessas que os machos dos demais tratamentos, enquanto que todas as fêmeas infectadas e tratadas ou não com EC apresentaram espessura similar de parede cecal, porém maior que a observada nos pintos fêmeas não infectados. A interação também mostrou que diferenças significativas ($p<0,05$) na espessura da parede dos cecos entre os sexos ocorreram nos pintos não infectados, nos infectados e nos tratados com EC após a infecção. Nos dois primeiros tratamentos, a espessura da parede cecal foi maior nos machos que nas fêmeas. No terceiro tratamento, ela foi maior nas fêmeas que nos machos.

**Tabela 3.** Efeitos dos sexos e tratamentos sobre a espessura da parede cecal (µm) nas pregas cecais, em pintos de corte no 1º, 3º, 5º e 7º dpi.

| | Dias pós-infecção | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **1º** | **3º** | **5º** | **7º** |
| **Sexo (S)** | | | | |
| **M** | 590,33 b | 794,49 a | 922,93 a | 1004,97 |
| **F** | 648,45 a | 839,89 a | 936,98 a | 969,62 |
| **Tratamentos (T)** | | | | |
| **NI** | 592,47 b | 753,41 b | 912,51 b | 965,05 |
| **I** | 564,41 b | 883,86 a | 916,50 b | 1115,91 |
| **IEC** | 748,78 a | 771,81 b | 1054,05 a | 1041,67 |
| **ECI** | 571,92 b | 753,41 b | 836,78 b | 976,51 |
| ***Probabilidades*** | | | | |
| **S** | 0,0160 * | 0,1480 $^{ns}$ | 0,6890 $^{ns}$ | 0,3160 $^{ns}$ |
| **T** | <0,0001 * | 0,0080 * | <0,0001 * | <0,0001 * |
| **S x T** | 0,4110 $^{ns}$ | 0,2050 $^{ns}$ | 0,3020 $^{ns}$ | <0,0001 * |
| **C.V. (%)**[1] | 15,05 | 13,85 | 17,71 | 12,61 |

[1] = Coeficiente de variação; $^{ns}$ = não significativo; * = Significativo; a – b: Médias seguidas de letras distintas (colunas) diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). M: macho, F: fêmea, NI: não infectado com SE, I: infectado com SE, IEC: infecção com SE e tratado com EC, ECI: tratado com EC e infectado com SE.

**Tabela 4.** Interação entre os sexos e tratamentos sobre a espessura da parede cecal (µm) nas pregas cecais, em pintos de corte no 7º dpi.

| Sexo | Tratamentos | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **NI** | **I** | **IEC** | **ECI** |
| **M** | 999,30 Ba | 1234,70 Aa | 951,90 Bb | 933,90 Ba |
| **F** | 930,80 Bb | 997,10 Ab | 1131,40 Aa | 1019,10 Aa |

A-B, a – b: Médias seguidas de letras distintas (linhas e colunas, respectivamente) diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$); M: macho, F: fêmea NI: não infectado com SE, I: infectado com SE, IEC: infecção com SE e tratado com EC, ECI: tratado com EC e infectado com SE.

Na Tabela 5, são apresentados os resultados referentes à espessura das túnicas mucosa e muscular dos cecos.

Em relação à espessura da mucosa, no 1º e 3º dpi, houve efeito significativo ($p<0,05$) apenas dos tratamentos. No 1º dia, a espessura dessa túnica maior nos pintos tratados com exclusão competitiva após a infecção (IEC) do que nos pintos dos outros tratamentos, e menor nos pintos tratados com exclusão competitiva antes da infecção (IEC). No 3º dpi, a espessura da mucosa foi maior nos pintos infectados (I) e nos tratados com exclusão competitiva após a infecção do que nos pintos não infectados ou tratados com exclusão competitiva antes da infecção, além disso, não houve diferença significativa na espessura da mucosa entre os pintos dos dois primeiros tratamentos e entre os pintos dos dois últimos.

No 5º e no 7º dpi, ocorreu interação significativa ($p<0,05$) entre sexo e tratamento (Tabela 5 e 6). No 5º dpi, observou-se que pintos machos infectados (I) e os tratados com exclusão competitiva após a infecção (IEC) não diferiram entre si na espessura da mucosa, mas apresentaram mucosa mais espessa que os pintos não infectados e os tratados com exclusão competitiva antes da infecção, os quais também não diferiram entre si nesse parâmetro. Fêmeas infectadas (I) e as tratadas com exclusão competitiva após a infecção (IEC) também não diferiram entre si na espessura da mucosa e apresentaram mucosa mais espessa que as fêmeas não infectadas e as tratadas com exclusão competitiva antes da infecção, mas essas últimas apresentaram paredes cecais mais espessas que as não infectadas.

Ainda no 5º dia, diferenças na espessura da mucosa entre machos e fêmeas foram registradas apenas nos pintos tratados com exclusão competitiva antes da infecção nos tratamento (ECI), cujas fêmeas tiveram paredes cecais mais espessas que os machos. No que se refere ao 7º dpi, a interação entre sexo e tratamentos (Tabelas 5 e 6) mostrou que machos infectados apresentaram maior espessura de mucosa que os machos tratados com exclusão competitiva após a infecção, e esses apresentaram mucosa mais espessa que os machos não infectados e os tratados com exclusão competitiva antes da infecção, que não diferiram entre si nesse parâmetro. Nas fêmeas, a maior espessura de mucosa foi

observada nos pintos tratados com exclusão competitiva após a infecção. Além disso, as fêmeas infectadas apresentaram mucosa mais espessa que as fêmeas não infectadas e as tratadas com exclusão competitiva antes da infecção, que não diferiram entre si nesse parâmetro. Houve diferença significativa ($p<0,05$) na espessura da mucosa entre os sexos apenas para os pintos infectados e os tratados com exclusão competitiva após infecção. Nos primeiros, a mucosa foi mais espessa nos machos que nas fêmeas. Nos últimos, ela foi mais espessa nas fêmeas que nos machos. Para a túnica muscular (Tabela 5), no 1º, 3º e 5º dpi, houve apenas efeito significativo ($p<0,05$) dos tratamentos. No 1º dpi, a túnica muscular mais espessa foi verificada nos pintos tratados com exclusão competitiva após a infecção por SE do que nos pintos dos outros três tratamentos, entre os quais não ocorreu diferença significativa ($p>0,05$) na espessura desta túnica. Já no 3º dpi os pintos infectados apresentaram a maior espessura de muscular, quando comparado aos demais tratamentos.

No 5º dpi, os pintos não infectados e os tratados com exclusão competitiva antes da infecção apresentaram espessura da túnica muscular similares e significativamente inferior aos pintos infectados com SE, que por sua vez, apresentaram valores de espessura inferior aos dos pintos tratados com exclusão competitiva após a infecção por SE. No 7º dpi, a interação entre sexo e tratamentos (Tabelas 5 e 6) mostrou que machos infectados apresentaram maior espessura de muscular que os machos dos demais tratamentos, e que os machos tratados com exclusão competitiva após a infecção tiveram muscular mais espessa que os não infectados e os tratados com exclusão competitiva antes da infecção, que não diferiram entre si nesse parâmetro. Com relação às fêmeas, as infectadas e as tratadas com EC após a infecção (IEC) apresentaram valores de espessura de mucosa similares, mas maiores que as não infectadas e as tratadas com EC antes da infecção por SE, que não diferiram entre si nesse parâmetro. No 7º dpi, não houve diferenças significativas ($p>0,05$) na espessura da muscular cecal entre os sexos.

**Tabela 5.** Efeitos dos sexos e tratamentos sobre espessura (µm) das túnicas mucosa e muscular, em pintos de corte no 1º, 3º, 5º e 7º dpi.

| | Dias pós-infecção | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **1º** | **3º** | **5º** | **7º** |
| Mucosa (µm) | | | | |
| **Sexo (S)** | | | | |
| **M** | 157,04 a | 220,28 a | 285,13 a | 283,37 |
| **F** | 155,75 a | 215,91 a | 277,54 a | 370,07 |
| **Tratamentos (T)** | | | | |
| **NI** | 137,01 c | 186,23 b | 186,40 c | 187,12 |
| **I** | 148,81 bc | 259,95 a | 368,24 a | 391,41 |
| **IEC** | 184,63 a | 238,58 a | 353,96 a | 537,73 |
| **ECI** | 155,11 b | 187,62 b | 216,73 b | 190,63 |
| **Probabilidades** | | | | |
| **S** | 0,8430 $^{ns}$ | 0,5920 $^{ns}$ | 0,5710 $^{ns}$ | <0,0001 * |
| **T** | <0,0001 * | <0,0001 * | <0,0001 * | <0,0001 * |
| **S x T** | 0,4080 $^{ns}$ | 0,4500 $^{ns}$ | 0,0350 * | <0,0001 * |
| **C.V. (%)**[1] | 14,31 | 12,60 | 15,29 | 19,09 |
| Muscular (µm) | | | | |
| **Sexo (S)** | | | | |
| **M** | 184,06 a | 194,48 a | 193,46 a | 220,36 |
| **F** | 197,78 a | 179,00 a | 213,75 a | 251,63 |
| **Tratamentos (T)** | | | | |
| **NI** | 170,44 b | 180,13 b | 185,74 c | 181,24 |
| **I** | 189,51 b | 213,68 a | 217,91 b | 302,43 |
| **IEC** | 222,72 a | 175,03 b | 259,92 a | 290,04 |
| **ECI** | 181,01 b | 178,11 b | 180,86 c | 170,26 |
| **Probabilidades** | | | | |
| **S** | 0,1410 $^{ns}$ | 0,5640 $^{ns}$ | 0,0810 $^{ns}$ | 0,0230 * |
| **T** | 0,0010 * | <0,0001 * | <0,0001 * | <0,0001 * |
| **S x T** | 0,0650 $^{ns}$ | 0,8850 $^{ns}$ | 0,0200 $^{ns}$ | 0,0010 * |
| **C.V. (%)**[1] | 10,77 | 14,21 | 19,75 | 15,45 |

[1] = Coeficiente de variação; $^{ns}$ = não significativo; * = Significativo; a – c: Médias seguidas de letras distintas (colunas) diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$); M: macho, F: fêmea NI: não infectado com SE, I: infectado com SE, IEC: infecção com SE e tratado com EC, ECI: tratado com EC e infectado com SE.

**Tabela 6.** Interação entre os sexos e tratamentos sobre a espessura da túnica mucosa (µm) e muscular, em pintos de corte.

| | Sexos | Tratamentos | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | **NI** | **I** | **IEC** | **ECI** |
| Túnica Mucosa | | | | | |
| **5º DPI** | **M** | 201,45 Ba | 362,07 Aa | 383,42 Aa | 193,61 Bb |
| | **F** | 171,36 Ca | 374,42 Aa | 324,52 Aa | 239,86 Ba |
| **7º DPI** | **M** | 175,42 Ca | 457,79 Aa | 298,64 Bb | 201,66 Ca |
| | **F** | 198,82 Ca | 325,04 Bb | 376,82 Aa | 179,61 Ca |
| Túnica Muscular | | | | | |
| **7º DPI** | **M** | 185,45 Ca | 309,38 Aa | 225,50 Bb | 161,13 Ca |
| | **F** | 177,04 Ba | 295,49 Aa | 354,60 Aa | 179,40 Ba |

A-B, a – b: Médias seguidas de letras distintas (linhas e colunas, respectivamente) diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$); M: macho, F: fêmea NI: não infectado com SE, I: infectado com SE, IEC: infecção com SE e tratado com EC, ECI: tratado com EC e infectado com SE.

**5.6. Quantificação de células inflamatórias**

As Tabelas 7 e 8 contêm os resultados obtidos para o número de células inflamatórias (em 1000 $\mu m^2$) na mucosa e submucosa das pregas cecais.

O número de células inflamatórias na mucosa (Tabela 7) foi influenciado significativamente ($p<0,05$) pela interação entre sexo e tratamento no 1º e 3º dpi e pelo tratamento no 5º dpi. Não houve efeito ($p>0,05$) dos dois fatores analisados sobre o número de células inflamatórias na mucosa no 7º dpi. Os dados da Tabela 8 mostram que, no 1º dpi, machos e fêmeas infectados (I) e os tratados com EC após infecção por SE (IEC) apresentaram número similar de células inflamatórias e significativamente ($p<0,05$) maiores que os registrados para os pintos dos demais tratamentos (NI e ECI). Todavia, nos machos, não ocorreu diferença significativa no número de células inflamatórias entre os pintos não infectados e os tratados com EC antes da infecção, enquanto que nas fêmeas o número de células inflamatórias foi maior nos pintos não infectados que nos tratados com EC antes da infecção. No 1º dpi, não ocorreu diferença no número de células inflamatórias entre os sexos em nenhum tratamento. No 3º dpi, o número de células inflamatórias foi maior nos pintos machos infectados que nos machos dos demais tratamentos, e maior nos machos tratados com EC após a infecção do que nos não infectados e nos tratados com EC antes da infecção por SE, que não diferiram entre si nesse parâmetro. Fêmeas infectadas e as tratados com EC após a infecção tiveram número similar de células inflamatórias, porém maior que as fêmeas não infectadas e as tratadas com EC antes da infecção, as quais também não diferiram entre si na contagem desse tipo celular. Houve diferença entre os sexos na contagem de células inflamatórias apenas nos pintos infectados e nos tratados com EC após a infecção, sendo a contagem maior nas fêmeas que nos machos. No 5º dpi, o número de células inflamatórias foi influenciado significativamente ($p<0,05$) e foi maior nos pintos infectados e nos tratados com EC após a infecção do que nos não infectados e nos tratados com EC antes da infecção. Além disso, não houve diferença significativa nesse parâmetro entre os pintos dos dois tratamentos e entre os pintos dos dois últimos tratamentos

mencionados. No 7º dpi, não ocorreu efeito significativo ($p>0,05$) do sexo e do tratamento e nem interação entre eles.

Para número de células inflamatórias na submucosa (Tabelas 7 e 8), houve interação significativa ($p<0,05$) entre sexo e tratamento no 1º dpi, efeito significativo do sexo e do tratamento no 3º dpi e nenhum efeito dos fatores e da interação entre eles no 5º e 7º dpi. Como mostrado na Tabela 8, no 1º dpi, pintos machos tratados com EC após a infecção por SE (IEC) foram os que apresentaram a maior contagem de células inflamatórias na submucosa, seguidos pelos pintos infectados (I) e pelos tratados com EC antes da infecção por SE (ECI) que por sua vez não diferiram entre si nesse parâmetro, mas apresentaram contagem de células inflamatórias maior que os pintos não infectados. No caso das fêmeas, o maior número de células inflamatórias foi registrado na submucosa das que foram infectadas (I) e das tratadas com EC após a infecção por SE (IEC), as quais apresentaram número similar de células inflamtórias. Ambas, porém, tiveram contagem maior de células inflamatórias que o observado para as fêmeas não infectadas e para as tratados com EC antes da infecção, que também não diferiram entre si nesse parâmetro. Machos e fêmeas diferiram no número de células inflamatórias na submucosa apenas quando infectados. Sendo a contagem maior nas fêmeas que nos machos. No 3º dpi, as fêmeas apresentaram maior número de células inflamatórias na submucosa que os machos. Além disso, os pintos infectados (I) apresentaram maior número de células inflamatórias na submucosa que os não infectados e os tratados com EC antes da infecção por SE. Enquanto que os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si. No 5º e 7º dpi, não ocorreu efeitos significativos ($p>0,05$) dos fatores e nem interação entre eles.

**Tabela 7.** Efeitos dos sexos e tratamentos sobre o número de células inflamatórias em 1000 μm$^2$ de mucosa e submucosa das pregas cecais, em pintos de corte no 1º, 3º, 5º e 7º dpi.

| | Dias pós-infecção | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **1º** | **3º** | **5º** | **7º** |
| Nº de Células inflamatórias na mucosa | | | | |
| **Sexo (S)** | | | | |
| **M** | 13,30 | 7,12 | 2,67 a | 2,45 a |
| **F** | 11,85 | 11,35 | 3,40 a | 1,95 a |
| **Tratamentos (T)** | | | | |
| **NI** | 6,90 | 3,65 | 2,60 b | 2,15 a |
| **I** | 22,30 | 16,85 | 3,90 a | 2,75 a |
| **IEC** | 17,15 | 14,20 | 3,76 a | 2,30 a |
| **ECI** | 3,95 | 2,25 | 1,75 b | 1,60 a |
| **Probabilidades** | | | | |
| **S** | 0,2980 $^{ns}$ | <0,0001 * | 0,0530 $^{ns}$ | 0,0880 $^{ns}$ |
| **T** | <0,0001 * | <0,0001 * | <0,0001 * | 0,0630 $^{ns}$ |
| **S x T** | 0,0200 * | <0,0001 * | 0,2540 $^{ns}$ | 0,1206 $^{ns}$ |
| **C.V. (%)**[1] | 20,44 | 19,61 | 14,40 | 11,22 |
| Nº de Células inflamatórias na submucosa | | | | |
| **Sexo (S)** | | | | |
| **M** | 6,250 | 1,15 b | 0,87 a | 1,250 a |
| **F** | 9,875 | 2,10 a | 1,02 a | 0,925 a |
| **Tratamentos (T)** | | | | |
| **NI** | 3,25 | 1,05 b | 0,60 a | 0,65 a |
| **I** | 11,65 | 2,25 a | 1,00 a | 1,45 a |
| **IEC** | 13,15 | 1,90 a | 1,45 a | 1,00 a |
| **ECI** | 4,20 | 1,30 b | 0,75 a | 0,65 a |
| **Probabilidades** | | | | |
| **S** | 0,0010 * | 0,0170 * | 0,5370 $^{ns}$ | 0,1110 $^{ns}$ |
| **T** | <0,0001 * | 0,0020 * | 0,0790 $^{ns}$ | 0,0650 $^{ns}$ |
| **S x T** | 0,0050 * | 0,3920 $^{ns}$ | 0,9060 $^{ns}$ | 0,1680 $^{ns}$ |
| **C.V. (%)**[1] | 22,14 | 18,37 | 21,65 | 13,74 |

[1] = Coeficiente de variação; $^{ns}$ = não significativo; * = Significativo; a – c: Médias seguidas de letras distintas (colunas) diferem significativamente pelo teste de Tukey ( p ≤ 0,05); M: macho, F: fêmea NI: não infectado com SE, I: infectado com SE, IEC: infecção com SE e tratado com EC, ECI: tratado com EC e infectado com SE.

**Tabela 8.** Interação entre os sexos e tratamentos sobre o número de Células inflamatórias em 1000 $\mu m^2$ de mucosa e submucosa das dobras cecais em pintos de corte.

| | Sexos | Tratamentos | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | **NI** | **I** | **IEC** | **ECI** |
| Nº de Células inflamatórias na mucosa (1000 $\mu m^2$) | | | | | |
| **1º DPI** | **M** | 5,20 Ba | 26,60 Aa | 17,90 Aa | 3,50 Ba |
| | **F** | 8,60 Ba | 18,00 Aa | 16,40 Aa | 4,40 Ca |
| **3º DPI** | **M** | 3,40 Ca | 13,00 Ab | 9,90 Bb | 2,20 Ca |
| | **F** | 3,90 Ba | 20,7 Aa | 18,50 Aa | 2,30 Ba |
| Nº de Células inflamatórias na submucosa (1000 $\mu m^2$) | | | | | |
| **1º DPI** | **M** | 2,60 Ca | 9,90 Ab | 10,70 Aa | 4,80 Ba |
| | **F** | 3,90 Ba | 16,40 Aa | 15,60 Aa | 3,60 Ba |

A-B, a – b: Médias seguidas de letras distintas (linhas e colunas, respectivamente) diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$); M: macho, F: fêmea NI: não infectado com SE, I: infectado com SE, IEC: infecção com SE e tratado com EC, ECI: tratado com EC e infectado com SE.

### 5.7. Quantificação de Células caliciformes

Nos dados das contagens de células caliciformes AB+ e PAS+ são mostrados nas Tabelas 9 e 10.

Para células caliciformes AB+, não ocorreu efeito do sexo, do tratamento e da interação entre eles no 1º dpi.

No 3º dpi, houve influência significativa ($p<0,05$) do sexo e do tratamento. As fêmeas apresentaram menor contagem de células caliciformes AB+ que os machos. Os pintos infectados (I) e os tratados com EC após infecção por SE (IEC) tiveram contagens de células caliciformes AB+ similares e significativamente ($p<0,05$) maiores que os pintos tratados com EC antes da infecção por SE (ECI), que por sua vez, apresentaram valores superiores aos dos pintos não infectados.

No 5º dpi, houve interação significativa entre sexo e tratamento para a contagem de células caliciformes AB+. Como mostrado na Tabela 10, pintos machos não infectados (NI) apresentaram a mesma contagem de células caliciformes AB+ que os tratados com EC após a infecção por SE, porém maior que a contagem observada para os tratados com EC antes da infecção por SE (ECI) e os infectados (I), que não diferiram entre si nesse parâmetro. Para as fêmeas, a menor contagem de células caliciformes AB+ foi registrada nas não infectadas, enquanto que, nos outros três tratamentos não foi observado diferenças entre este parâmetro. Houve diferença entre os sexos nos pintos não infectados e nos tratados com EC antes da infecção. A contagem de células caliciformes AB+ foi maior nas fêmeas que nos machos nas aves tratadas com EC antes da infecção, porém o quadro se inverte nos pintos não infectados, ou seja, neste tratamento são os machos que apresentam a maior contagem de células caliciformes AB+.

No 7º dpi, também ocorreu influência significativa ($p<0,05$) do sexo e do tratamento (Tabela 9). As fêmeas apresentaram maior contagem de células AB+ que os machos. Pintos infectados apresentaram a mesma contagem de células que os tratados com EC após a infecção e contagem maior que os não infectados e os tratados com EC antes da infecção, ao mesmo tempo que os tratados com EC antes da infecção apresentaram maior contagem que os não infectados.

Para a contagem de células caliciformes PAS+, ocorreu influência significativa do tratamento no 1º, 3º e 5º dpi, e do sexo (S) no 3º e 5º dpi, e interação significativa entre sexo e tratamento no 7 dpi.

No 1º dpi, os pintos não infectados (NI) apresentaram menor contagem de células caliciformes PAS+ que os pintos dos outros três tratamentos. No 3º dpi, as fêmeas apresentaram menor contagem de células PAS+ que os machos. Além disso, os pintos infectados (I) e os tratados com EC antes e após a infecção por SE (ECI e IEC) apresentaram contagem similar de células, porém maior que a contagem de células caliciformes PAS+ dos pintos não infectados. No 5º dpi, machos apresentaram contagem maior de células caliciformes PAS+ que as fêmeas. Pintos infectados não diferiram dos tratados com EC após a infecção na contagem dessas células, mas tiveram maior contagem que os pintos não infectados e os tratados com EC antes da infecção. No 7º dpi, como mostra a Tabela 10, machos infectados (I) e os tratados com EC após a infecção por SE (IEC) apresentaram contagem similar de células caliciformes PAS+, mas que foi maior que a observada para os machos não infectados e os tratados com EC antes da infecção, que, por sua vez, não diferiram entre si na contagem dessas células. Ao mesmo tempo, fêmeas infectadas (I) e as tratadas com EC após a infecção por SE (IEC) apresentaram contagem similar de células caliciformes PAS+, mas que foi maior que a observada para os fêmeas tratadas com EC antes da infecção, que, por sua vez, apresentaram valores deste parâmetro significativamente superior aos das não infectadas. Ainda no 7º dpi, não houve diferença na contagem de células caliciformes PAS+ entre os sexos.

**Tabela 9.** Efeitos dos sexos e tratamentos sobre o número de células caliciformes (AB+) e (PAS+) em 300 µm de epitélio das dobras cecais, em pontos de corte no 1º, 3º, 5º e 7º dpi.

| | Dias pós-infecção | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **1º** | **3º** | **5º** | **7º** |
| Nº de células caliciformes AB+/300 µm | | | | |
| **Sexo (S)** | | | | |
| **M** | 15,18 a | 17,87 a | 16,28 | 12,37 b |
| **F** | 16,62 a | 14,43 b | 18,36 | 16,62 a |
| **Tratamentos (T)** | | | | |
| **NI** | 15,75 a | 15,25 c | 15,12 | 9,12 c |
| **I** | 18,75 a | 18,62 a | 18,75 | 19,00 a |
| **IEC** | 13,50 a | 19,37 a | 18,12 | 15,25 ab |
| **ECI** | 15,62 a | 17,37 b | 17,28 | 13,62 b |
| **Probabilidades** | | | | |
| **S** | 0,2330 $^{ns}$ | 0,0050 * | 0,1760 $^{ns}$ | 0,0030 * |
| **T** | 0,0550 $^{ns}$ | <0,0001 * | <0,0001 * | <0,0001 * |
| **S x T** | 0,1340 $^{ns}$ | 0,1260 $^{ns}$ | 0,0120 * | 0,0590 $^{ns}$ |
| **C.V. (%)**[1] | 9,48 | 15,34 | 16,48 | 19,96 |
| Nº de células caliciformes PAS+/300 µm | | | | |
| **Sexo (S)** | | | | |
| **M** | 16,62 a | 12,37 b | 18,75 a | 11,50 |
| **F** | 14,31 a | 15,81 a | 14,81 b | 13,75 |
| **Tratamentos (T)** | | | | |
| **NI** | 11,25 b | 10,87 b | 11,75 c | 8,25 |
| **I** | 18,50 a | 18,62 a | 23,12 a | 15,75 |
| **IEC** | 17,00 a | 17,12 a | 17,62 a | 15,75 |
| **ECI** | 15,12 a | 13,75 a | 14,62 b | 11,25 |
| **Probabilidades** | | | | |
| **S** | 0,1390 $^{ns}$ | 0,0400 * | 0,0010 * | 0,0090 * |
| **T** | 0,0090 * | <0,0001 * | <0,0001 * | <0,0001 * |
| **S x T** | 0,5700 $^{ns}$ | 0,2230 $^{ns}$ | 0,0640 $^{ns}$ | 0,0080 * |
| **C.V. (%)**[1] | 9,12 | 19,91 | 11,50 | 13,25 |

[1] = Coeficiente de variação; $^{ns}$ = não significativo; * = Significativo; a – c: Médias seguidas de letras distintas (colunas) diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$); M: macho, F: fêmea NI: não infectado com SE, I: infectado com SE, IEC: infecção com SE e tratado com EC, ECI: tratado com EC e infectado com SE.

**Tabela 10.** Interação entre os sexos e tratamentos sobre o número de células caliciformes AB+ e PSA+ em 300 $\mu m^2$ de epitélio cecal de pintos de corte.

| | Sexos | Tratamentos | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | **NI** | **I** | **IEC** | **ECI** |
| Nº de células caliciformes AB+/300 µm | | | | | |
| **5º DPI** | **M** | 17,25 Aa | 15,50 Bb | 17,75 Aa | 14,62 Bb |
| | **F** | 13,00 Bb | 22,00 Aa | 18,50 Aa | 19,95 Aa |
| Nº de células caliciformes PAS+/300 µm | | | | | |
| **7º DPI** | **M** | 8,00 Ba | 16,25 Aa | 15,75 Aa | 11,00 Ba |
| | **F** | 6,00 Ca | 15,25 Aa | 14,75 Aa | 10,50 Ba |

A-B, a – b: Médias seguidas de letras distintas (linhas e colunas, respectivamente) diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$); M: macho, F: fêmea NI: não infectado com SE, I: infectado com SE, IEC: infecção com SE e tratado com EC, ECI: tratado com EC e infectado com SE.

# 6. DISCUSSÃO

## 6.1. Condições Clínica, Dados de Necropsia e Mortalidade

No 1º e 3º dpi, em nenhum dos sexos foram constatados sinais clínicos ou alterações macroscópicas aparentes decorrentes da infecção por SE com ou sem tratamento com EC. No 5º e 7º dpi, entretanto, pintos infectados com SE (I) e os tratados com EC após infecção (IEC), machos e fêmeas, apresentaram sonolência e asas caídas, sinais característicos de depressão, e episódios de diarréia, bem como congestão hepática e esplênica, lesões cecais (tiflite) com presença de exsudato caseoso de cor amarelada e espessamento da parede do órgão, sem alterações patológicas aparentes no pulmão e coração. Dados clínicos similares foram registrados por FLORES *et al*. (2008). BARROW (1991), DESMIDT *et al*. (1997), BARROW (2000) e FERNÁNDEZ *et al*. (2001), entretanto, identificaram, em aves inoculadas experimentalmente, sinais clínicos gerais compatíveis com quadro septicêmico (penas arrepiadas, sonolência, tamponamento da cloaca e falta de coordenação) idênticos ao registrados por FERREIRA *et al*. (1990) em infecções naturais por *S*. Enteritidis. HINTON *et al*. (1989), por sua vez, não observaram nenhum sinal clínico em aves de corte recebendo alimentos contaminados com *Salmonella* Enteritidis. No que se refere aos achados de necropsia, diferentemente do observado no presente estudo, BARROW (1991), GORHAM *et al*. (1991,1994), DESMIDT *et al*. (1997), DHILLON *et al*. (1999, 2001), constataram alterações mais pronunciadas no saco vitelínico, ceco e fígado, além do aparecimento de lesões no coração, peritônio e articulação tibiotársica. Por outro lado, HINTON *et al*. (1989) não registraram lesões, embora tenham demonstrado a capacidade invasiva da *Salmonella* Enteritidis em aves jovens, tanto no intestino quanto em outros órgãos. Tais diferenças entre os dados do presente estudo e dos demais autores devem estar relacionadas, sobretudo, ao fato do estabelecimento da infecção envolver a inter-relação entre suscetibilidade do hospedeiro, amostra e dose infectante (GAST 1997), via de inoculação, dose infectante, idade, via de infecção, virulência da cepa, fagotipo e repertório genético determinam a gravidade dos processos infecciosos por *Salmonella* Enteritidis

(BARROW *et al*., 1994; SIEBERS & FINLAY, 1996; KINGSLEY & BAUMER, 2000; WALLIS & GALYOV, 2000).

Tais alterações clínicas e patológicas, entretanto, não foram observadas no presente estudo nos pintos não infectados (NI) e nos tratados com EC antes da infecção (ECI). Considerando que tais animais (NI e ECI), ao contrário dos pintos I e IEC, não apresentaram contagens significativas de *S*. Enteritidis (STERZO *et al*., 2008 – Anexo II), nossos dados mostram que tratamento com EC após infecção não evita os efeitos clínicos e patológicos que são causados pela infecção por SE. Por outro lado, nossos dados reforçam a possibilidade de se evitar os efeitos da infecção por SE quando o tratamento com EC é realizado antes da infecção.

Durante todo o período experimental não foi observado mortalidade em nenhum tratamento experimental, para nenhum dos sexos, corroborando com as observações realizadas por SURESH *et al*. (2006) e OKAMOTO *et al*. (2009), que verificaram que as salmonelas paratifóides geralmente apresentam quadro clínico autolimitante com reversão espontânea em 48 horas. A exceção seria para pintos imunocomprometidos ou em condições de estresse (GAST, 1997), o que, portanto, não ocorreu no presente estudo.

No que se refere ao sexo, os dados do presente trabalho mostram que machos e fêmeas não diferiram quanto aos sinais clínicos e patológicos da infecção por SE e que eles respondem de forma similar ao tratamento com EC, ou seja, EC antes da infecção evita os efeitos da bactéria em estudo.

### 6.2. Características Histológicas, Morfométricas e Contagens de Células Inflamatórias e Células Caliciformes.

No que se refere inicialmente aos pintos infectados por SE, no 1º dpi, pintos infectados, de ambos os sexos, apresentaram cecos contendo áreas congestas e um intenso infiltrado inflamatório na mucosa e submucosa, e aumento na largura das pregas cecais, as quais apresentaram tecido conjuntivo mais frouxo que o observado nas aves controles (não infectadas). De acordo com KUMAR *et al*. (2005), uma inflamação aguda caracteriza-se pelo predomínio de processos exsudativos, em consequência às alterações da permeabilidade vascular que

permite o acúmulo de líquido na região inflamada (edema), fibrina e leucócitos, principalmente os polimorfonucleares (PMN). Apesar do intenso processo inflamatório, a superfície luminal do epitélio cecal, observada por meio de eletronfotomicrografias não revelou nenhuma alteração morfológica neste período. Dessa forma, nossos dados mostram que os pintos responderam inicialmente à infecção por SE com um processo inflamatório agudo e edema nas pregas cecais, corroborando com os dados de KUMAR *et al* (2005), e que o tipo de resposta inicial à infecção não envolveu resposta sexo-especiífica.

A partir do 3º dpi, os pintos infectados, de ambos os sexos, apresentaram aumento do tamanho das pregas cecais, devido ao aumento em suas larguras, ocasionado pelo intenso infiltrado inflamatório ocorrido até o 3° dpi e pela intensa proliferação do tecido conjuntivo da mucosa e submucosa registrado até os 7º dpi (processo de fibrose), que passou de conjuntivo frouxo para conjuntivo denso. Esses processos resultaram em perda gradual das evaginações na superfície das pregas cecais longitudinais, as quais passaram a apresentar aspecto mais liso do 3º para o 7º dpi. Adicionalmente, a espessura da parede cecal e as das túnicas mucosa e muscular aumentaram em conseqüência do processo infeccioso, mas não houve alteração da altura das pregas cecais. Estes dados indicam que o processo inflamatório causado por SE tornou-se crônico a partir do 3° dpi e caracterizado pela ocorrência de processos proliferativos de vasos sanguíneos (angiogênese) e principalmente de tecido conjuntivo (fibrose), concordando com o descrito por KUMAR *et al*. (2005) para inflamações crônicas.

No 5º e 7º dpi, pintos infectados também apresentaram grande perda de células epiteliais no ápice dos vilos, locais onde se observava a presença de maior número de células inflamatórias na mucosa e a exposição freqüente do tecido conjuntivo. Esses dados caracterizam a resposta das aves, machos e fêmeas, à destruição de suas células epiteliais pelo processo de infecção por SE.

A perda da morfologia dos vilos cecais, além de lesões epiteliais (descamação), são decorrentes do processo inflamatório crônico, que, segundo KUMAR *et al*. (2005), pode ser encarado como um mecanismo de defesa do organismo e, como tal, atua destruindo (fagocitose e anticorpos), diluindo (plasma

extravasado) e isolando ou seqüestrando (malha de fibrina) o agente agressor, além de abrir caminho para os processos reparativos (cicatrização e regeneração) do tecido afetado. Por outro lado, a inflamação pode ser potencialmente danosa, uma vez que em sua manifestação pode lesar o próprio organismo, às vezes de forma mais deletéria que o próprio agente injuriante. Segundo JONES (2000), quatro sinais principais ou cardeais da inflamação (rubor, tumor, calor e dor) foram definidos por Celsus (30 a.C.- 36 d.C.): *"Signa inflammationis quatuor sunt: rubor et tumor, cum calor et dolor"*. A estes sinais, Galeno, médico da Antigüidade, segundo alguns autores, ou Virchow, segundo outros, no século XIX, acrescentou um quinto sinal, a perda de função *(functio lesae)* da parte afetada.

A partir do 5º dpi, os cecos apresentaram-se espessados, evidencia de processo cicatricial (proliferação de tecido conjuntivo) e, a partir do 7º dpi este órgão conseqüentemente, perde grande parte de suas características morfofuncionais. Segundo MORTENSEN (1984) e CHAPLIN (1989), os cecos possuem as funções de absorção de água e a digestão de aminoácidos, proteínas e celulose por uma microbiota cecal. Dessa forma, a destruição da mucosa cecal causada pela infecção por SE causa a desestabilização da microbiota natural, reduzindo a função do órgão (FURLAN, 2004). HIRSC (2003) ainda observou que nas infecções por salmonelas ocorre a disfunção da absorção de cloreto de sódio (NaCl), resultando em diarréia, que foi observada no presente estudo em alguns pintos no 5º e 7º dpi.

Pintos tratados com EC após a infecção por SE também apresentaram as alterações histológicas e morfométricas dos cecos registradas para os pintos infectados não tratados com EC, bem como o processo de inflamação agudo até o 3° dpi seguido de um crônico até o 7° dpi. Por outro lado, tais alterações e processos inflamatórios não foram demonstrados pelos pintos tratados com EC antes da infecção por SE, cujos cecos mantiveram-se até o 7° dpi com as características observadas para as aves não infectadas (controles). Tais dados são muito importantes, pois demonstram que tratamento com EC antes da infecção por SE inibe os efeitos deletérios da bactéria sobre as características morfológicas e funcionais dos cecos. Esse efeito benéfico da EC, como já

mencionado no presente discussão, deve ser resultante da não instalação da infecção, como registrado por STERZO *et al*. (2008)

No que se refere as células caliciformes, foi registrada hiperplasia de células PAS+ já no 1º dpi de todos os tratamentos em relação ao grupo não infectado (controle). A partir do 3º dpi, foi observado hiperplasia de células caliciformes PAS+ e AB+ em ambos os sexos e de todos os tratamentos em comparação aos seus respectivos controle (grupo não infectado), exceto nos pintos machos no 5º dpi, que apresentaram contagens de células caliciformes AB+ significativamente inferior ao do grupo não infectado. Além disso, foi constatado influência dos sexos sobre a contagem de células caliciformes no 3º, 5º e 7º dpi, mostrando diferenças sexo-específicas no desenvolvimento da mucosa cecal

De acordo com BLIKSLAGER & ROBERTS (1997), quando a mucosa sofre processo de agressão ocorre aumento do número de células caliciformes nos vilos, estas aumentam suas descargas de secreção durante um processo infeccioso no intestino delgado. Nossos resultados mostraram que este fenômeno também ocorreu, principalmente, nos cecos dos pintos dos tratamentos I e IEC. Entretanto, registrou-se também hiperplasia de células caliciformes PAS+ e AB+ nos pintos do tratamento ECI, esses dados mostram que a exclusão competitiva induziu o aumento do número de células caliciformes e, conseqüentemente, a quantidade de muco. Aumento no número de células caliciformes também foi registrado no intestino delgado de pintos de corte tratados com EC sem infecção por SE por PIRES (2008).

Segundo ANDREATTI FILHO *et al.* (2000), a EC é definida como o conjunto de fatores exercido e/ou estimulado por bactéria intestinal benéfica, como competição por nutrientes e sítios de ligação, estimulação do sistema imune celular e humoral, e produção de bacteriocinas, e que inibe a instalação e/ou multiplicação de bactéria patogênica. Assim, o presente estudo demonstrou que a EC induziu a proliferação de células caliciformes e, conseqüentemente, a produção de muco, sendo mais um fator de proteção ao epitélio cecal. De acordo com FURLAN *et al*. (2004), a mucinas secretada pelas células caliciformes é uma glicoproteína insolúvel em água, cuja função é proteger o epitélio contra a ação

mecânica e contra infecções, pois funciona como barreira protetora que impede o contato de microrganismos com as células epiteliais. Segundo o mesmo autor, o muco do intestino delgado, ceco e colon/reto contém uma rica população de bactérias e protozoários, as quais ligam-se às glicoproteínas e não sofrem aderência à mucosa. Os componentes da mucina funcionam como sítios de ligação para os microrganismos, fazendo com que os mesmos sejam envoltos pela camada de muco e não expressando sua capacidade patogênica.

A solução de bactérias utilizada no tratamento de EC no presente estudo é composta de inúmeras espécies de bactérias, formando um sistema complexo e dinâmico. Ela foi benéfica para os cecos, uma vez que excluiu o agente patogênico (STERZO *et al*., 2008), impedindo a instalação do processo infeccioso e, conseqüentemente, os efeitos deletérios do processo inflamatório.

## 7. CONCLUSÕES

- Pintos infectados por *Salmonella* Enteritidis respondem ao processo infeccioso com um processo inflamatório agudo no 1º dpi, seguido de processo inflamatório crônico a partir do 3º dpi.

- Pintos machos e fêmeas responderam de forma similar à infecço por SE e ao tratamento com EC.

- Do ponto de vista prático, os dados do presente estudo confirmam que o tratamento dos pintos recém-eclodidos, de ambos os sexos, com EC evita que eles sejam infectados por essa bactéria.

- EC induz a proliferação de células caliciformes PAS+ e AB+ e, conseqüentemente, o aumento da produção de muco, sendo um fator de proteção ao epitélio cecal.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEF, 2010. Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango. Disponível em: <http://www.abef.com.br/default.php>. Acesoo em: 30 de Setembro de 2010.

ALMEIDA, W.A.F.; BERCHIERI JUNIOR, A.; BARROW, P.A. The Effect of Serial Culture and Storage on the Protective Potential of a Competitive Exclusion Preparation. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v.4, n.2, p.163-167, 2002.

AMENT, A. J. H. A.; JANSEN, J.; VAN DER GIESSEN, A.; NOTERMANS, S. Costbenefit analysis of a screening strategy for *Salmonella* Enteritidis in poultry. **Veterinary Record**, London, v. 15, n. 1, p. 33-37, 1993.

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

BAMPI. V. Saúde Avícola brasileira: Inverno chegando. Disponível em <http://www.aviculturaindustrial.com.br/Noticias.php>. Acesso em: 25 de junho de 2010.

BARNES, E.M.; IMPEY ,C.S. The isolation and properties of the predominant anaerobic bacteria in the caeca of chickens and turkeys. **British Poultry Science** v.XI, p. 467- 481, 1970.

BARNES, E.M.; IMPEY ,C.S. Some properties of the non-sporing anaerobes from poultry caeca. **Journal** of **Applied Bacteriology,** v.35, p. 241- 251, 1972.

BARROW, P. A.; HUGGINS M. B.; LOVELL, M.; SIMPSON, J. Observations on the pathogenesis of experimental *Salmonella* Typhimurium infection in chickens. **Review of Veterinary Science,** Huntington, v. 42, n. 2, p. 194–199, 1987.

BARROW, P.A.; TUCKER, J.F.; SIMPSON, J.M. Inhibition of colonization of the chicken alimentary tract with Salmonella Typhimurium gram-negative facultatively anaerobic bacteria. **Epidemiology and Infection**, v.98, p.311-322, 1991.

BARROW, P. A. *Salmonella* control-past, present and future. **Avian Pathology,** Berkshire, v. 22, 651–669, 1993.

BARROW, P. A.; HUGGINS, M. B.; LOVELL, M. A. Host specificity of *Salmonella* infectious in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial systema. **Infection and Immunology**, n. 62, p. 4602-4610, 1994.

BARROW, P. A.; LOVELL, M. A.; FROST, A. J.; BLAND, P. Prevention of salmonellosis in gnotobiotic pigs by pre-colonization with avirulent *Salmonella* strains. **In:** THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *SALMONELLA* AND SALMONELLOSIS. ZOOPOLE DEVELOPMENT., Ploufragan, v. 20-22, p. 519-520, 1997.

BARROW, P. A. The paratyphoid salmonellae. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 19, n. 2, p. 351-75, 2000.

BARROW, P. A. *Salmonella* infections: immune and non-immune protection with vaccines. **Avian Pathology,** Sutton Bonington, v. 36, n. 1, p. 1-13, 2007.

BEAN, N.H. Surveillance for foodborne disease outbreaks-USA, 1988-1991. **CDC Surveillance Summaries**, p. 1-66, 1996.

BERCHIERI JÚNIOR, A. Salmoneloses Aviárias. In: BERCHIERI, JR. A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas. FACTA, p.185-195, 2000.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; MURPHY, C. K.; MARSTON, K.; BARROW, P. A. Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enteric* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. **Avian Pathology**, Compton, v. 30, n.1, p. 229-239, 2001.

BLANCHFIELD, B.S.; STAVRIC, T.; GLEESON H.; PIVNICK H. Minimum intestinal inoculum for Nurmi cultures and a new method for determining competitive exclusion of *Salmonella* from chicks. **J. Food Prot.** 47:542–545, 1984.

BLAXLAND, J.D.; CULLEN, G.A.; GORDON, R.F.; JORDAN, F.T. W. Diseases caused by bacteria, micoplasmas and chlamydia. In: R. F.; F. T. W. (Ed.). **Poultry Diseases**. 2 ed. London: Bailliere – Tindall, 1982. cap. 2, p. 9-75.

BLIKSLAGER, A.T.; ROBERTS, C. Mechanisms of intestinal mucosa repair. **Journal of the American Veterinary Medical Association,** 211(11):1437-41, 1997.

BUCHALA, F.G.; ISHIZUKA, M.M.; MATHIAS, L.A.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; CASTRO, A.G.M.; CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; KANASHIRO, A.M.I. Ocorrência de reação sorológica contra *Salmonella* Pullorum em aves de “fundo de quintal” do Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 1-5, 2006.

BUTS, A.R.; CROOM, JR.; WJ FAN, Y.K.; DANIEL, L.R.; BLACK, B.L.; MCBRIDGE, B.W.; BULL, L.S.; TAYLOR, I.L. Jejunal glucose absorption is enhanced by epidermal growth factor in mice. **Journal of Nutrition,** v.124: 231-240, 1987.

CHAPLIN, S.B. Efecty of caecectomy on water and nutrient absorption of birds. **Journal Experimental of Zoology Supplement**, Hoboken, v. 3, p. 81-86, 1989.

CHENG, H.; LEBLOND, C.P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cells in the mouse small intestine. IV. Unitariuan theory of the origin of the four epithelial cell types. **American Journal of Anatomy**, v.141, p. 537-561, 1974.

CUNNINGHAN, J.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Guanabara-Koogan, 450p. 1992.

DESMIDT, M.; DUCALETTE, R.; HAESEBROUCK, F. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis phage types four after experimental infection of young chickens. **Veterinary Microbiology**, v. 56, p. 99-109, 1997.

DHILLON, A.S.; ALISANTOSA, B.N; SHIVAPRASAD, H.L.; JACK, O.; SCHABERG, D.; BANDLI, D. Pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis Phage Types 4, 8 and 23 in broiler chicks. **Avian Diseases**, v. 43, p. 506-515, 1999.

DHILLON, A.S.; SHIVAPRASAD, H.L.; ALISANTOSA, B.N;. JACK, O.; SCHABERG, D.; BANDLI, D.; JOHSNSONS. Pathogenicity of environmental origin Salmonellas in specific pathogen-free chicks. **Poultry Science**, v. 80, n. 9, p. 1323-1328, 2001.

DICKEL, E. L. Utilização da microbiologia convencional, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de *Salmonella* em carcaças de frango para o controle higiênico–sanitário do processo de abate, 2004, f. 133. (**Tese de Doutorado**) em Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

DOWLING RH. Cellular and molecular basis of intestinal and pancreatic adaptation. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.27, Suppl. 193, p. 64-67, 1992.

SILVA, EN; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, vol.4, n.2, pp. 85-100. 2002

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistence in the European Union in 2004. **EFSA J.**, v. 310, n. 10, p. 23-95, 2005.

FERNÁNDEZ, A.; LARA, C.; LOSTE, A.; CALVO, S.; MARCA, M.C. Control of *Salmonella enteritidis* phage type 4 experimental infection by fosfomycin in newly hatched chicks. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease**, v. 24, p. 207-216, 2001.

FERREIRA, A. J. P.; ITO, N. M. K.; BENEZ, S. M.; NOTONHA, A. M. B. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, 1990, Campinas. **Anais**... Campinas: FACTA, 1990. p. 171.

FLORES, G.R.; CASAS, F.C.; LÓPEZ, J.A.Q.; PELÁEZ, C.C.; BRAVO, O.U. Patogenia de *Salmonella enteritidis* FT 13a y *Salmonella enteritidis* biovar Issatschenko en pollos de engorda.***Vet*. Méx**., 39 (2) p.145-160, 2008.

FONTAINE, N.; MESLIN, J. C.; LORY, S.; ANDRIEUX, C. Intestinal mucin distribution in the germ-free rat and heteroxenic rat harbouring a human bacterial flora: Effect on insulin in the diet. **British Journal of Nutrition,** Cambridge, v. 75, p. 882-892, 1996.

FORSHELL, L.P.; WIERUP, M. Salmonella contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. **Review of Science and Techology Off. Int. Epiz**., v.25, n. 2, p. 541-554, 2006.

FORSTNER, J.F.; FORSTNER, G.G. Gastrointestinal mucus. In: Johnson, L.R. **Physiology of the gastrointestinal tract**. New York: Raven Press, p. 1255 1283, 1994.

FORSTNER, J.F.; OLIVER, M.G.; SYLVESTER, F.A. Production, structure and biologic relevance of gastrointestinal mucins. In: Guerrant, R.L. **Infections of gastrointestinal tract**. New York: Raven Press, p. 71-88, 1995.

FOWLER, N.G.; MEAD, G.C. Competitive exclusion and *Salmonella* in poultry. **Veterinary Record**, v.11, p.512, 1989.

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

GAST, R.K.; BEARD, C.W. Production on of *Salmonella* Enteritidis contaminad eggs experimentally infected hens. **Avian Disease**, v.34, p. 438-46, 1990.

GAST, R.K. Understanding *Salmonella* Enteritidis in Laying chickens: the contributions of experimental infections. **International Journal of Food Mirobiology**, Amsterdam, v. 21, n. 1-2, p. 107-116, 1994.

GAST, R..K. *Salmonella* infections. In: CALNEK, B.W. et al. **Diseases of poultry** , 10°ed. Ames: Iowa State University Press, 1997. p.81-121.

GLEESON MD, DOWLING RH, PETERS TS. Biochemical changes in intestinal mucosa after experimental small bowel bypass in the rat. **Clinical Science**, London, 1972; 43: 743-757.

GORHAM, S.L.; KADAVIL, K.; LAMBERT, H.; VAUGAHAN, E.; ABEL, J.; PERT, B. Persistence of *Salmonella enteritidis* in young chickens*.* **Avian Pathology**, v. 20, p. 433-437, 1991.

GORHAM, S.L.; KADAVIL, K.; VAUGAHAN, E.; LAMBERT, H.; PERT, B.; ABEL, J. Gross and microscopic lesions in young chickens experimentally with *Salmonella enteritidis.* **Avian Diseases**, v. 38, p. 816-821, 1994.

HINTON, M.; PEARSON, G. R.; THRELFALL, E. J.; ROWE, B.; WOODWARD, M.; WRAY, C. Experimental *Salmonella enteritidis* infection in chicks. **The Veterinary Record**, n. 124, p. 23, 1989.

HIRSC, D.C. Salmonella. In: DWIGHT C. HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. GUANABARA KOOGAN, 446 p., 2003.

HOLT, J.G. **Bergey`s**: Manual of determinate bacteriology. 9.ed. Baltimore: Willians & Willians, 1994. p.187-7.

HORMAECHE, C.; VILLAREAL, B.; MASTROENI, P.; DOUGAN, G.; CHADFIELD, S.N. Immunity mechanisms in experimental salmonellosis. In: CABELLO, F.; HORMAECHE, C.; MASTROENI, P.; BORINA, L. **The biology of *Salmonella***, Elmsford, 1993. p. 223-235 (Serie A Life Sciences, 2445).

HUMPHREY, T. J. Contamination of egg shell and contents with *Salmonella enteritidis:* a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 21, n. 1-2, p. 31-40, 1994.

ISSACSON, R.E.; FIRKINS, L.D.; WEIGEL, R.M.; ZUCKERMANN, F.A.; DiPIETRO, J.A. Effect of transportation and feed withdrawal on shedding of Salmonella Typhimurium among experimentally infected pigs**. American Journal of Veterinary Research,** v. 60, p. 1155-1158, 1999.

ITO, NMK, MIYAJI CI, LIMA EA, OKABAYASHI S. Saúde Gastrointestinal, manejo e medidas para controlar as enfermidades gastrointestinais. **In:** MENDES AA, NÄÄS IA, MACARI M. Produção de frangos de corte. Campinas. FACTA, p.206-260, 2004.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária.** 6º. ed. São Paulo: Manole, 2000.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 11ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008

KINGSLEY, R. A.; BAUMLER, A. J. Host adaptation and the emergence of infectious diseases: the *Salmonella* paradigm. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 5, p.1006-14, 2000.

KUMAR, V.; FAUSTO, N.; ABBAS, A. Robbins and Cotran´s Pathologic Basis of Disease, 7th ed., Saunders, 2005.

LAX, A.J.; BARROW, P.A.; JONES, P.W.; WALLIS, T.S. Current perspectives in salmonellosis. **British Veterinary Journal,** v. 151, p. 351-377, 1995.

LEV, R.; SPICER, S. Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 12, p. 309, 1964.

LLOYD, A.B.; CUMMING, R.B.; KENT, R.D. Prevention of *Salmonella* Typhimurium infection in poultry by pre-treatment of chickens and poults withintestinal extracts. **Australian Veterinary Journal**, v.53 p. 82-87, 1997.

MAIORKA, A. Efeitos da idade da matriz, do jejum, da energia da ração e da glutamina sobre o desenvolvimento da mucosa intestinal e atividade enzimática do pâncreas de pintos de corte. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, 2002.

McMANUS, J.F.A. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technology**, v. 23, p.99-108, 1948.

MENGE H, ROBINSON JW. The relationship between functional and structural alterations in the rat small intestine following proximal resection of varying extent. **Research in Experimental Medicine**, v.173, p. 41-53, 1978.

MEAD, G.C.; ADAMS, B.W. Some observations on the caecal microflora of the chick during the first two weeks of life. **Bristish Poultry Science**, v.16, p.169-176, 1975.

MILES, R.D. Manipulation of the microflora of the gastrointestinal tract: natural ways to prevent colonisation by pathogens. In: ALTECH BIOTECNOLOGY in THE FEED INDUSTRY, 1993, Florida. **Procceding...** p.133-50.

MORTENSEN, A. Importance of microbial nitrogen metabolism in the cecum of the birds. In: KLUG, M. J.; REDDY, C. A. Current perspectives in microbial ecology. **American Society of Microbiology**, Washington D. C., 1984. p. 273-278.

MURPHY, J. High-quality post-weaning diet is critical to piglet's transition to grain-based diet. **Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs**. Ontário. 10jul.2002.

NURMI, E.; RANTALA, M. New aspects of Salmonella infection in broiler production. **NATURE**, London, v.241, p. 210-1, 1973.

OKAMOTO, A.S.; ANDREATTI FILHO, R.L.; LIMA, E.T; NOUJAIM, J.C. Histopatologia da mucosa intestinal de pintos tratados com *Lactobacillus* spp. e desafiadas com *Salmonella enterica,* subespécie *enterica,* sorotipo Enteritidis. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 568-573, 2009.

OLIVEIRA, D.D.; SILVA, E.N. Salmonela em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfeção da casca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p. 655 - 661, 2000.

OLIVEIRA, G.H.; BERCHIERI, JR. A.; BARROW, P.A. Prevention of *Salmonella* infection by contact using intestinal flora of adults birds and/or a mixture of organic acids. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p.116-120, 2000.

PIRES D.L. Efeito da inoculação via esofágica de microbiota intestinal sobre a hematologia, desenvolvimento e integridade intestinal de pintos de corte. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2008.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMUHL, J.; HICKMAN – BRENNER, F.W. Kauffmann – white seheme. **Research Microbiology**, v.147, n. 39, p.756-9, 1996. Supplement.

PORUS RL. Epithelial hyperplasia following massive small bowel resection in men. **Gastroenterology**, v.48, p.753-757, 1965.

REVOLLEDO, L; FERREIRA, A.J.P.; MEAD, G.C. Prospects in *Salmonella* Control: Competitive Exclusion, Probiotics, and Enhancement of Avian Intestinal Immunity. **Journal of Applyed Poultry Research**, v.15, p.341–351, 2006.

ROBERTON, A.M. & WRIGHT, D.P. Bacterial glycosulfatases and sulfomucin degradation. **Canadian Journal of Gastroenterology,** Oakville, v. 11, p. 361-366, 1997.

ROBERTS, J.A.; SOCKETT, P.N. The socio-economic impact of human *Salmonella* Enteritidis infection. **International Journal of Food Mirobiology**, v 21, p. 117-29, 1994.

RODRIGUE D. C.; TAUXE R. V.; ROWE B. International increase in *Salmonella enteritidis*: a new pandemic? **Epidemiology and infection**, Cambridge, v. 105, p.21-27, 1990.

SAAVEDRA, J. M.; TSCHERMIA, A. Human studies with probiotics and prebiotics: clinical implications. **British Journal Nutrition**, v. 87, p. 241-246. 2002.

SANTOS, D. M. S.; BERCHIERI JR.; A. FERNADES, S. A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 39-42, 2000.

SAS ®. 2004. **User's Guide: Statistics**, Version 10th. SAS Institute Inc., Cary, NC.

SAVAGE, D.C. Factors influencing biocontrol of bacterial pathogens in the intestine. **Food Technology**, v.41, p.82-87, 1987.

SCHNEITZ, C.; . MEAD, C.G. Competitive exclusion. In: ***Salmonella* in Domestic Animals.** C. Wray, and A. Wray, ed. CABI Publishing, Wallingford, Oxford, UK. 301 -322, 2000

SIEBERS, A.; FINLAY, B. B. M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. **Trends in Microbiology**, v. 4, n.1, p. 22-29, 1996.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: Retrospectiva no Brasil**. Revista Brasileira de Ciência Avícola,** Campinas, v. 4, p. 85-100, 2002.

SIMÕES, M.; MARQUES, E. G. L.; ROCHA, M. M. M.; PRANDI, M. A. G.; PISANI, B. Surtos alimentares por *Salmonella* Enteritidis ocorridos na região de Campinas no período de março de 1995 a março de 2001. **In:** CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2001, Foz do Iguaçu, p.143

SMIRNOV, A.; SKLAN, D.; UNI, Z. Mucin dynamics in the chicks small intestine are altered by starvation. **Journal of Nutrition**, v.134, n.4, p.736-742, 2004.

SONCINI, R.A.; MORAES, M.A.Z.; COSTA, J.L.A. Transmissão horizontal de *Salmonella enteritidis* em pintos de um dia de idade. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.2, p.94, 2000.

SONCINI, R.A.; BITTENCOURT, F.L. Contaminação dos ovos após a postura. In: MACARI, M.; GONZALES, E. (Eds). **Manejo da incubação**. Campinas: FACTA, 2003. p.433-453.

STERZO, E. V.; BERCHIERI JUNIOR, A.; BOLELI, I. C. . Avaliação do tratamento por exclusão competitiva antes e após infecção experimental por *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Ensaios e Ciência** (Campo Grande), v. 12, p. 159-169, 2008.

STARVIC S. Competitive exclusion of Salmonella from newly hatched chicks by mixtures of pure bacterial cultures isolated from fecal and cecal contents of adults birds. **Journal of Food Protection**; 48: 778-82, 1985.

SURESH, T.; HATHA, A. A. M.; SCREENIVASA, D. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis and other salmonellas in the eggs and egg

storing trays from retails markets of Coimbatore, south India. **Food Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 294-299, 2006.

TANNOCK, G. W. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. **International Dairy Journal**, Huntington, v.8, n. 5/6, p.527-533, 1998.

TAUNAY, A.E.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G; IRINO, K. The role of public health laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.38, n.2, p. 119-127, 1996.

UNI, Z.; GANOT, S.; SKLAN, D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. **Poultry Science**, v.77, p.75-82, 1998.

UNI, Z.; SMIRNOV, A.; SKLAN, D. Pre and posthatch development of goblet cells in the broiler small intestine: Effect of delayed access to feed. **Poultry Science**, v. 82, p. 320- 327, 2003.

UZZAU, S.; BROWN, D. J.; WALLIS, T.; RUBINO, S.; LEORI, G.; BERNARD, S.; CASEDESUS, J.; PLATT, D. J.; OLSEN, J. E. Host adapted serotypes of *Salmonella* enteric. **Epidemiology and Infectology,** Sassari, v.125, p. 229 -255, 2000.

WALLIS, T. S.; GALYOV, E. E. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 997-1005, 2000.

WELTIZIEN, E. M. Effectes of feed form on gut microflora in broilers. **Poultry Industry Council**, Ontario, v.1, n.5, 2003.

ZHANG-BARBER, L.; TURNER, A. K.; BARROW, P. A. Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. **Vaccine**, London, v. 17, n. 20/21, p. 2538-2545, 1999.

ZIPRIN, R.L.; CORRIER, D.E.; HINTON JR. A.; BEIER, R.C.; SPATES, G.E.; DELOACH, J.R.; ELISSALDE, M.E. Intracloacal *Salmonella typhimurium* infection of broiler chickens: Reduction of colonization with anaerobic organisms and dietary lactose. **Avian Disease**, v.34, p.749–753, 1990.

## ANEXO I – RAÇÃO

Composição da ração utilizada na alimentação da aves durante o experimento

| **Fórmula Ração Inicial** | |
|---|---|
| **Ingredientes** | **%** |
| Milho | 61,400 |
| Farelo de Soja 45,5% | 34,200 |
| Fosfato Bicálcio 24/18 | 2,000 |
| Calcário fino | 0,750 |
| Óleo de Soja | 0,700 |
| Sal comum | 0,400 |
| DI Metionina 99% | 0,185 |
| Lisina | 0,105 |
| Cloreto de Colina 60% | 0,098 |
| Premix frango de corte | 0,120 |

| **Garantia** | |
|---|---|
| Proteína mim | 22 |
| EM mínimo | 2900 |

**Níveis nutricionais informado pelo Fabricante**

## ANEXO II – DADOS MICROBIOLÓGICOS

Efeitos dos sexos e tratamentos sobre o número (Log $_{10}$) de UFC de *Salmonella* Enteritidis (SE) por grama de conteúdo cecal, em pintos de corte, nos primeiros dias pós-infecção (1, 3, 5 e 7 dias).

| | Dias pós-infecção | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **1º** | **3º** | **5º** | **7º** |
| Sexo (S) | | | | |
| M | 4,39 a | 3,70 a | 3,71 a | 4,01 a |
| **F** | 4,36 a | 3,51 a | 3,69 a | 3,92 a |
| **Tratamentos (T)** | | | | |
| NI | < 2,00 b | < 2,00 b | < 2,00 b | < 2,00 b |
| **I** | 6,45 a | 6,34 a | 5,73 a | 6,11 a |
| **IEC** | 7,05 a | 5,08 a | 5,08 a | 5,74 a |
| **ECI** | < 2,00 b | < 2,00 b | < 2,00 b | < 2,00 b |
| *Probabilidades* | | | | |
| S | 0,8870 $^{ns}$ | 0,6110 $^{ns}$ | 0,9450 $^{ns}$ | 0,5210 $^{ns}$ |
| **T** | 0,0000 * | 0,0000 * | 0,0000 * | 0,0000 * |
| **S x T** | 0,2290 $^{ns}$ | 0,3050 $^{ns}$ | 0,1450 $^{ns}$ | 0,0000 * |
| **C.V. (%)**[1] | 23,43 | 17,23 | 11,90 | 13,54 |

[1] = Coeficiente de variação; $^{ns}$ = não significativo; * = Significativo; a – b: Médias seguidas de letras distintas (colunas) diferem significativamente pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05). M: macho, F: fêmea, NI: não infectado com SE, I: infectado com SE, IEC: infecção com SE e tratado com EC, ECI: tratado com EC e infectado com SE.

Interação entre os sexos e tratamentos sobre o número (Log $_{10}$) de UFC de *Salmonella* Enteritidis (SE) por grama de conteúdo cecal, em pintos de corte.

| **Sexo** | **Tratamentos** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **NI** | **I** | **IEC** | **ECI** |
| **M** | < 2,00 Ca | 5,52 Bb | 6,52 Aa | < 2,00 Ca |
| **F** | < 2,00 Ca | 6,70 Aa | 4,90 Bb | < 2,00 Ca |

A-B, a – b: Médias seguidas de letras distintas (linhas e colunas, respectivamente) diferem significativamente pelo teste de Tukey ( p ≤ 0,05); M: macho, F: fêmea NI: não infectado com SE, I: infectado com SE, IEC: infecção com SE e tratado com EC, ECI: tratado com EC e infectado com SE.