

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Utilização da Eletroforese em Gel com Gradiente de Temperatura
na determinação do perfil da microbiota cecal de frangos de corte
contra *Salmonella* Enteritidis

JOÃO CARLOS ZAMAE RODRIGUES

Botucatu – SP
Junho /2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Rodrigues, Joao Carlos Zamae.

Utilização da eletroforese em gel com gradiente de temperatura na determinação do perfil da microbiota cecal de frangos de corte contra Salmonella Enteritidis / Joao Carlos Zamae Rodrigues. - Botucatu, 2015

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

Orientador: Raphael Lúcio Andreatti Filho

Coorientador: Adriano Sakai Okamoto

Capes: 50503014

1. Salmonella enteritidis. 2. Frango de corte. 3. Microbiota. 4. Eletroforese em gel.

Palavras-chave: Frangos; Microbiota intestinal; Salmonella; TGGE; TGGE.

João Carlos Zamae Rodrigues

Utilização da Eletroforese em Gel com Gradiente de Temperatura na
determinação do perfil da microbiota cecal de frangos de corte contra
Salmonella Enteritidis

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho
Presidente e Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP – Botucatu/SP

Prof. Dr. Alexandre Hataka
Membro Titular
Departamento de Clínica Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP – Botucatu/SP

Prof^a. Dr^a. Ana Angelita Sampaio
Membro Titular
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Universidade Estadual de Londrina - UEL – Londrina/PR

Botucatu, 18 de Junho de 2015.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Profº Drº Raphael Andreatti Lúcio Filho, por ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho, pela confiança em mim depositada e pelas palavras de incentivo.

Ao meu coorientador, Profº Drº Adriano Sakai Okamoto pelos ensinamentos transmitidos desde a época da residência, pela dedicação ao meu projeto e paciência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, pela credibilidade e companheirismo.

Ao Profº Drº Josias Rodrigues, pela gratificante parceria profissional desenvolvida e empenho incomensurável em me auxiliar.

Ao Profº Drº Maurício Sforcin, pela generosidade e amizade.

Ao meu amigo Régis Keller pela disponibilidade e horas de trabalho.

A todos as queridas pessoas do Departamento de Parasitologia e Imunologia que tornaram a fase final desse trabalho tão prazerosa. Ana, Luiz, Lula, Camila, Ivy, Profª Alexandrina, Profº Ramon, Profª Vera...

EPÍGRAFE

“Todos são geniais. Mas se você julgar um peixe pela sua capacidade de escalar uma árvore, ele viverá toda sua vida acreditando ser estúpido.”

Albert Einstein

RESUMO

RODRIGUES, J.C.Z. **Utilização da Eletroforese em Gel com Gradiente de Temperatura na determinação do perfil da microbiota cecal de frangos de corte contra *Salmonella* Enteritidis**. Botucatu/SP, 2015, 122p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

A microbiota intestinal das aves exerce papel fundamental no desenvolvimento de seu potencial produtivo por garantir o bom funcionamento do trato gastroentérico e do sistema imunológico a ele intimamente ligado. Por isso diversos aditivos já foram utilizados para favorecer o desenvolvimento de uma microbiota saudável, entretanto, ainda não temos informações sobre o perfil desejável para ela. Sendo assim, nos propusemos a utilizar a Eletroforese em Gel com Gradiente de Temperatura (TGGE), para avaliar a microbiota do ceco de aves alimentadas com dietas acrescidas de halquinol, ácido caprílico e *Lactobacillus*, e posteriormente desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (SE). Aos 10, 20, 30 e 42 dias de vida foram quantificadas as imunoglobulinas IgA, IgM, IgY e interleucinas 17 e 8, avaliada a colonização cecal de SE (UFC/mL), observação histopatológica de tonsila cecal, e esses resultados relacionados com a microbiota cecal avaliada pelo método TGGE. O tratamento com ácido caprílico foi igualmente eficaz ao halquinol na diminuição da colonização por SE, seguidos do grupo tratado com *Lactobacillus*. As concentrações de IL-8 e IgM demonstraram relação com a maturação e desenvolvimento imune local e sistêmico das aves, porém, não identificamos relação com o aumento da complexidade da microbiota, entre os diferentes tratamentos e nos grupos desafiados. No presente estudo também não foi possível reproduzir a técnica de TGGE.

Palavras-chave: *Salmonella*, frangos, TGGE, microbiota intestinal, imunidade.

ABSTRACT

RODRIGUES, J.C.Z. **The Use of Temperature Gradient Gel Electrophoresis to determinate the microbiota profile of broiler chicken against *Salmonella Enteritidis***. Botucatu/SP, 2015, 122p. Dissertação. (Master)- School of Veterinary Medicine and Animal Science, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

The intestinal microbiota of birds plays a fundamental role in the development of their production potential to ensure the proper functioning of a gastrointestinal tract and immune system closely linked to it. So many additives have been used to encourage the growth of a healthy microbiota, however, we still have no information about the desired profile for her. So we set out to use the Gel Electrophoresis with Temperature Gradient (TGGE) to assess the cecal microbiota of birds fed diets plus halquinol, caprylic acid and Lactobacillus, and subsequently challenged with *Salmonella Enteritidis* (SE). At 10, 20, 30 and 42 days old were quantified immunoglobulins IgA, IgM, IgY and interleukins 17:08 assessed cecal colonization IF (CFU / ml), cecal tonsil histopathological observation, and those related to resultados cecal microbiota evaluated by TGGE method. The treatment with caprylic acid was equally effective in reducing the halquinol colonization by IF, followed by the group treated with Lactobacillus. IL-8 and IgM concentrations shown maturation and compared with the local and systemic immune development of the poultry, however, we do not identify relationship with the increased complexity of the microbiota between different tratamentos and challenged groups. In this study it was also not possible to reproduce the TGGE.

Key-words: *Salmonella*, broiler, TGGE, intestinal microbiota, immunity

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Imagem de microscopia óptica (aumento de 100x) de *Escherichia coli* (A) e *Bacillus Subtilis* (B) corados por Gram, demonstrando alta e baixa aderência das amostras em matriz BMM nos testes de adesão *in vitro*.....Página 29
- Figura 2 - Gel da Técnica de TGGE perpendicular demonstrando o padrão de bandas gerado pela desnaturação do DNA das amostras bacterianas selecionadas para comporem a padronização da técnica de TGGE. O intervalo de temperatura compreendido entre 36,4C e 41,6C revela a melhor separação das bandas sem que haja desnaturação do material, observado após 41,6C.....Página 41
- Figura 3 - Contagem bacteriana (UFC/g) de *Salmonella Enteritidis* no ceco das aves dos tratamentos 1 a 8 nos momentos 10, 20, 30 e 42 dias de vida, representada em Log₁₀.....Página 48
- Figura 4 - Concentração de IgM no lavado intestinal das aves dos grupos 1 a 8 nos momentos 10, 20 30 e 42 dia de vida.....Página 54
- Figura 5 - Concentração de IgM no lavado intestinal das aves dos grupos 5 e 6 nos momentos 10, 20, 30 e 42 dias de vida.....Página 56
- Figura 6 - Concentração de IL-8 no sangue das aves do grupo 4 nos momentos 10, 20, 30 e 42 dias de vida.....Página 57
- Figura 9 - Concentração de IL-8 no sangue das aves dos grupos 7 e 8 nos momentos 10, 20, 30 e 42 dias de vida.....Página 58
- Figura 8 - Concentração de IL-8 no sangue das aves dos grupos 1 a 8 nos momentos 10, 20, 30 e 42 dias de vida.....Página 59

- Figura 9 - Concentração de IL-8 no sangue das aves do grupo 3 nos momentos 10, 20, 30 e 42 dias de vida.....Página 60
- Figura 10 - Concentração de IL-8 no sangue das aves do grupo 1 nos momentos 10, 20, 30 e 42 dias de vida.....Página 60
- Figura 11 - Concentração de IL-8 no sangue das aves dos grupos 5 e 6 nos momentos 10, 20, 30 e 42 dias de vida.....Página 62
- Figura 12 - Concentração de IL-8 no sangue das aves do grupo 2 nos momentos 10, 20, 30 e 42 dias de vida.....Página 63
- Figura 13 - Gel da técnica de TGGE com as amostras de DNA bacteriano amplificado referente às amostras cecais das aves.....Página 68
- Figura 14 - Gel da técnica de TGGE com as amostras de DNA bacteriano amplificado referente às amostras cecais das aves e dos camundongos, sendo C1= camundongo 1, C2= camundongo 2, C3= camundongo 3 e C4= camundongo 4.....Página 69
- Figura 15 - Gel da técnica de TGGE com as amostras de DNA bacteriano amplificado referente às amostras cecais das aves.....Página 70
- Figura 16 - Gel da técnica de TGGE com as amostras de DNA bacteriano amplificado referente às amostras cecais das aves.....Página 70
- Figura 17 - Gel de técnica de TGGE com as amostras de DNA bacteriano amplificado referente às amostras cecais das aves, respectivamente da esquerda para direita, de G2M1, G2M2, G2M3, G2M4, G1M2, G1M1, G1M3 e G1M4 (sendo M1= 10 dias, M2= 20 dias, M3= 30 dias, M4= 42 dias.....Página 71
- Figura 18 - Nível de alteração histopatológica dos enterócitos que compõem as tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8

- no aos 10 dias de vida (N= nenhuma, D= discreta, M= moderada, I= intensa).....Página 72
- Figura 19 - Nível de alteração histopatológica dos enterócitos que compõem as tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 no aos 20 dias de vida (N= nenhuma, D= discreta, M= moderada, I= intensa).....Página 73
- Figura 20 - Nível de alteração histopatológica dos enterócitos que compõem as tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 no aos 30 dias de vida (N= nenhuma, D= discreta, M= moderada, I= intensa).....Página 73
- Figura 21 - Nível de alteração histopatológica dos enterócitos que compõem as tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 no aos 42 dias de vida (N= nenhuma, D= discreta, M= moderada, I= intensa).....Página 74
- Figura 22 - Fotomicrografia de um corte de tonsila cecal de um exemplar de G2 aos 20 dias ressaltando as alterações nos enterócitos (20x).....Página 75
- Figura 23 - Nível de reatividade das tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 no aos 10 dias de vida (N= nenhuma, D= discreta, M= moderada, I= intensa).....Página 76
- Figura 24 - Nível de reatividade das tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 no aos 10 dias de vida (N= nenhuma, D= discreta, M= moderada, I= intensa).....Página 76
- Figura 24 - Nível de reatividade das tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 no aos 30 dias de vida (N= nenhum, D= discreta, M= moderada, I= intensa).....Página 76

- Figura 25 - Nível de reatividade das tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 no aos 42 dias de vida (N= nenhum, D= discreta, M= moderada, I= intensa).....Página 77
- Figura 26 - Nível congestão vascular nas tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 no aos 10 dias de vida (N= nenhuma, D= discreta, M= moderada, I= intensa).....Página 77
- Figura 27 - Fotomicrografia de um corte de tonsila cecal de um exemplar de G8 aos 30 dias destacando nódulos linfóides marcando a reatividade das tonsilas cecais (20x).....Página 79
- Figura 28 - Nível congestão vascular nas tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 no aos 20 dias de vida (N= nenhuma, D= discreta , M= moderada , I= intensa)Página 80
- Figura 29 - Nível congestão vascular nas tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 no aos 30 dias de vida (N= nenhum , D= discreta , M= moderada , I= intensa)Página 80
- Figura 30 - Nível congestão vascular nas tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 no aos 42 dias de vida (N= nenhuma alteração, D= discreta , M= moderada , I= intensa).....Página 81
- Figura 31 - Presença de bactérias nas tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 no aos 10, 20, 30 e 42 dias de vida (N= nenhuma alteração, D= discreta, M= moderada, I= intensa).....Página 81
- Figura 32 - Fotomicrografia de um corte de tonsila cecal de um exemplar de G5 aos 10 dias demonstra áreas de discreta congestão (10x).....Página 82

- Figura 33 - Presença de bactérias nas tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 aos 10, 20, 30 e 42 dias de vida (N= nenhum alteração, D= discreta, M= moderada, I= intensa).....Página 83
- Figura 34 - Presença de infiltrado leucocitário nas tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 aos 10 dias de vida (N= nenhum alteração, D= discreta, M= moderada, I= intensa).....Página 84
- Figura 35 - Presença de infiltrado leucocitário nas tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 aos 20 dias de vida (N= nenhum alteração, D= discreta, M= moderada, I= intensa).....Página 84
- Figura 36 - Presença de infiltrado leucocitário nas tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 aos 30 dias de vida (N= nenhum alteração, D= discreta, M= moderada, I= intensa).....Página 85
- Figura 37 - Presença de infiltrado leucocitário nas tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 aos 42 dias de vida (N= nenhum alteração, D= discreta, M= moderada, I= intensa).....Página 85
- Figura 38 – Fotomicrografia de um corte de tonsila cecal de um exemplar de G7 aos 42 dias ressaltando o infiltrado leucocitário na vilosidade dos enterócitos; numerosas células linfóides, bem como células linfóides germinativas (10x).....Página 87

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Composições centesimais e nutricionais da ração basal oferecida às aves de todos os grupos durante o período de criação de 1 a 42 dividido nas fases pré-inicial (1 a 7 dias), inicial (7 a 14 dias), crescimento (15 a 40 dias) e terminação (41 e 42 dias).....Página 25
- Tabela 2 - Quantificação das cepas bacterianas selecionadas para a padronização da técnica de TGGE.....Página 38
- Tabela 3 - Resultado do teste *Spot on the Lawn* procedido com as cepas de *Lactobacillus* spp. previamente selecionadas, frente ao microrganismo indicador *Salmonella* Enteritidis..... Página 43
- Tabela 4 - Resultado do teste de Multiplicação *in vitro* das cepas previamente selecionadas de *Lactobacillus* spp. ao longo do período de 18 horasPágina 43
- Tabela 5 - Resultado do teste de adesão *in vitro*, utilizando-se a matriz BMM, e procedido com as cepas bacterianas de *Lactobacillus* spp previamente selecionadas. Os resultados representam a média das contagens bacterianas de cada uma das cepas avaliadas.....Página 45
- Tabela 6 - Quantificação dos produtos da purificação das amostras cecais dos grupos listados na tabela..... Página 71

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1- Cepas Bacterianas, selecionadas mediante revisão de literatura para representarem as quatro famílias mais frequentemente descritas como componentes da microbiota cecal das aves, bem como o microrganismo desafiante SE e um dos *Lactobacillus* componentes do pool fornecido aos grupos 7 e 8, destinadas à padronização da Técnica de TGGE.....Página 35
- Quadro 2 - Classificação taxonômica das cepas bacterianas selecionadas para a padronização da Técnica de TGGE.....Página 35
- Quadro 3 - Condições de cultivo das cepas bacterianas selecionadas para a padronização da técnica de TGGE.....Página 37
- Quadro 4 - Resultado do sequenciamento genético das cepas de *Lactobacillus* spp. selecionadas por apresentarem os melhores resultados nos testes prévios.....Página 47

LISTA DE ABREVIATURAS

SE	<i>Salmonella</i> Enteritidis
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
IgA	Imunoglobulina A
IL-17	Interleucina-17
IL-8	Interleucina-8
RNA	Ácido Ribonucleico
BMM	<i>Basement Membrane Matrix</i>
AGCC	Ácidos Graxos De Cadeia Curta
AGCM	Ácidos Graxos De Cadeia Média
DNA	<i>Desoxyrribonucleic Acid</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
rDNA	<i>Ribossomal DNA</i>
TGGE	<i>Temperature Gradient Gel Electrophoresis</i>
TTGE	<i>Temporal Temperature Gel Electrophoresis</i>
DGE	<i>Denaturing Gel Electrophoresis</i>
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>
µl	Microlitros
pmol	Picomol
°C	Graus Celsius
MRS	De Man, Rugosa E Sharp
ATCC	<i>American Type Culture Colection</i>
CCT	
mL	Mililitro
Nal	Ácido Nalidixico
Rif	Rifampicina
AVB	Agar Verde Brilhante
UFC	Unidades Formados De Colônia
g	Grama
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
TMB	<i>Tetrametilbenzidina</i>

<i>nm</i>	<i>Nanômetros</i>
HRP	Horseradish Peroxydase
xg	Força G (Gravidade)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
L	Litros
ng	Nanograma
pb	Pares De Base
V	Volts
h	Hora
G	Grupo
PMQR	<i>Plasmide Mediate Quinolone Resistance</i>
sp	Espécie
ssp	Espécies
ph	Potencial Hidrogeniônico
mM	Milimolar
HC	Ácido Clorídrico
MHC	Major Histocompatibility Complex
Tris	Trisaminometano
G+C	Guanina E Citosina
M	Momento
µg	Micrograma
TC	Tonsilas Cecais
GALT	Gastrointestinal Lymphoid Tissue
Cm	Centímetros
Mm	Milímetros
PP	Placas De Peyer

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	Página 1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	Página 2
2.1 <i>Salmonella</i>.....	Página 2
2.2 A microbiota.....	Página 6
2.3 Antibióticos.....	Página 8
2.4 Probióticos.....	Página 10
2.5 Ácidos orgânicos.....	Página 13
2.6 Os métodos de estudo da microbiota.....	Página 16
2.6.1 Eletroforese em Gel com Gradiente de Temperatura (<i>Temperature Gradient Gel Electrophoresis</i> - TGGE).....	Página 18
3 OBJETIVOS.....	Página 23
4 MATERIAL e MÉTODOS.....	Página 23
4.1 Animais e instalações.....	Página 23
4.2 Delineamento experimental.....	Página 24
4.2.1 Dietas experimentais.....	Página 25
4.3 Avaliação de <i>Lactobacillus</i> spp.....	Página 26
4.3.1 Coleta e identificação.....	Página 26
4.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana- Método <i>Spot on the Lawn</i>	Página 27
4.3.3 Capacidade de adesão <i>in vitro</i>	Página 27
4.3.4 Potencial de multiplicação.....	Página 29
4.4 Preparo do <i>pool</i> de <i>Lactobacillus</i>.....	Página 30
4.5 Desafio com <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	Página 30
4.6 Quantificação de <i>Salmonella</i> Enteritidis no ceco.....	Página 31
4.7 Técnica de ELISA.....	Página 31

4.7.1	Quantificação de Imunoglobulina Y.....	Página 31
4.7.2	Quantificação de Imunoglobulina A.....	Página 32
4.7.3	Quantificação de Imunoglobulina M.....	Página 32
4.7.4	Quantificação de Interleucina 8 e 17.....	Página 33
4.8	TGGE.....	Página 34
4.8.1	Padronização.....	Página 34
4.8.2	Cultivo, extração e quantificação das amostras padrão.....	Página 36
4.8.3	Preparo das amostras fecais para o método TGGE.....	Página 38
4.8.4	PCR.....	Página 39
4.8.5	TGGE perpendicular.....	Página 40
4.8.6	TGGE convencional.....	Página 41
4.9	Análise estatística.....	Página 41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	Página 42
5.1	Seleção dos <i>Lactobacillus</i>	Página 42
5.2	Teste de aderência <i>in vitro</i>	Página 44
5.3	Sequenciamento Genético.....	Página 47
5.4	Contagem bacteriana.....	Página 47
5.5	Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	Página 53
5.5.1	Produção de IgM, IgY, IgA.....	Página 53
5.5.2	Produção de IL-8 e IL-17.....	Página 57
5.6	TGGE.....	Página 63
5.7	Histopatologia de tonsila cecal.....	Página 72
6	CONCLUSÕES.....	Página 88
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	Página 72

1. INTRODUÇÃO

Após a crise de 2012, cada segmento da cadeia avícola adotou uma estratégia diferente para se restabelecer. A carne de frango, por exemplo, elevou preços e, assim, impactou positivamente na receita das exportações. Quanto ao mercado interno, a demanda se manteve e, embora produzindo menos, houve maior rentabilidade, a qual se deve em grande parcela à Copa do Mundo de 2014. Com a previsão de mais de 500 mil estrangeiros, além do aumento do consumo, também houve chance de expandir a imagem da nossa carne de frango (ABPA, 2014).

Nesse intuito de expansão perene, com auxílio da Agência Brasileira de Promoção de Exportações e Investimentos (Apex-Brasil), a participação em feiras internacionais como a *Gulfood* (Emirados Árabes Unidos), *Foodex* (Japão) e SIAL (França), garantiu o incremento das exportações para o mercado chinês e novos compradores como Paquistão, Malásia e Mianmar. Permitindo assim, que a avicultura se mantivesse como carro chefe da nossa economia (ABPA, 2014).

Em 2006 a União Européia banuiu o uso de antibióticos promotores de crescimento na avicultura e, desde então, os pesquisadores tem buscado alternativas que permitam o controle dos patógenos intestinais, como a *Salmonella* (NASIR e GRASHORN, 2006). Dada sua variedade de sorotipos e epidemiologia complexa, que tornam difíceis seu controle, o patógeno ainda hoje traz ao setor significativas perdas econômicas com tratamento, mortalidade, morbidade, e comprometimento da imagem dos produtos avícolas perante o consumidor devido aos casos de infecção alimentar (CDC, 2014).

É nesse ínterim que se insere o estudo da microbiota intestinal das aves de produção.

A microbiota intestinal das aves tem um papel importante, pois, forma uma relação de sinergismo com seu hospedeiro (MUZYER; SMALLA, 1998), influenciando sua saúde e produção por afetar a digestão e absorção de nutrientes, morfologia intestinal e capacidade de defesa contra infecções (MEAD, 2000), atuando no desenvolvimento bioquímico, imunológico e fisiológico do organismo (KLASING et al., 1999).

Não obstante, a microbiota tem também grande impacto na absorção e aproveitamento dos componentes da dieta (MUZYER; SMALLA, 1998), nos

quais inclui-se toda a gama de agentes probióticos, enzimas e aditivos a ela adicionados (LERMAN et al., 1984).

Entretanto, estudos prévios utilizaram-se predominantemente de métodos de cultivo para identificar os componentes da microbiota intestinal, deixando assim um grande número de bactérias a serem identificadas devido à falta de conhecimento de meios de cultivo apropriados (TELLEZ, 2006).

Recentemente, estudos moleculares almejam uma visão mais detalhada da composição da microbiota (AMIT-ROMACH et al., 2004), pois, a presença ou ausência de bactérias benéficas ou patógenos específicos pode influenciar na performance geral das aves (TOROK et al., 2008).

Para o estudo genético da composição de microbiotas complexas foi desenvolvida a técnica de eletroforese em gel com gradiente de temperatura, do inglês *Temperature gradient gel electrophoresis* (TGGE), baseada na eletroforese de fragmentos do 16S rDNA amplificados pela PCR (FELSKE et al., 1998). Essa técnica permite que estes fragmentos de DNA de mesmo tamanho, mas diferentes sequências de bases sejam, separados de acordo com suas temperaturas de desnaturação, fazendo com que cada um migre até posições diferentes no gel de eletroforese (MUZYER, 1999).

Uma visão mais elucidativa da microbiota das aves de produção é de grande interesse, não apenas do ponto de vista microbiológico, mas também prático, uma vez que o conhecimento detalhado de sua composição permitirá o desenvolvimento de produtos nutricionais mais efetivos (WANG et al., 2009) e, num futuro próximo, a seleção genética das aves mediante a composição da sua microbiota intestinal (SEIDAVI et al., 2012).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Salmonella*

Salmonella continua entre os mais importantes patógenos transmitidos por alimentos em todo o mundo (BOYLE et al., 2007), em grande parte devido à sua complexa epidemiologia que envolve transmissão vertical, excreção fecal, contaminação do ambiente e existência de reservatórios de diferentes espécies (BERCHIERI JÚNIOR et al., 1993), tornando difícil o seu controle.

As primeiras bactérias do gênero *Salmonella* foram identificadas no fim do século XIX, e o gênero foi assim denominado por Lignieres (1900) em homenagem a Daniel E. Salmon. Seu isolamento e descrição morfológica foram feitos por Gaffky em 1884 sendo *Salmonella* Typhi a primeira reconhecida como um patógeno (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e compreende bacilos curtos, gram-negativos, de metabolismo aeróbio ou anaeróbio facultativo, não-esporogênicos, sendo normalmente móveis com flagelos peritríquios (FORSHELL; WIERUP, 2006). Este gênero possui duas espécies, *S. bongori* e *S. enterica* a qual se divide posteriormente em 6 subespécies, incluindo *S. enterica* subsp. I (subsp. *enterica*), II (subsp. *salamae*), IIIa (subsp. *arizonae*), IIIb (subsp. *diarizonae*), IV (subsp. *houtenae*), and VI (subsp. *indica*). Essas espécies englobam mais de 2600 sorovares, cuja maioria (>1.500) pertence à *S. enterica* subsp. *enterica*, também mais frequentemente associados a doenças em humanos e animais (CDC, 2014).

As espécies são diferenciadas pelo comportamento bioquímico baseado principalmente no metabolismo de açúcares e aminoácidos (FORSHELL; WIERUP, 2006). Já a tipificação dos sorotipos, proposta por Kauffman (1975), baseia-se na combinação dos antígenos somáticos (O), Flagelares (H) e o capsular (Vi) (GRIMONT et al., 2000).

Os sorotipos podem ainda ser subdivididos em biótipo, pela análise dos diferentes padrões de fermentação de açúcares e assimilação de aminoácidos, e fagótipos, baseado na diferença de susceptibilidade das cepas e uma série de bacteriófagos (DUNKLEY et al., 2009).

Alguns sorotipos tem seu habitat limitado a certos hospedeiros, como *S. Typhi* e *S. Paratyphi A* para seres humanos e *S. Gallinarum* biovar *Gallinarum* e *S. Gallinarum* biovar *Pullorum* para as aves, que causam respectivamente, o tifo aviário e a pulorose, e raramente estão envolvidos em casos de infecção alimentar (GANTOIS et al., 2009).

A pulorose é uma enfermidade sistêmica de aves jovens, de caráter crônico ou agudo capaz de causar alta mortalidade nos primeiros dias de vida devido à transmissão vertical. Portanto, a transmissão transovariana é a mais importante via de disseminação. As aves que sobrevivem podem se tornar

portadoras da bactéria, disseminando-a através dos ovos durante meses (BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009).

O tifo aviário é mais comum em aves adultas, de caráter agudo ou crônico e com capacidade de sepse e toxemia, além de morbidade e mortalidade elevadas (SHIVAPRASAD, 2003). A transmissão vertical é pouco provável e, assim, o contato entre aves doentes e saudáveis, o canibalismo e a presença de aves mortas na granja são os fatores mais importantes na transmissão do agente (BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009).

Com exceção desses dois biovars, todos os demais podem causar o paratifo aviário, sendo que *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* afetam as aves com maior frequência (CDC, 2014).

O Paratifo aviário é mais comum em animais jovens e, independente da presença de manifestações clínicas, as aves permanecem portadoras devido à colonização de seu trato entérico (BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009).

Tanto a transmissão vertical quanto a horizontal pode ocorrer, sendo que a vertical deve-se ao contato do ovo com as fezes ao passar pela cloaca, e a horizontal deve-se à contaminação da água, ração, veículos de transporte, seres humanos, moscas, pássaros e roedores que favorecem a introdução e disseminação nas propriedades avícolas (BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009).

Dentre as salmoneloses aviárias, as paratíficas são as de maior interesse em saúde pública e animal, pois, os sorotipos que acometem as aves podem infectar animais e seres humanos indistintamente e estão frequentemente associados a casos de infecção alimentar no homem (FORSHELL; WIERUP, 2006). Estas são um dos maiores problemas de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo de grande preocupação em razão da elevada endemicidade e alta morbidade (CARDINALE et al., 2005).

Os humanos se contaminam pelo consumo de carne e ovos crus ou mal cozidos (MARCUS et al., 2007) contaminados, respectivamente, durante o abate pelo contato das fezes das aves com a carcaça após lesão acidental do trato alimentar à evisceração, e durante a passagem do ovo pelo oviduto ou contato do mesmo com as fezes (GANTOIS et al., 2009). Pode ocorrer ainda a

contaminação cruzada pelas mãos dos trabalhadores infectadas por *Salmonella* ao manejarem equipamentos e utensílios (WHYTE et al., 2002).

Em seres humanos a infecção causa febre e dores abdominais de 12 a 72 horas após o contágio persistindo por 4 a 7 dias. Em crianças, idosos e imunodeprimidos o quadro pode evoluir para um processo septicêmico e então se faz necessária a administração de antibióticos para evitar complicações que possam conduzir ao óbito (DOWRKIN et al., 2001).

Historicamente, *S. Typhimurium* é o agente mais comum em doença de origem alimentar humana, embora nas últimas décadas *S. Enteritidis* tenha sido implicada mais frequentemente nos surtos de salmonelose (FERNANDES et al., 2006).

A introdução de *S. Enteritidis* no Brasil ocorreu provavelmente no final da década de 80 por aquisição de aves reprodutoras infectadas de países europeus (IRINO et al., 1996). Nessa época, a preocupação a respeito da presença de *Salmonella* spp. nos produtos avícolas aumentou devido aos diversos surtos de infecção alimentar na Inglaterra por ingestão de alimentos contendo ingredientes de origem avícola contaminados pela *S. Enteritidis* fagotipo 4 (COLIN, 1996). A transmissão vertical, que perpetua a presença do agente nos plantéis, foi responsável pelo aumento de casos de infecção humana na Europa, na América do Norte e em outras partes do mundo (ICMSF, 1998).

Visando compreender para poder utilizá-lo no combate à *Salmonella*, o sistema imune humoral das aves foi extensamente investigado, tanto a critério de diagnóstico (BURROW, 1992) quanto sua atividade específica contra o patógeno (DESMIDT et al., 1998). Assim, sabe-se que a infecção via oral leva a um aumento nos níveis de imunoglobulinas G (também chamada IgY), IgM e IgA (BEAL et al., 2004), permanecendo detectáveis por pelo menos 35 semanas (Desmidt et al., 1998).

Os níveis de IgM e IgY presentes no soro das aves estão diretamente relacionados à quantidade (UFC) de inóculo administrado (BARROW, 1992) enquanto que IgA tende a se elevar pouco após o desafio e decrescer conforme a eliminação de *Salmonella* do ambiente intestinal (DESMIDT et al., 1998). Embora predominante nos plasmócitos intestinais, IgA também está presente no soro (LESLIE; MARTIN, 1973).

Embora os estudos tenham por muito tempo focado nos sorotipos Enteritides e Typhimurium, atualmente há uma preocupação crescente sobre outros sorotipos como Infantis, Agona, Hadar, Heidelberg e Virchow, como causadores de infecções em humanos (FREITAS NETO et al., 2010).

As motivações para o controle das infecções por *Samonella* spp. nas aves são a redução das perdas devido a doenças clínicas (pulorose e tifo aviário) e subclínicas (infecções paratíficas) (CALNEK, 1997), e em função da sua implicação na saúde humana, a prevenção da transmissão de *Salmonella* spp. por alimentos, a atual prioridade do setor avícola (OLIVEIRA; SILVA, 2000).

2.2. A microbiota

Estudos sobre a composição da microbiota intestinal das aves datam de 1901 por Rahner, mas só em 1970 surgiram pesquisas abrangentes com o objetivo de cultivar o maior número possível de bactérias intestinais (BARNES, 1979). E apesar de todas as partes do trato digestivo das aves serem importantes sítios de interação entre patógenos e a microbiota residente, o ceco recebeu maior atenção devido à densidade de sua microbiota, aproximadamente 10^{11} bactérias por grama de conteúdo (APAJALAHTI et al., 2004).

Segundo Barnes et al. (1997), até o ano de seu estudo, pelo menos 38 cepas de bactérias anaeróbicas foram isoladas do ceco das aves. Hoje se sabe que a ampla atividade fermentativa cecal e a relativa uniformidade das dietas são a razão dos poucos e principais grupos filogenéticos isolados (ZHU et al., 2002).

As bactérias do trato gastrointestinal interagem entre si e com seus hospedeiros, e muitas dessas interações, multifatoriais, permanecem indefinidas devido à falta de conhecimento sobre a completa composição desta microbiota (LYTE, 2010).

O consenso é que essa população pode alterar profundamente a saúde e produtividade do hospedeiro (LYTE, 2010), por influenciar a digestão e a absorção de nutrientes, a morfologia intestinal e a defesa contra infecções (MEAD, 2000). Ademais, ela influencia positivamente o desenvolvimento imunológico, bioquímico e fisiológico (KLASING et al., 1999).

Muitos fatores podem influenciar a composição da microbiota intestinal das aves, dentre as quais seus próprios componentes e as características de seu hospedeiro, as quais incluem genótipo, idade (VAN DER WIELEN, 2002), condição imune, pH intestinal (WILLIAMS et al., 2001), motilidade intestinal, atividade secretória da mucosa e *turnover* celular (MARTIN et al., 2012).

Na produção comercial de frangos as aves são incubadas em ambiente limpo (CRHANNOVA et al., 2011) e, apesar de importante, a restrita higiene representa um problema (METHNER et al., 2004): a falta de provedores de uma microbiota (CHRANOVA et al., 2011). Assim, a colonização intestinal em pintos neonatos é uma questão de coincidência e seu trato intestinal estéril passa a ser um local de multiplicação irrestrita para patógenos (METHNER et al., 2004).

Os eventos que ocorrem logo após a incubação, principalmente durante as três primeiras semanas (YIN et al., 2010), são de particular importância para o desenvolvimento da microbiota. Ela é capaz de conferir resposta imune (CRHANNOVA et al., 2011) e bons índices produtivos, já que aves saudáveis apresentam seu máximo potencial sem perda energética com a confecção de resposta imune (YIN et al., 2010).

A interação entre o sistema imune e a microbiota se inicia imediatamente após o nascimento e leva ao aumento da expressão de interleucina 8. Isso resulta na infiltração de heterófilos e linfócitos na lâmina própria do epitélio intestinal e normalização do sistema imune local (BAR-SHIRA e FRIEDMAN, 2006). Essas células, mais tarde, desenvolvem-se, a depender da composição da microbiota residente, em diferentes linhagens celulares com receptores também variáveis (MWANGI et al., 2012).

Nesse mesmo aspecto, Chranova et al. (2011) observaram um aumento transitório na expressão de interleucinas 8 e 17 no ceco de aves com 4 dias de vida, indicando inflamação e maturação do sistema imune entérico. Em acréscimo, Kaiser (2010) aferiu que a presença de microrganismos no intestino leva o sistema imune inato a induzir receptores chamados *toll-like receptors* (TLR), que são receptores de patógenos, além da expressão de várias citocinas pró-inflamatórias e peptídeos antimicrobianos, como as defensinas, relacionadas à indução da resposta imune. Esses fatores permitem que os padrões de resposta imune às bactérias comensais e patógenos possam

sobrepôr-se, sendo o primeiro um subconjunto do segundo (CRHANNOVA et al., 2011).

Estudos prévios mostram que em humanos as mudanças na microbiota geralmente ocorrem em neonatos e indivíduos mais velhos (SCHWIERTZ et al., 2003). O mesmo padrão foi observado por Crhanova et al. (2011), que demonstraram um aumento progressivo da complexidade da microbiota do primeiro até o 19º dia de vida em pintos de corte. E já se sabe que a estabilidade da microbiota está diretamente relacionada à sua diversidade, pois, a redução dessa diversidade faz diminuir a estabilidade da microbiota (SCHWIERTZ et al., 2003).

Por isso, na tentativa de garantir que as aves possuam uma microbiota benéfica desde os primeiros dias de vida, várias estratégias foram propostas.

Sabendo-se do fundamental papel da interação da dieta com o hospedeiro, os diversos fatores a ela relacionados já foram estudados para se saber como influenciam a microbiota, e, por consequência, o controle das salmoneloses aviárias. Dentre estes, citamos a concentração de nutrientes (WILLIAMS et al., 2001), tipos de grão (HUBENER et al., 2002), fontes energéticas (MATHLOUTHI et al., 2002), forma física e aditivos (VIDABRACHI et al., 2006), nos quais se incluem probióticos, promotores de crescimento e ácidos orgânicos.

2.3. Antibióticos

Até a década de 80, dosagens subterapêuticas de antibióticos foram extensivamente utilizadas em avicultura, pois eles aumentavam a taxa de crescimento e eficiência alimentar das aves de produção como resultado de uma melhora na saúde intestinal resultando em melhor utilização dos nutrientes e conversão alimentar. Tais resultados conferiram aos antibióticos o cunho de promotores de crescimento Visek (1978).

Vários estudos foram conduzidos com antibióticos promotores de crescimento como avilamicina, virginiamicina, lincomicina, flavofosfolipol e bacitracina (CHEN, 2005) para comprovar sua capacidade em reduzir a contagem de bactérias patogênicas no intestino das aves. Entretanto, ao reduzir as bactérias gram-positivas, muitos conferiam vantagem às bactérias gram negativas como *E. coli*, *Salmonella* e *Campylobacter* (CHAPMAN, 1998).

Em verdade, praticamente todos os animais que receberam doses terapêuticas de antibióticos sofrem importantes alterações da microbiota intestinal (KAUTS, 1999).

A grande quantidade de antibióticos utilizada em pequenas doses para controlar doenças e melhorar o desempenho dos animais de produção (AKINLEY, 2008) é um importante fator no surgimento da resistência bacteriana, que poderia ser transferida para os humanos através do consumo dos produtos animais (TOLLEFSON et al., 1997). Foi constatado que a maioria das infecções alimentares causadas por *Salmonella* em humanos devem-se cepas resistentes a antimicrobianos. (HOLT et al., 2007).

Preocupado com essa questão, o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) lança periodicamente uma lista com os agentes liberados para uso em animais de produção, da qual faz parte o halquinol, do grupo das quinolonas.

As quinolonas foram introduzidas na década de 60 para tratamento de disenterias em humanos e, posteriormente, para o tratamento de infecções bacterianas em aves. O halquinol é uma quinolona cujo princípio ativo é conhecido como Clorohidroxiquinolina e tem como base a combinação de 57 a 74% de 5,7-dicloro-8-hidroxiquinolina, 23 a 40% de 5-cloro-8-hidroxiquinolina e até 4,% de 7-clor-8-hidroxi quinolina (SWETHA, 2007). Possui amplo espectro de ação com gram-negativas e gram-positivas, não é alterado pela peletização e reduz o peristaltismo intestinal em 7,5% potencializando o aproveitamento dos alimentos.

Seu mecanismo de ação está relacionado à afinidade por zinco, ferro e cobre presentes nas bactérias, provocando a lise bacteriana. E não há risco de intoxicação por administração crônica em frangos ou poedeiras e o uso recomendado é de 250 gramas do produto por tonelada de alimento (MATEOS et al., 2012).

Entretanto, a descréscimo na eficácia de alguns antibióticos, o risco de resíduos nos alimentos de origem animal e a preocupação pública com o aparecimento da resistência bacteriana em bactérias patogênicas como *Salmonella* spp., desafiam indústria avícola a encontrar alternativas para seu controle (BOYLE et al., 2007).

Como resultado, em janeiro de 2006, a União Européia banuiu o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento na produção avícola (NASIR

e GRASHORN, 2006). Essa medida, em conjunto com a preferência dos consumidores, obrigou o governo de outros países ligados à exportação de produtos avícolas a adotarem medidas semelhantes. Por essas razões, alternativas ao uso dos promotores de crescimento surgiram nas últimas décadas. Dentre elas, os probióticos (TELLEZ et al., 2006).

2.4. Probióticos

Probiótico em grego significa “para a vida”. Esse termo antagônico a antibiótico foi originalmente utilizado por Lilly e Stillwell (1965) para designar “substâncias secretadas por microrganismos que estimulam o crescimento de outros”.

Contudo, foi Parker (1974) o primeiro a usar a palavra referindo-se a organismo e substâncias que contribuem para o balanço intestinal. Essa definição foi modificada por Fuller (1989), que excluiu a palavra “substância” impedindo a inclusão de alguns antibióticos à categoria, passando a designar “suplementos alimentares, compostos por flora microbiana viva, que afetam benéficamente o hospedeiro melhorando o seu balanço intestinal”.

Os primeiros a abordarem o tema na avicultura foram Rantala e Nurmi (1973) que conseguiram evitar a infecção de *Salmonella* Infantis em pintos ao administrar-lhes conteúdo intestinal de galinhas adultas (EDENS, 2003). Entretanto, havia o problema da transmissão de agentes patogênicos caso a galinhas doadoras estivessem infectadas. Este problema foi minimizado com o cultivo *in vitro* da microbiota cecal de galinhas SPF (*Specific pathogen free*) (FULLER, 2001).

Posteriormente, foram feitas várias tentativas para isolar de culturas intestinais de aves adultas, microrganismos posteriormente identificados (SCHOENI; WONG, 1994), ou não identificados (GLEESON et al., 1989), que apresentassem propriedades probióticas.

O conceito de probiose, apesar de não ser novo, apenas recentemente recebeu interesse científico, fazendo com que os probióticos ganhassem aceitação como alternativas em potencial aos promotores de crescimento e, em seletos casos, para o controle de patógenos intestinais (WILLIAMS et al., 2009).

Atualmente, sabe-se que as bactérias probióticas não atuam apenas pelo mecanismo de exclusão competitiva, mas também por influência ao sistema imune (LI et al., 2009), à atividade enzimática (MOUNTZOURIS et al., 2007), à morfologia intestinal e até ao metabolismo, beneficiando a sanidade e produtividade do hospedeiro (RAHIMI et al., 2009).

Na última década os probióticos com componentes identificados ganharam maior preponderância (MONTZOURIS et al., 2007), e, na sua maioria, as pesquisas estão centradas nas bactérias lácticas ou similares (FULLER, 2001). Hoje em dia há produtos comerciais com 28 (HOLLISTER et al., 1999) e até 32 (SCHNEITZ et al., 1998) cepas diferentes.

Além de culturas de conteúdo intestinal, também tem sido estudados microrganismos de origem externa às aves, dentre eles várias estirpes de *Bacillus* spp. (VILA et al., 2009) que normalmente não colonizam o intestino, tendo que ser administrados de modo contínuo no alimento (FULLER, 2001).

Segundo Lu (2003), numa galinha adulta a microbiota ideal é composta por bactérias pertencentes à família Clostridiaceae, aos gêneros *Enterococcus*, *Streptococcus* e, principalmente, *Lactobacillus*.

Nos últimos anos a utilização de probióticos na indústria de produção contendo *Lactobacillus* cresceu muito (ANDREATTI FILHO et al., 2009) devido à sua comprovada eficiência para o ganho de peso, melhoria da conversão alimentar e diminuição da mortalidade em aves de produção (HUANG et al., 2004).

Lactobacillus são bactérias gram-positivas, não esporuladas, usualmente imóveis, capazes de reduzir o nitrato e que podem ser divididos em três grupos distintos de RNA ribossomal 16S (FOOKS; GIBSON, 2002). Esses organismos apatogênicos tanto para animais quanto para humanos (TELLEZ et al., 2006).

Tortuero (1973) reportou um aumento na taxa de crescimento de pintos que haviam recebido cultura de *Lactobacillus acidophilus* via água de bebida por onze dias a partir do incubatório. Desde então, outros pesquisadores tem reportado a importância deste gênero na melhora das funções biológicas dos animais de produção (PERDIGON, 1995).

Segundo Lan et al. (2005) *Lactobacillus* spp. está associado à maturação e integridade do trato gastrointestinal, antagonismo aos patógenos e regulação imune. Uma vez no trato gastrointestinal, elas balanceiam

favoravelmente a microbiota, ativando o sistema imune inato e aumentando a imunidade adaptativa, especialmente durante as infecções (SANCHEZ et al., 2010).

Acredita-se que um dos mecanismos de estímulo ao sistema imune seja a indução da produção de imunoglobulinas (BAR-SHIRA; FRIEDMAN, 2006). Segundo McGehee et al. (1992) a administração por via oral de *Lactobacillus* e seu contato com o tecido linfóide entérico favorecem a produção local de imunoglobulina A (IgA) e sistêmica de imunoglobulina G (IgY) (MUIR et al., 2000). Já Haghighi et al. (2005) descreveram um aumento sérico de IgY em galinhas que receberam ração suplementada com diferentes amostras de *Lactobacillus*.

Rocha et al. (2010) aferiram que, após a administração de *Lactobacillus* à pintos de corte, houve aumento na produção de IgA e IgY intestinal, úteis na prevenção contra *Salmonella* spp. Nesse mesmo contexto, pintos de corte que receberam probiótico *in ovo* ou na ração, e foram desafiados com *Salmonella* Enteritidis, apresentaram redução significativa da colonização pelo patógeno em ceco, papo, além da melhora do peso vivo aos 21 dias (LEANDRO et al., 2010).

Os mecanismos que permitem a redução de bactérias patogênicas, além da exclusão competitiva e estímulo imune local e sistêmico, seriam ainda a produção de substâncias bactericidas, alteração do metabolismo microbiano, modificação da atividade metabólica do trato intestinal e adesão à mucosa (BARBÉS, 2001) formando uma barreira contra os patógenos (SANCHEZ et al., 2010).

Por ser considerado um pré-requisito para a acolonização (BEACHEY, 1981), a capacidade de adesão ao epitélio intestinal é uma das mais importantes características de *Lactobacillus* e, portanto, fundamental como critério de seleção de cepas probióticas (OUWEHAND et al., 1999). Além disso, estudos demonstraram haver uma correlação entre esta habilidade e o título de anticorpos no soro de animais tratados com probióticos (O'HALLORAN et al., 1998).

A dificuldade de avaliar a capacidade de adesão *in vivo*, gerou a necessidade de desenvolvimento de técnicas *in vitro* (BLUM et al., 1999). Assim, culturas celulares, diversos tecidos, mucosa e muco intestinal e

proteínas de matriz extracelular e seus diversos componentes foram testados. Dentre as diversas membranas, citamos a *Basement Membrane Matrix* - BMM (BD®- Becton Dickinson, Sparks, MD) (SCHAR-ZAMMARETTI; UBBINK, 2003).

A BMM é um composto de proteínas de membrana basal, solúvel, e que a 37°C dá origem a um gel, usado testes de morfogênese, diferenciação e crescimento tumoral e mais recentemente em testes de adesão e invasão bacteriana (LEE et al., 2014).

Utilizando-se deste método, Bouzaine et al. (2005) e Horie et al. (2002) reportaram bons resultados quando trabalhando com cepas de *Lactobacillus*.

Curiosamente, a capacidade de adesão independe da viabilidade da bactéria (HOOD; ZOTTOLA, 1988) e ela também não garante a integração perene dela à microbiota. Com exceção do que ocorre em animais gnotobióticos, os probióticos parecem colonizar o sítio hospedeiro transitoriamente, não sendo mais recuperado nas fezes dias ou semanas após o fim de sua administração oral (HAVENNAR; SCHAAFSMA, 1998).

Em virtude de sua permanência transitória, sua ação deve ser eficaz. Por isso, abordamos a capacidade de antagonismo como influência positiva dos probióticos em manter a homeostase intestinal (VOGEL, 2008). Ela pode ser exercida pela produção de substâncias como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono (OUWEHAND, 1999) ou pelo mecanismo de exclusão competitiva na qual a bactéria probiótica ocupa o lugar de uma bactéria enterotoxigênica ou enteroinvasiva. Esta capacidade está bem descrita para o gênero *Lactobacillus* e também é um meio de estímulo ao sistema imune (MOURA et al., 2001).

Para avaliar esse antagonismo muitos pesquisadores utilizaram-se da técnica de cocultura Spot on the Lawn na qual a bactéria probiótica é cultivada sobre uma placa de Agar na qual foi semeada a bactéria patogênica, dando origem a halos de inibição que podem ser mensurados (SANTOS et al., 2001).

2.5. Ácidos orgânicos

Dentre as medidas de proteção das aves contra *Salmonella* está a suplementação da dieta com componentes ácidos (VAN IMMERSEEL et al., 2002). A produção e utilização de ácidos orgânicos no ceco foi proposta por

Mead (1974), baseada na ação de bactérias degradadoras de ácido úrico isoladas das fezes do ceco.

As atividades biológicas dos ácidos graxos tem papel na defesa do hospedeiro contra potenciais agentes patogênicos ou microrganismos oportunistas, pela inibição do seu crescimento ou eliminação direta deles. Há uma extensa literatura sobre os efeitos bactericidas de ácidos graxos de diferentes fontes biológicas, incluindo animais e plantas (DESBOIS et al., 2009).

Alguns dos efeitos às bactérias conferidos pelos ácidos graxos se devem à sua estrutura anfipática, que permite a interação com as bactérias criando poros transitórios ou permanentes nas membranas, impedindo seu equilíbrio celular com o ambiente (WOJTCZAK; WIECKOWSKI, 1999). Outro método de inibição é a indução à auto-oxidação (DESBOIS; SMITH, 2009).

Vários estudos recentes descrevem a avaliação da adição de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como os ácidos fórmico, acético, propiônico e butírico, e dos ácidos graxos de cadeia média como o capróico, caprílico, cáprico e láurico, à ração de aves de produção (HILMARSSON et al., 2006). O resultado é que os AGCM possuem uma atividade antibacteriana mais pronunciada (HERMANS et al., 2010) tanto contra bactérias gram-positivas quanto contra gram-negativas (MONTAGNE et al., 2003).

Alguns mecanismos são atribuídos à sua ação antibacteriana como a penetração e incorporação na membrana plasmática, alteração da permeabilidade da membrana bacteriana (BERGSSON et al., 1999) e difusão no protoplasma bacteriano, com consequente acidificação intracelular (SUN et al., 1998). Além disso, pode também causar alterações físicas no intestino e na sua microbiota (SOLIS DE LOS SANTOS et al., 2008).

A ação dos AGCM contra *Salmonella* foi descrita por Van Immerseel et al. (2004), mesmo em baixa concentração (10mM), e também por Solis de los Santos et al. (2010), segundo a ação profilática do ácido acético na redução da colonização cecal de pintos. Johnny et al. (2009) também obtiveram redução na colonização por *S. Enteritidis* administrando profilaticamente o ácido caprílico a frangos de 18 dias antes de desafiá-los com o patógeno.

Ademais, a invasão de *S. Enteritidis* nas células intestinais diminui após incubação das bactérias com ácido caprílico, efeito também observado para os

sorotipos Typhimurium, Paratyphi B e Hadar (VAN IMERSEEL et al., 2004). Em contrapartida a suplementação com ácido acético parece favorecer a invasão dos enterócitos (VAN IMMERSEEL et al., 2002). Num estudo com ácidos graxos de cadeia com 2 a 18 carbonos, o ácido caprílico foi mais efetivo contra múltiplos sorotipos de *Salmonella* (SKRIVANOVÁ et al., 2006).

Mais recentemente, Kollanoor-Johny et al. (2012) revelaram que a administração de ácido caprílico foi efetiva na redução de *S. Enteritidis* em várias partes do intestino, fígado e baço de frangos, porém, mais pronunciada no ceco, com redução de 3 logs nas contagens bacterianas. Além disso, constatou-se no mesmo estudo que a inclusão do ácido não resultou em diminuição do consumo alimentar nem do ganho de peso.

Pelo conteúdo exposto, nota-se que todos os métodos de controle de *Salmonella* influenciam e alteram a constituição da microbiota intestinal. Nesse sentido, novos horizontes surgem no campo de estudo das aves de produção com investigações para detecção desta microbiota simultaneamente aos efeitos de componentes da sua dieta, já que esse é um dos pontos fundamentais para a sanidade e performance das aves (SEIDAVI et al., 2012).

A importância da microbiota intestinal para as aves de produção é estudada há décadas (APAJALAHTI, 2012) e hoje se sabe que seu equilíbrio é fundamental na prevenção de patógenos como *Salmonella* (VAN COILLIE et al., 2007).

Em aves saudáveis a microbiota é composta por centenas de gêneros e espécies coexistindo em equilíbrio para garantir uma homeostase, logo, o desbalanço nas suas proporções pode ser prejudicial (BJERRUM et al., 2006). Não apenas processos patológicos, mas também a idade, o ambiente, a genética e, sobretudo a dieta, influenciam na composição da microbiota intestinal (APAJAHLATI et al., 2001).

Os estudos atuais especulam que haja um perfil microbiano associado ao alto desempenho nas aves e essa correlação, dieta-microbiota-desempenho, pode dever-se a bactérias especializadas numa alta conversão dos componentes da dieta em energia metabolizável para seu hospedeiro, resultando numa melhora da conversão alimentar (APAJALAHTI et al., 2012).

2.6 Os métodos de estudo da microbiota

Os métodos utilizados para avaliação da microbiota, até muito recentemente, abordavam-na com meios de cultivo para sua identificação (AMIT-ROMACH et al., 2004), porém, eles abrangem apenas as bactérias cultiváveis da microbiota (ROLFE, 2000), e, raramente permitem a identificação ao nível de espécie (GONG et al., 2007). Além disso, esses estudos limitaram-se ao estudo das bactérias no conteúdo cecal, deixando por abordar aquelas aderidas à mucosa, que podem ser de grande valor para o estudo da exclusão competitiva, visto que, pelo seu habitat natural, podem formar uma barreira à invasão intestinal (MEAD et al., 1997).

Consequentemente, foi estipulado que apenas 10 a 60% do total das bactérias cecais podem ser detectadas por cultivo. Portanto, um grande número delas permanece não identificado devido à falta de meios de cultivo apropriados (TELLEZ, 2006). Thi Ngoc Lan et al., (2002) reportaram que 90% das bactérias presentes no ceco das aves não são cultiváveis.

Apenas recentemente técnicas moleculares foram utilizadas para a investigação da microbiota intestinal das aves utilizando a marcação do DNA bacteriano e, assim, gerando uma visão mais detalhada do assunto (APAJALAHTI et al., 2004).

Essas pesquisas sugeriram que a microbiota das aves contém mais de 650 espécies (CALLAWAY et al., 2008) pertencentes a pelos menos 140 gêneros (AHIR et al., 2012). Desse total, mais da metade dos gêneros são desconhecidos (CALLAWAY et al., 2008).

Das que puderam ser identificadas, a maioria é compatível com *Clostridium leptum*, *C. coccoides* e *Sporomusa* sp. Em baixas quantidades estão as sequências representando o grupo bacteroides, os gêneros *Atopium*, *Actinomyces* e *Bifidobacterium* (ZHU et al., 2002).

A classe Clostridia, cujo gênero *Clostridium* está implicado na enterite necrótica (MILLER et al., 2010), foi descrito como abundante também por Lu et al. (2003), Zhu et al. (2002) e Escarcha et al. (2012) que não detectaram efeitos deletérios oriundos da sua presença. Já o gênero *Bacteroides* aparece como influente no metabolismo alimentar (BACKHED et al., 2004), aceleração no desenvolvimento da mucosa intestinal (STAPPENBECK et al., 2002) e sistema

imune, elevando a imunidade do hospedeiro (HOOPER, 2004) e manutenção do balanço da microbiota intestinal (SEARS, 2005).

Começando com os estudos de Nurmi e Rantala (1973), meios práticos foram desenvolvidos para promover o estabelecimento de uma microbiota intestinal madura em aves recém-nascidas, pois, desde o estudo de Milner e Schafer (1952) sabe-se da capacidade da microbiota madura conferir resistência à infecção por *Salmonella* spp. Por isso, inúmeras culturas bacterianas foram administradas a aves jovens e tiveram sua eficácia testada na inibição desse patógeno (DELOACH, 1998).

O consenso que derivou desses estudos foi que, para prevenir a infecção por *Salmonella*, a administração de múltiplas bactérias da microbiota de aves adultas, é melhor que a administração de uma única cepa. Mas ainda não se sabe se todas ou apenas algumas bactérias são necessárias para garantir o efeito desejado. Nosso conhecimento limitado da contribuição das diferentes bactérias intestinais para o fenômeno da exclusão competitiva deve-se, em parte, à falta de dados sobre composição da microbiota intestinal de aves adultas (ZHU et al., 2003).

Os ensaios bioquímicos foram o primeiro método utilizado para identificar microrganismos, porém, eles requerem tempo excessivo, habilidade e padrões técnicos apurados (SETTANNI e CORSETTI, 2007). Além disso, é impossível identificar novas espécies e cepas bacterianas utilizando-se os meios de cultivo já conhecidos (SEIDAVI et al., 2012).

Barnes (1979) já estimava que apenas de 10 a 60% das bactérias no ceco podem ser cultivadas. Para vencer alguns desses problemas, técnicas moleculares que não necessitam do cultivo prévio tem sido utilizadas (GONG et al., 2002).

Métodos moleculares ou genéticos provêm maior sensibilidade e especificidade, essencialmente porque o DNA bacteriano se mantém praticamente inalterado ao longo do ciclo de vida, mesmo quando exposto a fatores estressantes (ZHU; JOEGER, 2003). Esses métodos permitem rapidez e eficácia no diagnóstico de doenças aviárias e foram amplamente utilizados para diferenciar microrganismos e identificar a microbiota (ROSELLÓ-MORA; AMANN, 2001). Dentre eles, citamos a Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR (LIU et al., 2011)).

Há alguns anos a PCR da região 16S do DNA ribossomal (rDNA) é utilizada como devido à sua especificidade, permitindo tanto a identificação quanto a detecção de bactérias (ZHU; JOEGER, 2003). Assim, foi possível identificar uma diversidade populacional bacteriana muito maior do que a descrita com os métodos de cultivo (GONG et al., 2002), inclusive na microbiota intestinal das aves (GONG et al., 2007).

Entretanto, tais metodologias não são aplicáveis a estudos em larga escala com objetivo de comparar a diversidade (MUZYER; SMALLA, 1998). Além disso, podem gerar erros devido ao número de cópias de rDNA gerados (WANG et al., 1997), ao método de extração utilizado (VON WINTZINGERODE et al., 1997), à seleção do *primer* (SUZUKI; GIOVANNONI, 1996), à fase de amplificação na PCR (SPEKSNIJDER et al., 2001), à estratégia e à eficiência da clonagem (CHANDLER et al., 1997). Por fim, eles ainda requerem um extenso conhecimento dos microrganismos para o desenvolvimento de *primers* específicos das bactérias as quais se deseja estudar, dentro da diversa população bacteriana (MCAULIFFE et al., 2005).

Os perfis resultantes em géis com brometo de etídeo não contém informações específicas das sequências bacterianas e precisam ser comparado com perfis já existentes, o que mais uma vez limita a quantidade de novas cepas identificadas (ROSSELÓ-MORA; AMANN, 2001).

Esses métodos convencionais também não fornecem qualquer informação sobre a dinâmica da população microbiana em biomas complexos (MCAULIFFE et al., 2005).

2.6.1. Eletroforese em Gel com Gradiente de Temperatura (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*- TGGE)

Devido a essas limitações, e aos altos custos de clonagem e sequenciamento, novos métodos de estudo foram desenvolvidos para investigar mudanças na população microbiana e comparar diferentes partes do trato gastrointestinal de diferentes animais. A comparação das sequências de ácidos nucleicos bacterianos isolados pode ser utilizada para determinar sua função e importância num ambiente específico. Na avicultura isso permite que a microbiota de diferentes linhagens de aves sejam comparadas e as diferenças investigadas (SEIDAVI et al., 2012).

Os mesmos autores citam que esses métodos são baseados no comportamento de desnaturação dos fragmentos gerados pela PCR do 16S rDNA, incluindo os métodos *temperature gradient gel eletrophoresis* (TGGE), *temporal temperature gel electrophoresis* (TTGE), *denaturing gel electrophoresis* (DGE) e *denaturing gradiente gel electrophoresis* (DGGE). Eles ressaltam ainda que antes do seu uso para a ecologia microbiana esses métodos foram utilizados para pesquisas clínicas, o que demonstra sua confiabilidade.

A técnica de PCR realizada a partir amostras de uma comunidade bacteriana pode gerar sequências de DNA que representam muitos dos organismos dominantes, entretanto, de tamanho similar, isto é, mesmo número de pares de base. Essas sequências, submetidas à separação convencional pela eletroforese em gel de agarose, resultam em apenas uma banda de DNA, não descritiva da real diversidade da amostra estudada (ERCOLINI, 2004).

TGGE e DGGE são técnicas ditas de “impressão digital” molecular genética, capazes de separar os produtos gerados pela reação de PCR, sejam eles DNA, RNA ou proteínas, baseado em suas cargas elétricas e peso molecular (MUZYER, 1999). Para isso, estes tipos particulares de eletroforese em gel, utilizam-se de um desnaturante (ERCOLINI, 2004) que pode ser químico (uréia ou formamida), no caso do DGGE ou físico, o calor, no TGGE (MUZYER, 1999).

Apesar de bem sucedido a princípio, o método DGGE peca pela dificuldade de se reproduzir um gradiente de ureia estável e, assim, a desnaturação térmica foi desenvolvida logo em seguida (ROSENBAUM; RIESNER, 1987).

O gradiente térmico mostrou-se mais reprodutível e fácil de ser ajustado (WARTTEL et al., 1990), requerendo menos tempo hábil e, portanto, aplicável à análise de múltiplas amostras, principalmente quando se almeja examinar e monitorar as mudanças que ocorrem nas populações microbianas devido à fatores ambientais (MUZYER; SMALLA, 1998).

Salo-Zieman et al. (2006) reportaram problemas com a utilização da técnica DGGE afirmando que a diversidade da microbiota estudada foi subestimada pelo método. Biasucci et al. (2010), utilizando-se de ambas as

metodologias, DGGE e TGGE, e afirmaram que a primeira era menos sensível que a segunda.

A técnica de TGGE consiste em um gel de poliacrilamida confeccionado entre duas placas de vidro anexas a dois blocos de alumínio, dotados de dois canais de água que fornecem o gradiente de temperatura de 4 a 65°C paralelamente ao sentido da corrente elétrica aplicada ao gel (CHADALAVADA e BEVILACQUA, 2009).

O DNA, negativamente carregado, é atraído pelo eletrodo positivo e forçado a migrar pelos poros do gel de poliacrilamida. Assim, os pares de base formados pelos nucleotídeos adenosina e timina, e, citosina e guanina, são separados pela ação da temperatura, que leva à quebra das pontes de hidrogênio entre elas (MCAULIFFE et al., 2005) causando sua desnaturação e drástica diminuição do tempo de migração (ERCOLINI, 2004).

Sendo assim, qualquer variação na composição da sequência e orem das bases resultará em diferentes pontos de desnaturação, fazendo com que cada uma adquira uma posição específica no gel (MUZYER et al., 1998), gerando um padrão de bandas que pode ser visualizado corando-se o gel com brometo de etídeo, *Sybrgreen* (MUZYER et al., 1999) ou *Sybr Gold* (GRIFITHS et al., 2000).

Cada uma das bandas representa uma diferente população bacteriana, componente da comunidade total (ERCOLINI, 2004). Uma vez geradas, essas bandas podem ser extraídas, reamplificadas e sequenciadas. Em acréscimo, com os *softwares* estatísticos atuais pode-se calcular o índice de similaridade e conduzir análise de perfis de rDNA (SEIDAVI et al., 2012).

A técnica TGGE foi desenvolvida especialmente para a análise de comunidades microbianas de maneira rápida e acurada (FELSKE, 1998). Isto porque ela não requer conhecimento prévio sobre os organismos componentes da população microbiana a ser estudada, é altamente específica para separar fragmentos de DNA do mesmo tamanho, e que diferem por apenas uma única base, e também suficientemente sensível para detectar bactérias que representam pequeno percentual da população total (ZOETENDAL et al., 1998).

Assim, sua aplicação permitiu a criação de uma área de estudo específica, a ecologia microbiana molecular (AKKERMANS et al., 1995).

A maioria dos estudos focaram na análise da composição microbiana de diversos ambientes como sedimentos (GREY; HERWIG, 1996), solos (BORNEMAN et al., 1996), água do mar (FUHRMAN et al., 1993) e corpos d'água, revelando padrões complexos e alta diversidade de espécies bacterianas (BEIER et al., 2008).

Entretanto, mais recentemente os pesquisadores voltaram seu interesse na aplicação dessa técnica ao estudo da microbiota entérica de humanos e animais, relacionando-a com a sanidade dos mesmos.

Zoetendal et al. (1998) utilizaram-se da técnica para estudar a microbiota extraída das fezes de humanos, sem parentesco e de diversas idades, e aferiram que, embora os padrões fossem únicos para cada indivíduo, havia bandas em comum para todos, o que indica que as bactérias identificadas por essas bandas provavelmente possuem papéis importantes.

Björkstén (2006) relacionou o estudo da microbiota de neonatos com seu desenvolvimento imune, estudo complementado por Biasucci et al. (2010) que avaliou a diferença entre a microbiota de bebês nascidos de parto normal e de cesareana, e concluiu que os nascidos de parto normal desenvolviam uma microbiota mais complexa e conseqüentemente melhor desenvolvimento imune.

Os três estudos ressaltam a importância da compreensão da composição da microbiota intestinal e seus efeitos de longa duração, incentivando estudos do efeito de alimentos funcionais como pré ou probióticos, antibióticos e a influência da genética dos hospedeiros na estabilidade e composição da microbiota intestinal (BIASUCCI et al., 2010).

De la Cochetière et al. (2005) já haviam utilizado a técnica de TGGE para investigar o impacto na microbiota intestinal de indivíduos saudáveis após a administração de amoxicilina durante 5 dias e relatou que sua composição demorou 60 dias para se readequar. Um estudo com o mesmo objetivo foi conduzido por Janczyk et al. (2007), porém com porcos, e estes também relataram um declínio na diversidade e redução de componentes benéficos da microbiota por até 5 semanas.

Inoue e Ushida (2003) utilizaram a técnica TGGE para avaliar a possível relação do desenvolvimento da microbiota intestinal de ratos ao longo de 40 dias de vida e sua possível relação com os níveis de IgA nas fezes, aferindo

que os picos de IgA ocorrem concomitantemente aos picos de aumento na variedade da microbiota intestinal.

Trabalhando também com animais, Uenishi et al. (2007) objetivaram avaliar a diferença e composição da microbiota intestinal de chimpanzés de vida livre e de cativeiro, e concluíram que as bandas comuns aos indivíduos dos dois grupos correspondiam aos gêneros *Clostridium*, *Lactobacillus*, e *Bifidobacterium*.

Entretanto, embora algumas espécies bacterianas comuns a muitas espécies animais, como *Bifidobacterium*, *Pseudomonas* e *Lactobacillus*, pelo menos uma parte da população bacteriana do trato entérico de diferentes espécies animais deve ser única (ZHU et al., 2002).

A técnica similar da TGGE, a DGGE, já foi extensivamente utilizada na determinação da composição da microbiota de humanos (SEKSIK et al., 2003), vacas (KOCHERGINSKAYA et al., 2001), cães (SIMPSON et al., 2002), roedores (MCCRACKEN et al., 2001) e frangos (VAN DER WIELEN et al., 2002). Entretanto, a técnica TGGE, já confirmadamente uma ferramenta útil no estudo da complexidade da comunidade bacteriana do trato gastroentérico de animais de produção de leite, carne e ovos (NRC, 1994), e sabidamente mais robusta que a DGGE (CHADALAVADA; BEVILACQUA, 2009) não foi tão explorada. E, mesmo levando-se em conta os estudos realizados com a técnica DGGE, ainda é limitado o número de estudos comparativos e adaptativos da microbiota das diferentes partes do trato digestório de frangos (GONG et al., 2002).

Além disso, apesar de bons resultados os estudos anteriores focaram na exploração da diversidade, mas nenhuma informação da dinâmica da comunidade microbiana, influenciada pela dieta, clima ou agente perturbador foi dada. Sendo que o estudo da ecologia microbiana envolve a interação de seus componentes entre si e com o ambiente, esses biomas precisam ser estudados ao longo de períodos amplos de tempo (MUZYER; SMALLA, 1998).

Os papéis dos microrganismos são críticos nas interações entre hospedeiro e dieta, por isso, uma visão mais abrangente da microbiota intestinal das aves é essencial para permitir sua manipulação (MARTIN et al., 2011) e desenvolvimento, por exemplo, de produtos mais efetivos de exclusão competitiva (WANG et al., 2009).

Mais estudos são necessários para se confirmar a relação entre a microbiota e as doenças gastrintestinais e o ponto fundamental é entender porque a população bacteriana muda em consequência de uma doença (SEIDAVI et al., 2012).

A compreensão detalhada dessas respostas pode permitir a modificação da microbiota intestinal (CRHANNOVA et al., 2011) e então, num futuro próximo, os pesquisadores poderão selecionar as aves para cruzamento segundo sua microbiota entérica. Assim, a microbiota de diferentes linhagens de aves poderá ser comparada e suas diferenças investigadas (SEIDAVI et al., 2012).

3. OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Definir o perfil da microbiota cecal contra *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte submetidos a dietas com ácido caprílico, *Lactobacillus* e halquinol.

Objetivos específicos:

- Identificar as famílias ou gêneros de microrganismos em comum nas aves submetidas aos diferentes tratamentos pela avaliação e comparação dos perfis da microbiota obtidos pela TGGE;
- Correlacionar o efeito dos tratamentos os parâmetros imunológicos: produção de anticorpos (IgA, IgM e IgY), citocinas (IL-17 e IL-8) e histopatologia de tonsilas cecais

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais e instalações

Este experimento foi aprovado pelo Comitê de experimentação de Ética da FMVZ, UNESP- Botucatu, conforme Protocolo 43/2013, financiado pela FAPESP processo 2013/07318-7 e está atrelado ao processo 2013/13710-6.

Foram utilizados 240 frangos de corte, com um dia de idade, da linhagem *Cobb*, alojados em gaiolas de arame com fornecimento de água e ração *ad libitum*.

Toda a criação das aves ocorreu no Infectório do Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ- UNESP de Botucatu. A parte laboratorial foi executada nas dependências do Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ- UNESP de Botucatu e também no Departamento de Imunologia e Parasitologia do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu.

4.2. Delineamento experimental

As aves, fornecidas pela empresa Aviagen, da linhagem Cobb, foram distribuídas em um delineamento experimental inteiramente casualizado, com 8 tratamentos de 30 aves cada, sendo que cada ave foi considerada como uma unidade experimental.

Grupo 1 (G1): Aves não tratadas e não desafiadas

Grupo 2 (G2): Aves desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (SE)

Grupo 3 (G3): Aves tratadas com ácido caprílico

Grupo 4 (G4): Aves tratadas com ácido caprílico e desafiadas com SE.

Grupo 5 (G5): Aves tratadas com halquinol

Grupo 6 (G6): Aves tratadas com halquinol e desafiadas com SE.

Grupo 7 (G7): Aves tratadas com *Lactobacillus*

Grupo 8 (G8): Aves tratadas com *Lactobacillus* e desafiadas com SE

Baseado nos estudos e resultados obtidos por Crhanova et al. (2011), definiu-se que nos dias 10, 20, 30 e 42 de vida das aves, seriam retiradas, ao acaso, seis aves de cada grupo, das quais foi coletado sangue para quantificação de IgY e IgM. Posteriormente foram eutanasiadas por deslocamento cervical e necropsiadas para coleta do trato intestinal para quantificação de IgA, IL-8 e IL-17 da mucosa intestinal, cecos para quantificação de SE e realização do método TGGE e tonsilas cecais para análise histopatológica.

4.2.1. Dietas experimentais

Exceto pelos grupos 7 e 8 cujas aves receberam o *pool* de *Lactobacillus* via oral diariamente, nos demais grupos o tratamento foi administrado via ração durante todo o período experimental.

As rações foram produzidas pela fábrica de ração da FMVZ-UNESP Botucatu na fazenda Lageado e foram elaboradas conforme recomendações de Rostagno et al. (2011) para o período de criação de 1 a 42 dias de vida, dividido em 4 fases (Pré-inicial, Inicial, Crescimento e Terminação) segundo as necessidades nutricionais das aves.

Para os tratamentos 3 e 4 foram separadas as quantidades referentes a cada período de criação e adicionadas as quantidade pré-definidas de 0,7% de ácido caprílico (KOLLANOOR-JOHNHY et al., 2012). O mesmo foi feito para os grupos 5 e 6, porém, adicionando-se o 60 ppm de halquinol (MATEOS et al., 2010) e inerte. Para os tratamentos 1, 2, 7 e 8 foi adicionado apenas inerte (neste caso, optamos pela areia).

Tabela 1 - Composições centesimais e nutricionais da ração basal oferecida às aves de todos os grupos durante o período de criação de 1 a 42 dividido nas fases pré-inicial (1 a 7 dias), inicial (7 a 14 dias), crescimento (15 a 40 dias) e terminação (41 e 42 dias).

Ingredientes	Pré-inicial	Inicial	Crescimento	Terminação
Milho	54,9	55,24	58,0	62,25
Soja Farelo	36,61	36,06	32,48	28,56
Óleo de soja	2,09	3,93	4,92	4,87
Calcário	0,88	0,91	0,87	0,78
Fosfato	1,95	1,58	1,35	1,12
Sal comum	0,14	0,16	0,15	0,12
Lisina HCl	0,37	0,24	0,24	0,27
Bicarbonato	0,54	0,5	0,63	0,77
Treonina	0,14	0,08	0,07	0,07
Metionina	0,42	0,34	0,32	0,29
Suplemento*	0,2	0,2	0,2	0,20
Colina	0,06	0,05	0,05	0,04
Caulim	0,7	0,7	0,7	0,7
Total	100	100	100	100

* Suplemento vitamínico e mineral, níveis de garantia (kg de ração) para as fases pré-inicial e inicial: Vit. A, 11.000 UI ; Vit. D3, 2.000 UI ; Vit. E, 16 mg ; Ácido fólico, 0,4 mg ; Pantotenato de cálcio, 10 mg ; Biotina, 0,06 mg ; Niacina, 35 mg ; Piridoxina, 2 mg ; Riboflavina, 4,5 mg ; Tiamina, 1,2 mg ; Vit. B12, 16 mcg ; Vit. K3, 1,5 mg ; Se, 0,25 mg ; Antioxidante, 30 mg. Suplemento vitamínico, níveis de garantia (kg de ração) para as fase de crescimento e terminação: Vit. A, 8.800 UI ; Vit. D3, 1.600 UI ; Vit. E, 12,8 mg ; Ácido fólico, 0,32 mg ; Pantotenato de cálcio, 8 mg ; Biotina, 0,048 mg ; Niacina, 28 mg ; Piridoxina, 1,6 mg ; Riboflavina, 3,6 mg ; Tiamina, 0,96 mg ; Vit. B12, 12,8 mcg ; Vit. K3, 1,2 mg ; Se, 0,2 mg ; Antioxidante, 24 mg. Suplemento vitamínico níveis de garantia (kg de ração): Vit. A, 3.000 UI ; Vit. D3, 500 UI ; Vit. E, 5 mg ; Pantotenato de cálcio, 4 mg ; Biotina, 0,015 mg ; Niacina, 5 mg ; Piridoxina, 0,4 mg ; Riboflavina, 1 mg ; Tiamina, 0,3 mg ; Vit. B12, 3 mcg ; Vit. K3, 0,5 mg ; Se, 0,2 mg ; Antioxidante, 15 mg. ³ Suplemento mineral, níveis de garantia (kg de ração): Cu, 9 mg ; Zn, 60 mg ; I, 1 mg ; Fe, 30 mg ; Mn, 60 mg.

4.3. Avaliação de *Lactobacillus* spp.

4.3.1. Coleta e identificação

Foram coletadas 100 amostras de fezes de frangos de corte saudáveis de granjas da região de Botucatu, referentes ao período de criação de um a 42 dias de vida. Essas amostras foram levadas para o Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ - Unesp de Botucatu e imediatamente transferidas para tubos contendo 10mL de caldo DeMan-Rugosa-Sharpe (MRS) pH 6,5, para isolamento bacteriano. Os tubos, em duplicata, para ingluvíos e cecos, foram incubados a 37°C por 48 h sob anaerobiose, utilizando-se sistema gerador e anaerobiose. Posteriormente, as culturas foram plaqueadas em ágar MRS e incubadas nas mesmas condições descritas. Três colônias características de *Lactobacillus* spp. de cada placa foram submetidas à coloração pelo Método de Gram (PELCZAR et al., 1981) com o objetivo de certificar-se da natureza gram-positiva e forma bacilar.

As bactérias caracterizadas como bacilos gram-positivos foram submetidas à confirmação do gênero *Lactobacillus* através da Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se o *kit Spin Stool DNA Kit* (PSP®) na extração do DNA e os seguintes *primers*: LbLMA1-rev 5'-CTC AAAACTAAACAA AGTTTC-3' e R16-1 5'-CCTGTACACACCAGCCCGTCA-3' (DUBERNET et al., 2002).

Para a reação foram utilizados 25 pmol de cada primer, 12,5µl de *GoTaq Green Master Mix* (Promega®) e 2,5µl de água ultrapura, totalizando 25µl.

A amplificação foi realizada num Termociclador (Eppendorf®) tendo início com 94°C por 3 minutos para desnaturação, seguindo com temperatura de anelamento a 53°C por 1 minuto, 72°C por 15 minutos para extensão, seguido por 30 ciclos a 94°C por 45 segundos, 53°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos.

Como controles positivos da reação foram utilizadas amostras de *Lactobacillus helveticus*- CCT 3747 – ATCC 15009, *L. fermentum* CCT0559 – ATCC 9338, *L. delbrueckii* spp. Lactis CCT7520 – ATCC7830, *L. acidophilus* CCT 3258 – ATCC4356, *L. casei* spp *casei* CCT 1465 – ATCC 393.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com *GelRed* 10000x (Biotium®) e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

4.3.2. Avaliação da atividade antimicrobiana- Método *Spot on the Lawn*

As amostras de *Lactobacillus* foram processadas através do método *Spot on the Lawn* frente ao microrganismo indicador *Salmonella enterica*, subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis fagotipo 4 (SE).

Esse teste foi realizado para verificar o antagonismo entre os *Lactobacillus* e o microrganismo indicador.

As amostras de *Lactobacillus* foram semeadas em caldo MRS e incubadas a 38°C por 48 horas em jarras de microaerofilia. Posteriormente 10µl dessas culturas foram adicionadas (forma de pontos) em placas de Petri contendo ágar MRS e após sua completa secagem, as placas foram novamente alocadas nas jarras de microaerofilia para incubação a 38°C por 18 horas. O microrganismo indicador foi semeado em tubos contendo 5mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubado a 38°C por 12 horas.

Posteriormente, foram transferidos 200µL dessa cultura para novos tubos contendo 20mL de caldo BHI acrescido de 0,75% de ágar-ágar, previamente preparado e mantido em banho-maria a 45°C (SANTOS, 1993).

Esse preparado foi vertido cuidadosamente nas placas incubadas anteriormente com as amostras de *Lactobacillus* e, após a completa solidificação da camada superior, as placas foram novamente incubadas e seus halos de inibição mensurados em mm a partir da borda da colônia de *Lactobacillus*.

4.3.3. Capacidade de adesão *in vitro*

Cada uma das amostras foi submetida ao teste de adesão, de acordo com Bouzaine et al. (2006) utilizando-se a matriz celular tipo *Basement Membrane Matrigel* (BMM, Becton, Dickinson and Company) contendo colágeno tipo IV extraída de sarcoma de rato (HORIE et al., 2002).

A BMM foi diluída (1:20) e 35 µL foram depositados em cada poço das lâminas para cultura *Falcon* (BD®) a 4°C. As lâminas foram deixadas em repouso a 37°C por duas horas e depois incubadas com solução tampão

fosfatada (PBS) acrescida de 2% de albumina de soro bovino (BSA) por uma hora à temperatura ambiente

As amostras de *Lactobacillus* foram incubadas em caldo MRS por 24 horas a 38°C. As bactérias em fase estacionária de crescimento foram centrifugadas e lavadas duas vezes com PBS e 200 µL desta solução na concentração de 10^{-7} foram depositados nas lâminas previamente preparadas com BMM e incubadas por duas horas a temperatura ambiente. Após incubação, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS e coradas com coloração de Gram.

As regiões a serem contadas foram delimitadas por marcação no verso das mesmas, sendo três pontos em cada lateral e dois pontos centrais, numa área retangular de 1,7 x 1,0 cm, obedecendo ao mesmo padrão para todas as lâminas. As contagens foram feitas microscópio óptico (3,8 x 10⁻² mm, objetiva de 100) em esquema duplo-cego, para que não houvesse influência sobre os resultados.

Foram feitas três réplicas para cada amostra testada, sendo que uma amostra de *Escherichia coli* e uma amostra de *Bacillus subtilis* 168 foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente (Figura 1). Os resultados obtidos foram transformados para log₁₀, calculado média e desvio padrão e posteriormente intervalo de confiança determinando o limite superior e inferior, os quais foram comparados com a média do controle positivo. Foi utilizado nível de significância de 5% (SAMPAIO, 2002).

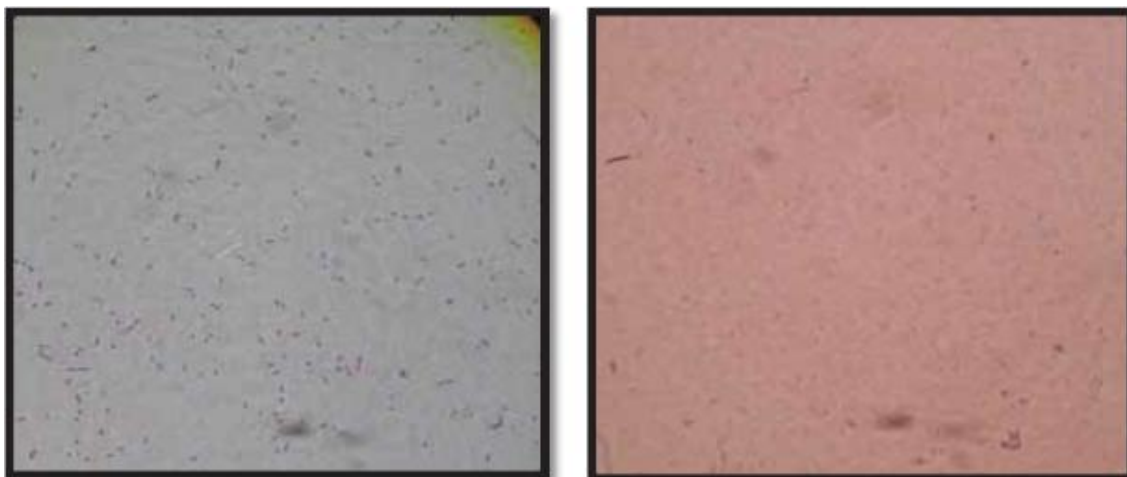


Figura 1 - Imagem de microscopia óptica (aumento de 100x) de *Escherichia coli* (A) e *Bacillus Subtillis* (B) corados por Gram, demonstrando alta e baixa aderência das amostras em matriz BMM nos testes de adesão *in vitro*

4.3.4. Potencial de multiplicação

De cada uma das bactérias previamente cultivada em placas de ágar MRS foi coletada uma amostra e repassada para um tubo de ensaio contendo 5mL de caldo MRS. Após homogeneização do material foi imediatamente coletada uma alíquota de 0,1mL e diluída em 0,9mL de PBS, a qual foi a primeira diluição, 10^{-1} , da qual obtivemos as 8 diluições seguintes. Dessas diluições foi coletado 0,1mL e repassado para placas de ágar MRS, em esquema de duplicata, para conhecermos a UFC no tempo zero. Subsequentemente o tudo de ensaio foi incubado a 38°C em condições de microaerofilia e foram coletadas e quantificadas alíquotas nos tempo de 3, 6, 9, 14 e 18h para avaliar o potencial de multiplicação dessas bactérias.

Para certificar-se de que as amostras de *Lactobacillus* não inibem o crescimento umas das outras quando cultivadas simultaneamente, foi utilizado o método *Spot on the Lawn* citada anteriormente, testando as amostras entre si.

Os *Lactobacillus* que apresentarem os melhores resultados nos testes *Spot on the Lawn*, adesão *in vitro* e capacidade de multiplicação, e não apresentarem inibição em cultivo simultâneo, foram enviadas para sequenciamento genético para definição da espécie e posteriormente utilizados na confecção do *pool* de *Lactobacillus* administrado para as aves dos grupos 7 e 8.

4.4. Preparo do *pool* de *Lactobacillus*

As amostras de *Lactobacillus*, previamente identificadas e selecionadas *in vitro*, foram utilizadas para a confecção do *pool* a ser administrado às aves.

Essas amostras foram cultivadas separadamente em tubos contendo caldo MRS, a 38°C por 48h em anaerobiose. Posteriormente, 1mL de caldo MRS cultivado foi retirado de cada tubo, e misturado com os demais.

O número de unidades formadoras de colônia (UFC) do inóculo foi determinado através de diluições decimais em solução tampão salina fosfatada (PBS) com pH 7,2. Todas as determinações bacterianas foram realizadas pelo plaqueamento de 0,1mL das suspensões (MRS) e respectivas diluições decimais (PBS), em duplicata de ágar MRS. A leitura das placas foi feita após incubação a 38°C por 48 horas.

O procedimento de cultivo, preparo e contagem do *pool* foi feito a cada 48h para garantir que não houvesse decréscimo de UFC devido a período de estocagem. Durante todo o tempo de experimento as contagens mantiveram-se entre 4. Log₁₀ e 6. Log₁₀ UFC/mL.

Foi administrado 1 mL do *pool* de *Lactobacillus* para as aves dos grupos 7 e 8, via gavagem diariamente durante o período de 1 a 42 dias de vida das aves.

4.5. Desafio com *Salmonella* Enteritidis

Como microrganismo desafiante utilizamos a *Salmonella enterica* subespécie *enterica* serovar Enteritidis fagotipo 4 (SE) resistente ao ácido nalidíxico e à rifampicina (Nal/Rif resistente).

Para confeccionar o inóculo de SE, no sexto dia de vida das aves, submetemos uma alíquota da cepa ao cultivo em 10 mL de caldo BHI por 24h a 37 °C em aerobiose.

Foi, então, administrado 1mL deste inóculo a cada uma das aves dos grupos 2, 4, 6 e 8.

O número de unidades formadoras de colônia (UFC) do inóculo foi determinado através de diluições decimais em solução tampão salina fosfatada (PBS) com pH 7,2, sendo o resultado 7. Log₁₀ UFC/mL.

Todas as determinações bacterianas foram realizadas pelo plaqueamento de 0,1mL das suspensões (AVB Nal/Rif) e respectivas diluições

decimais (PBS), em duplicata de ágar AVB Nal/Rif. A leitura das placas foi feita após incubação a 37°C por 24 horas.

4.6. Quantificação de *Salmonella* Enteritidis no ceco

Um dos cecos de cada uma das aves foi acondicionado em bolsas plásticas estéreis, as quais foram transportadas, sob refrigeração, para o Laboratório de Ornitopatologia. Posteriormente, os órgãos foram abertos, o conteúdo pesado e diluído em PBS na proporção de 1:10, obtendo-se a diluição 10^{-1} . As demais diluições foram realizadas até 10^{-8} , com posterior plaqueamento de 0,1mL do conteúdo em duplicata de AVB Nal/Rif, e cultivo durante 24 horas à temperatura de 37°C.

O número de UFC por grama (UFC/g) de conteúdo cecal foi convertido em log10 para a interpretação dos resultados.

4.7. Técnica de ELISA

4.7.1. Quantificação de Imunoglobulina Y

Para as análises foram colhidos 200µL de sangue das aves por punção venosa da veia ulnar, com o uso de seringas estéreis de 1mL e agulha 0,45 x 13mm.

Após a separação da alíquota sanguínea, o sangue foi centrifugado a 5000rpm a 5°C por cinco minutos e em seguida o soro depositado em outro microtubo e mantido a -20°C até o processamento do ELISA com o Chicken IgY ELISA Kit (Bethyl Laboratories®).

Foram pipetados 100µL de cada amostra nos poços, cobertos com filme selante e incubados por 20 minutos à temperatura ambiente. O conteúdo foi aspirado e em seguida procedeu-se a lavagem com o Tampão de Lavagem por quatro vezes.

Em seguida, pipetamos 100µL do Conjugado Enzima-Anticorpo a cada um dos poços e incubamos por 20 minutos após cobrir a placa com o filme selante. Nova lavagem foi procedida com descrito acima.

Adicionamos 100µL de Solução Substrato TMB a cada poço e incubamos num ambiente escuro por precisamente 10 minutos. Por fim, 100µL de da Solução de Parada foram adicionados e procedeu-se a leitura a 450nm.

4.7.2. Quantificação de Imunoglobulina A

Foram inoculados, com auxílio de seringa descartável estéril, 2mL de PBS na porção proximal do duodeno e posterior coleta do fluido na porção distal do reto em tubo Falcon®. O volume coletado foi dividido em alíquotas menores em microtubos e mantido a -20°C até o processamento do ELISA.

O protocolo seguiu-se conforme descrito acima, uma vez que um kit do mesmo fabricante foi utilizado Chicken IgA ELISA Kit (Bethyl Laboratories®).

4.7.3. Quantificação de Imunoglobulina M

Para as análises foram colhidos 200µL de sangue das aves por punção venosa da veia ulnar, com o uso de seringas estéreis de 1mL e agulha 0,45 x 13mm.

Após a separação da alíquota sanguínea, o sangue foi centrifugado 5000rpm a 5°C por cinco minutos e em seguida o soro foi depositado em outro microtubo e mantido a -20°C até o processamento do ELISA utilizando-se o Chicken IgA ELISA Kit (Bethyl Laboratories®).

As amostras foram primeiramente diluídas na concentração 1:100000 adicionando-se 10µL do soro a 990µL de Tampão de Eluição 1X B para obter a diluição 1:100; em seguida 10µL da diluição anterior foram adicionados à 990 µL de Tampão de Eluição 1X B e finalmente 100µL dessa diluição foram adicionados à 900µL de 1xDilution buffer para obter a diluição de 1:100.000.

Foram colocados 100 µL de cada amostra em duplicata nos poços da placa e esse conteúdo homogeneizado gentilmente para posterior cobertura dos poços com filme adesivo e incubação à temperatura ambiente durante 1 hora e 4 lavagens com o Tampão de Lavagem.

Em seguida, foram adicionados 100µL da solução HRP A a cada um dos poços que foram novamente cobertos com fita adesiva e incubados à temperatura ambiente por 30 minutos. O procedimento de lavagem manteve-se o mesmo.

Foram adicionados 100µL da Solução substrato TMB a cada poço para que a reação ocorresse nos próximos 30 minutos.

Por fim, foram adicionados 100µL da Solução de parada e a mensuração feita em um leitor de placas de ELISA a 450 nm.

4.7.4. Quantificação de Interleucina 8 e 17

Foram inoculados, com auxílio de seringa descartável estéril, 2 mL de PBS contendo na porção proximal do duodeno e posterior coleta do fluído na porção distal do reto em tubo Falcon® de 15mL. O volume coletado foi dividido em alíquotas menores em microtubos e mantido a -20°C até o processamento do ELISA utilizando-se ELISA Kit for Interleukin 8 (IL8) Chicken (Gallus gallus) (Uscn Life Science Inc.®) e ELISA Kit for Interleukin 17 (IL17) Chicken (Gallus gallus) (Uscn Life Science Inc.®), cujos protocolos são os mesmo e segue abaixo.

Imediatamente antes do ensaio, a amostra foi centrifugada a 1000xg/20 minutos, conforme recomendado pelo fabricante, para remoção de particulado e, seguiu-se imediatamente o ensaio.

Foram colocados 100µL de cada amostra em esquema de duplicata nos poços da placa e esse conteúdo homogeneizado gentilmente para posterior cobertura dos poços com filme adesivo e incubação à 37°C durante 2 horas. Após esse período o conteúdo foi descartado e 100µL do Reagente de Detecção A adicionado a cada um dos poços para posterior cobertura dos poços com o filme adesivo e incubação por 1 hora a 37°C.

O conteúdo foi descartado e 350µL da Solução de Lavagem acrescentados aos poços e, após 2 minutos, procedeu-se a lavagem da placa por mais três vezes.

Adicionamos então 100 µL do Reagente de Detecção B e incubamos por 30 min a 37°C após cobrir a placa com o filme selante. Em seguida, seguiu-se com o procedimento de lavagem por cinco vezes.

Em seguida, foram adicionados 90µL da Solução Substrato TMB a cada um dos poços que foram novamente cobertos com fita adesiva e incubados à 37°C por 25 minutos.

Por fim, foram adicionados 50µL da Solução de parada e a mensuração feita em um leitor de placas de ELISA a 450 nm.

4.8. TGGE

4.8.1. Padronização

Com o objetivo de padronizar a técnica de TGGE, buscamos na literatura estudo prévios que se utilizaram de técnicas moleculares para descrever a composição da microbiota cecal e obtivemos as cepas mais frequentemente mencionadas.

As cepas encontradas foram: *Bacteroides* spp, *Lactobacillus* spp (LAN et al., 2005), *Sporomusa* sp., *Bifidobacterium* sp, *Pseudomonas* sp, *Escherichia* sp (ZHU et al., 2002), *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* spp, *Gemmiger formicillis* (MEAD, 1989), *Streptococcus* sp, *Enterococcus* sp, *Fusobacterium* sp, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Campylobacter coli*, *Lactobacillus acidophilus*, (LU et al., 2003), *Bacteroides capillosus*, *Eubacterium desmolans*, *Peptococcus niger*, *Sporobacter termidis*, *Megamonas hipermegale* e *Acetanaerobacterium elongatum* (GONG et al., 2007). Também foram citados de maneira genérica o filo Proteobacteria (LAN et al., 2002; LU et al., 2003), a família Bacteroidaceae (LU et al., 2003) e a classe Clostridia (GONG et al., 2002).

Nossa pesquisa nos permitiu criar uma tabela com a classificação taxonômica de cada uma delas e obter pelo menos um representante de cada filo.

Algumas dessas cepas nos foram cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ, segundo a disponibilidade da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária- CMRVS, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde- INCQS. Outras foram retiradas da bacterioteca do Laboratório de Ornitopatia da FMVZ- Unesp de Botucatu, sendo que todas foram previamente extraídas de material avícola.

Foram adicionadas também a esse banco as bactérias componentes do pool de *Lactobacillus* fornecidos aos grupos 7 e 8, bem como a *Salmonella* Enteritidis utilizada no desafio, conforme exposto no Quadro 1.

Quadro 1 - Cepas Bacterianas, selecionadas mediante revisão de literatura para representarem as quatro famílias mais frequentemente descritas como componentes da microbiota cecal das aves, bem como o microrganismo desafiante SE e um dos *Lactobacillus* componentes do pool fornecido aos grupos 7 e 8, destinadas à padronização da Técnica de TGGE

Micro-organismo	Origem	Fonte
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 12924	FIOCRUZ
<i>Propionibacterium acnes</i>	ATCC 11827	FIOCRUZ
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC 33559	FIOCRUZ
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC 23745	FIOCRUZ
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	ATCC 27337	FIOCRUZ
<i>Enterococcus durans</i>	ATCC 6056	FIOCRUZ
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 13813	FIOCRUZ
<i>Salmonella</i> Enteritidis	-----	Instituto Adolpho Lutz
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-----	Laboratório de Ornitopatologia

Quadro 2 - Classificação taxonômica das cepas bacterianas selecionadas para a padronização da Técnica de TGGE

Reino	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria
Filo	Firmicutes	Actinobacteria	Proteobacteria	Bacteroidetes
Classe	Clostridia	Actinobacteria	Epsilonproteobacteria	Bacteroidetes
Ordem	Clostridiales	Actinomycetales	Campylobacterales	Bacteroidales
Família	Clostridiaceae	Propionibacteriaceae	Campylobacteraceae	Bacteroidaceae
Gênero	<i>Clostridium</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>Bacteroides</i>
Espécie	<i>perfringens</i>	<i>Acnes</i>	<i>Coli</i>	<i>fragilis</i>
Reino	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria
Filo	Firmicutes	Firmicutes	Firmicutes	Proteobacteria
Classe	Clostridia	Bacilli	Bacilli	Gamma proteobacteria
Ordem	Clostridiales	Lactobacillales	Lactobacillales	Enterobacteriales
Família	Peptostreptococcaceae	Enterococcaceae	Streptococcaceae	Enterobacteriaceae
Gênero	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Salmonella</i>
Espécie	<i>anaerobius</i>	<i>Durans</i>	<i>Agalactiae</i>	<i>enterica</i>

Quadro 2 - Classificação taxonômica das cepas bacterianas selecionadas para a padronização da Técnica de TGGE (continuação)

Reino	Bacteria
Filo	Firmicutes
Classe	Bacilli
Ordem	Lactobacillales
Família	Lactobacillaceae
Gênero	<i>Lactobacillus</i>
Espécie	<i>Acidiphillus</i>

4.8.2. Cultivo, extração e quantificação das amostras padrão

As cepas obtidas da FIOCRUZ foram encaminhadas na forma liofilizada e, portanto, foram solubilizadas adicionando-se 2mL de PBS. Esse volume foi dividido em cinco alíquotas, sendo quatro delas armazenadas em freezer - 80°C. Uma das alíquotas, de cada uma das amostras, foi reativada em 5mL de Caldo Nutriente (*DIFCO*®) e incubadas conforme as recomendações de temperatura e atmosfera individuais, as quais constam na tabela abaixo. Posteriormente foi feito o repasse para Ágar Nutriente (*DIFCO*®), no intuito de certificar-se da pureza de cada uma das amostras, seguindo as mesmas condições de cultivo dos caldos.

As bactérias que requeriam condição de anaerobiose para o crescimento foram incubadas em jarras de microerofilia de 2,5L acrescidas do sistema gerador de anaerobiose Anaerogen (*OXOID BRASIL*®), tanto na fase de incubação em caldo quanto em Ágar.

A *Campylobacter*, única cepa microaerófila, foi cultivada em jarra de microaerofilia de 2,5L utilizando-se de uma vela acesa em seu interior para posterior fechamento.

As amostras de *Lactobacillus* foram incubadas em tubos contendo 5mL de caldo MRS por 48h a 38°C, seguindo-se o repasse para ágar MRS nas mesmas condições.

A amostra de *Salmonella* Enteritidis foi reatirada de nossa bacterioteca, onde está armazenada a 8°C em frascos de vacina contendo 2mL de Ágar nutriente, e reativada em tubos contendo 5mL de caldo Nutriente por 24h a 38°C, seguindo-se posterior repasse para Ágar Verde Brilhante (*DIFCO*®) nas mesmas condições de cultivo.

Todas as condições de cultivo citadas estão esquematizadas no Quadro 3.

Quadro 3 - Condições de cultivo das cepas bacterianas selecionadas para a padronização da técnica de TGGE

Microrganismo	Temperatura	Incubação	Atmosfera
<i>Clostridium perfringens</i>	37°C	24-48h	Anaerobiose
<i>Propionibacterium acnes</i>	37°C	48h	Anaerobiose
<i>Campylobacter coli</i>	37°C	24h	Microaerófilo
<i>Bacteroides fragilis</i>	37°C	24-48h	Anaerobiose
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	37°C	48h	Anaerobiose
<i>Enterococcus durans</i>	37°C	24h	Aerobiose
<i>Streptococcus agalactiae</i>	37°C	24h	Aerobiose

Desse total de amostras, cada uma das placas teve um total de 3 a 10 colônias, que variou de acordo com o tamanho das mesmas, coletadas com alça de cobre estéril das placas, solubilizadas em 100µL de PBS e subsequentemente homogeneizadas no vórtex AP650 (PHOENIX®) por 3 segundos.

Esse material foi submetido ao protocolo de extração de DNA, segundo as instruções do *Stool DNA Isolation Kit* (NORGEN BIOTEK®), e os respectivos produtos quantificados com o fluorômetro Qubit® 2.0 (Life Technologies®) utilizando-se o kit Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Life Technologies®) destinado a amostras com quantidades entre 2 e 1000ng. Os resultados obtidos constam na Tabela 2.

Tabela 2 - Quantificação das cepas bacterianas selecionadas para a padronização da técnica de TGGE

Amostras	Quantificação (ng/mL)
<i>Campylobacter coli</i>	4,4 ng/mL
<i>Salmonella enterica</i>	15,3 ng/mL
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	7,32 ng/mL
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17,2 ng/mL

Tabela 2 – Quantificação das cepas bacterianas selecionadas para a padronização da técnica de TGGE

Amostras	Quantificação (ng/mL)
<i>Clostridium perfringens</i>	9,8 ng/mL
<i>Propionibacterium acnes</i>	4,44 ng/mL
<i>Enterococcus durans</i>	5,32 ng/mL
<i>Streptococcus agalactie</i>	10,8 ng/mL
<i>Bacteroides fragilis</i>	5,92 ng/mL
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	17,2 ng/mL

4.8.3. Preparo das amostras fecais para o método TGGE

Para cada uma das seis aves, de cada um dos oito grupos, nos quatro momentos (definidos como 10, 20, 30 e 42 dias de vida), foram coletados de um dos cecos, duas alíquotas de 500µL e armazenadas em microtubos . Essas amostras foram mantidas em freezer -80°C até o momento do seu processamento.

Uma vez retiradas do freezer, as amostras foram manipuladas em uma capela de fluxo laminar e, aos dois microtubos correspondentes a cada ave, foram adicionados 500µL de água ultrapura autoclavada. Esse preparado foi submetido à agitação em vórtex até que estivesse completamente homogêneo e, então, os conteúdos de ambos os microtubos foram repassados para um novo microtubo estéril, e novamente homogeneizados em vórtex.

O conteúdo deste microtubo foi posteriormente dividido em quatro alíquotas, das quais, três foram armazenadas e uma utilizada para a técnica de TGGE.

Posteriormente, para cada um dos grupos, dentro de cada momento, misturou-se seis alíquotas, cada uma delas correspondendo às seis aves do grupo.

Feito isso, obtivemos um microtubo para cada um dos oito grupos, referentes aos 4 momentos de coleta.

4.8.4. PCR

Para cada momento, de cada um dos grupos, confeccionamos um *pool* misturando-se uma alíquota de cada uma das aves.

Esse material foi, então, submetido à extração de DNA, utilizando-se o kit *Stool DNA Isolation Kit (Norgen Biotek Corp®)*, seguindo-se as instruções do fabricante. O produto resultante da extração foi acondicionado em um microtubo e, posteriormente, uma alíquota utilizada para a amplificação.

A PCR teve como alvo uma sequência que envolve as regiões V6 e V8 do 16S rDNA. Para a PCR, uma alíquota de 5µl do produto da extração foi colocada em microtubos individuais e a esse volume adicionaram-se 40µl de água ultrapura, 10µl de *Taq 5X Mastermix (Biolabs®)* e 0,5µL de cada um dos *primers*, *forward* U968GC (CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC) e *reverse* L1401 (GCG TGT GTA CAA GAC CC) totalizando 50µL.

Os *amplicons* foram obtidos conforme recomendação de Zoetendal et al. (1998), num Termociclador (*Eppendorf®*) sob as seguintes condições: Desnaturação inicial de 95°C/5min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C/40s, anelamento a 55°C/40s e extensão a 72°C/1min, complementos por uma extensão final de 72°C/7min.

Os produtos foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose, a 1,5%, corado com *GelRed 10000x (BIOTIUM®)*, por 40min a 70V, tendo como referência um marcador de tamanho molecular (100pb DNA *ladder*) para checar a amplificação. A banda correspondente ao *amplicon* (~433bp) foi cortada do gel e purificada como descrito a seguir.

Para a purificação utilizamos o kit *GFX PCR DNA Gel Band Purification Kit (GE Healthcare®)*, seguindo as instruções do fabricante para extração a partir de géis de agarose. Para tanto, o volume de 50µL resultante da PCR foi adicionado de azul de bromofenol e submetido à eletroforese em gel nas mesmas condições previamente citadas.

O produto da eletroforese foi, então, reservado num microtubo e conservado em *freezer* -20°C até o momento da sua utilização na técnica de TGGE.

4.8.5 TGGE perpendicular

Com o objetivo de confeccionar um controle para as amostras a serem trabalhadas e também definir o gradiente de temperatura ideal, utilizamos os *amplicons* de DNA das bactérias selecionadas mediante revisão bibliográfica e citadas no relatório anterior, e as avaliamos sob diferentes condições de temperatura.

Esse controle deveria ser utilizado em cada uma das subseqüentes eletroforeses para que, comparando-se as os pontos de migração das bandas gerados pelas amostras, com aquele presente no controle, pudéssemos pré-avaliá-las quanto à possível classificação.

Diferente do que ocorre na técnica convencional de TGGE, aqui as amostras dispostas no gel da eletroforese são submetidas a um gradiente de temperatura perpendicular ao sentido da corrente elétrica. Isso porque a migração não depende apenas do tempo de corrida, mas, aqui, principalmente do gradiente de temperatura utilizado, que desnatura o DNA segundo a sua sequência de bases.

O gel consistiu de 6% de poliacrilamida (37,5:1), 8M de uréia, 2% de glicerol e 20% de formamida. Foi aplicado ao gel uma mistura de 6µL de cada amostra, totalizando 48µL, submetido então a um gradiente de 32,5 a 45,4°C, em 130V por 2h. Ao fim do tempo de corrida (indicado pela marca do corante acrescentado às amostras de DNA), o gel foi corado com nitrato de prata, observado num transiluminador de luz branca e fotografado. Assim, pudemos depreender que o melhor gradiente seria de 36,4 a 41,6°C (Figura 2).

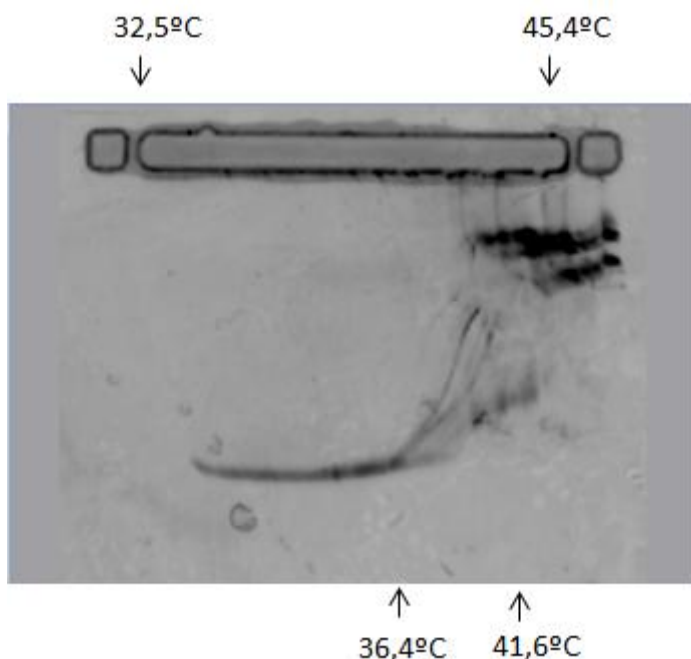


Figura 2 - Gel da Técnica de TGGE perpendicular demonstrando o padrão de bandas gerado pela desnaturação do DNA das amostras bacterianas selecionadas para comporem a padronização da técnica de TGGE. O intervalo de temperatura compreendido entre 36,4C e 41,6C revela a melhor separação das bandas sem que haja desnaturação do material, observado após 41,6C

4.8.6. TGGE convencional

Todas as amostras fecais foram submetidas ao sistema TGGE (Biometra®) nas condições acima citadas, porém, na quantidade de 1µL de cada amostra em cada um dos poços em géis que variaram de 8 a 12 poços.

4.9. Análise estatística

Foi utilizada a técnica de análise de variância paramétrica para dados com distribuição normal de probabilidades e não paramétrica para avaliar a interação do momento com dois fatores (grupos e momentos de sacrifício) no experimento inteiramente casualizado, complementando com o teste de comparações múltiplas de Tukey (paramétrico) ou Dunn (não paramétrico) e adotando o nível de 5% de significância (ZAR, 2009).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção dos *Lactobacillus*

Como muitas bactérias ácido-láticas possuem necessidades nutricionais e padrões de crescimento similares, frequentemente é difícil utilizar-se de métodos microbiológicos clássicos para identificá-las até mesmo em nível de gênero. Assim, o uso de *primers* e *probes* específicos para genes componentes do RNAr parece (HEILIG et al., 2002;).

Entretanto, pelo fato do gênero carecer de uma clara origem monofilética e estar grandemente relacionado a outras bactérias ácido-láticas, esse intento mostrou-se bastante desafiador (DUBERNET et al., 2002).

Os resultados mais fidedignos foram demonstrados por DUBERNET et al. (2002).

Mediante a análise do código genético de 28 espécies, atualmente disponíveis no *GenBank*, os autores desenvolveram o *primer* LbLMA1-rev, com alvo para a única região específica identificada em comum para todas as espécies. Em complemento a ele foi escolhida a sequência R16-1, da porção terminal do 16S rRNA conservado entre várias bactérias, incluindo *Lactobacilli* (NAKAGAWA et al., 1994).

A técnica mostrou-se eficiente uma vez que o produto gerado para 23 espécies testadas apresentava os mesmos 250 pb, com exceção para apenas uma espécie, *Lactobacillus fructuosus*, o qual não gerou produto (DUBERNET et al., 2002). Entretanto, essa é a única espécie do gênero classificada no grupo *Leuconostoc* (VANDAMME et al., 1996) e com reclassificação proposta para *Leuconostoc fructuosum* (ANTUNES et al., 2002).

Desde então, inúmeros trabalhos vem utilizando os *primers* propostos por DUBERNET et al. (2002) reportando alta especificidade (KUMAR, et al., 2014; SGHIR et al., 2014; DANA et al., 2013).

Essa eficácia se confirma no presente trabalho. Das 150 amostras que ao cultivo apresentaram padrão de crescimento e morfologia de colônia compatíveis com *Lactobacillus*, apenas 90 foram identificadas com bacilos ao exame de Gram e, submetidas à reação de PCR, somente 24 pertenciam de fato ao gênero.

Salientamos que posteriormente as amostras foram submetidas à técnica de sequenciamento genético, para definição das espécies, e os resultados corroboraram aqueles obtidos pela PCR, confirmando como pertencentes ao gênero *Lactobacillus* todas as assim classificadas pela PCR.

As Tabelas 3 e 4 expõem, respetivamente, os dados regerados no teste Spot on the Lawn e de Multiplicação *in vitro* pelas cepas de *Lactobacillus* analisadas.

Tabela 3 - Resultado do teste *Spot on the Lawn* procedido com as cepas de *Lactobacillus* spp. previamente selecionadas, frente ao microrganismo indicador *Salmonella* Enteritidis

Amostra	03	04	05	07	09	10	13	15	18	21	22	35
Halo (mm)	12	00	01	06	06	07	02	07	02	09	03	07
Amostra	37	42	44	47	48	57	58	60	62	63	65	70
Halo (mm)	07	06	07	05	08	01	01	07	04	08	07	03

Tabela 4 - Resultado do teste de Multiplicação *in vitro* das cepas previamente selecionadas de *Lactobacillus* spp. ao longo do período de 18 horas

Amostra	3 horas	6 horas	9 horas	14 horas	18 horas
03	$1,4 \cdot 10^{11}$	$6,0 \cdot 10^{11}$	$3,0 \cdot 10^{11}$	$5,1 \cdot 10^{11}$	$3,0 \cdot 10^{11}$
04	$5,0 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^8$	$7,0 \cdot 10^{12}$	$7,0 \cdot 10^{11}$	$2,8 \cdot 10^{14}$
05	$5,1 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^{09}$	$2,1 \cdot 10^{10}$	$1,0 \cdot 10^{10}$
07	$1,0 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^{10}$	$3,1 \cdot 10^{11}$	$8,0 \cdot 10^{11}$	$5,1 \cdot 10^{09}$
09	$4,0 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^{10}$	$1,7 \cdot 10^{10}$	$5,4 \cdot 10^{12}$	$1,0 \cdot 10^{10}$
10	$8,4 \cdot 10^5$	$5,0 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$
13	$3,0 \cdot 10^7$	$7,0 \cdot 10^{10}$	$3,4 \cdot 10^{10}$	$1,2 \cdot 10^{12}$	$1,2 \cdot 10^{12}$
15	$1,3 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^9$	$1,5 \cdot 10^{11}$	$1 \cdot 10^{11}$
18	$1,1 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^9$	$1,9 \cdot 10^{12}$	$1,1 \cdot 10^{13}$
21	$4,9 \cdot 10^9$	$2,0 \cdot 10^{10}$	$8,0 \cdot 10^9$	$3,3 \cdot 10^{11}$	$1,8 \cdot 10^{10}$
22	$2,6 \cdot 10^7$	$9,5 \cdot 10^7$	$4,3 \cdot 10^{11}$	$6,3 \cdot 10^{11}$	$2,8 \cdot 10^{11}$
35	$2,6 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^{10}$	$1,4 \cdot 10^{11}$
37	$1,0 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^7$	$7,0 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^{11}$
42	$6,0 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^8$	$2,9 \cdot 10^{11}$	$5,3 \cdot 10^{11}$	$2,2 \cdot 10^{11}$

Tabela 4 - Resultado do teste de Multiplicação *in vitro* das cepas previamente selecionadas de *Lactobacillus* spp. ao longo do período de 18 horas (Continuação)

Amostra	3 horas	6 horas	9 horas	14 horas	18 horas
44	1,0.107	3,9.107	1,7.1011	2,2.1012	1,4.1014
47	7,1.106	4,6.107	2,4.1010	1,8.108	3,2.109
48	1,1.108	2,6.1011	5,4.1012	1,9.1011	2,1.1013
57	2,8.1011	5,2.1012	1,6.1013	1,3.1013	1,8.1013
58	2,4.107	1,8.109	1,5.1012	8,0.1013	1,4.1013
60	1,2.108	5,0.109	5,7.1011	2,2.109	1,9.1013
62	2,8.108	6,4.1011	2,0.1011	8,0.109	6,5.107
63	6,0.106	4,0.109	5,0.1011	5,1.1014	2,8.1013
65	4,1.108	1,4.109	6,5.1010	6,3.1011	8,7.1011
70	1,9.106	4,0.109	5,0.109	6,1.1011	1,2.1011

Não houve inibição das amostras umas frente às outras.

5.2. Teste de aderência *in vitro*

A habilidade de adesão e colonização de tecidos do hospedeiro é fundamental para uma bactéria probiótica, como os *Lactobacillus*, pois, evita sua eliminação imediata pelo peristaltismo intestinal e confere uma vantagem adaptativa (KOS et al., 2003) aumentando suas chances de multiplicação. Não obstante, o hospedeiro também é diretamente afetado, uma vez que aderidas ao epitélio, aumenta sua interação com o mesmo, com as bactérias residentes e, por consequência a composição da microbiota e estímulo ao sistema imune (DEEPIKA; CHARAMPOPOULOS, 2010).

A dificuldade de se fazer essa avaliação *in vivo*, gerou a necessidade de desenvolvimento de técnicas *in vitro* (BLUM et al., 1999).

Já se comprovou que a colonização bacteriana pode ser promovida pela adesão a componentes da matriz extracelular das células do hospedeiro, porém, em casos de danos à essa estrutura, seja pela ação mecânica de patógenos, toxinas, enzimas, as bactérias podem entrar em contato direto com

estruturas dos tecidos sub epiteliais como a membrana basal ando assim seu uso como modelo experimental de adesão bacteriana (HORIE *et al.*, 2002).

Assim, culturas de linhagens celulares como Caco-2 e HT-29, diversos tecidos e células epiteliais, mucosa e muco intestinal e proteínas de matriz extracelular de laminina, fibronectina, colágeno e proteoglicanos, dos quais são compostos a *Basement Membrane Matrix* - BMM (BD®- Becton Dickinson, Sparks, MD) foram testados (SCHAR-ZAMMARETTI; UBBINK, 2003).

A BMM é um composto de proteínas de membrana basal reconstituídas, extraídas de sarcoma de rato, rico em fibronectina e colágeno tipo IV, além das proteínas de matriz extracelular. Solúvel, à 37°C ela dá origem a um gel, usado testes de morfogênese, diferenciação e crescimento tumoral e mais recentemente em testes de adesão e invasão bacteriana (LEE *et al.*, 2014).

Utilizando-se deste método, Bouzaine *et al.* (2005) reportaram os maiores valores para *L. rhamnosus* TB1, *L. reuteri* LRT1, respectivamente com 2000 e 500 células por campo, e o menor valor para *L. johnsonii* LJT2 e *L. salivarius* LST1 com menos que 250 células por campo. Contagem inferior foi relata por Horie *et al.* (2002) quando avaliou *L. crispatus* JCM 5810 com uma média de 70 células por campo.

Tabela 5 - Resultado do teste de adesão *in vitro*, utilizando-se a matriz BMM, e procedido com as cepas bacterianas de *Lactobacillus* spp previamente selecionadas. Os resultados representam a média das contagens bacterianas de cada uma das cepas avaliadas

Amostras									
	C+	C-	03	04	05	07	09	10	13
Média	206,12	7,08	111,70	71,70	3,37	6,87	56,29	19,5	65,66

Amostras									
	15	18	21	22	35	37	42	44	47
Média	42,65	13,16	254,87	40,29	49,16	29,16	17,70	231,41	7,08

Amostras								
	48	57	58	60	62	63	65	70
Média	109,54	10,04	21,00	26,45	12,79	188,20	15,34	2,29

Em nosso experimento (Tabela 5), houve contagens abaixo até mesmo do controle negativo (*B. subtilis*) cujo valor médio foi de 7,08 células por campo, e o valor médio aferido em todas as contagens foi inferior aos valores reportados na maioria dos experimentos, por vezes até mesmo nas cepas selecionadas para a composição do *pool* de *Lactobacillus*. Por isso, ressaltamos que fatores como o meio de cultura utilizado, o tempo de cultivo implicado e as condições gerais de cultivo, alterações na composição físico-química da membrana externa celular e a conformação das macromoléculas componentes da mesma, podem alterar sobremaneira os resultados. E estas características variam mesmo dentro da mesma espécie (SCHARZAMMARETTI; UBBINIK, 2003).

Infelizmente não pudemos traçar um paralelo com os resultados *in vivo* que esperávamos obter mediante análise dos perfis de microbiota que seriam gerados pela técnica de TGGE onde, mediante as capacidades de aderência e multiplicação, possivelmente veríamos as bandas correspondentes ao gênero.

Entretanto, outros resultados discutidos posteriormente nos levam a crer que a técnica de adesão *in vivo* foi eficaz em predizer a capacidade adesiva desses *Lactobacillus* no intestino das aves, onde elas exerceram suas funções como bactérias probióticas.

Além disso, os diversos métodos utilizados para avaliar a capacidade de aderência de bactérias ácido-láticas como culturas celulares (OUWEHAND et al., 2001), proteínas de matriz extracelular (de LEEUW et al., 2006) e epitélio do cólon (VESTERLUND et al., 2005), apesar de não refletirem a complexidade real das interações que ocorrem na mucosa do trato intestinal entre as bactérias, a microbiota, as células teciduais, os nutrientes, etc., na maioria dos casos citados há uma correlação satisfatória entre eles. Como citado nos estudos de Oozeer et al. (2006), Ouwehand et al. (2002) e Vesterlund et al. (2005) demonstrando dados de aderência, multiplicação, persistência tanto em modelos de laboratório quanto em ensaios clínicos, de amostras de *Lactobacillus* em humanos.

5.3. Sequenciamento Genético

Mediante os resultados obtidos nos testes supracitados, foram selecionadas 5 amostras (03, 21, 44, 48 e 63) para comporem o *pool* de *Lactobacillus* a ser fornecido para as aves dos grupos experimentais 7 e 8.

Consideramos importante que as bactérias mantivessem um padrão médio de desempenho nas três provas, haja vista a importância das três características para uma bactéria ser considerada probiótica. Todavia, consideramos de suma importância sua capacidade de aderência, já que essa capacidade confere à bactéria a possibilidade de alterar benéficamente o trato entérico por mais tempo, garantindo assim também, um benefício prolongado para o hospedeiro.

Essas amostras foram enviadas para sequenciamento genético para definição da espécie, obtendo-se os resultados abaixo.

Quadro 4 - Resultado do sequenciamento genético das cepas de *Lactobacillus* spp. selecionadas por apresentarem os melhores resultados nos testes prévios

Amostras	
03	<i>Lactobacillus reuteri</i>
21	<i>Lactobacillus reuteri</i>
44	<i>Lactobacillus salivarius</i>
48	<i>Lactobacillus reuteri</i>
63	<i>Lactobacillus acidophilus</i>

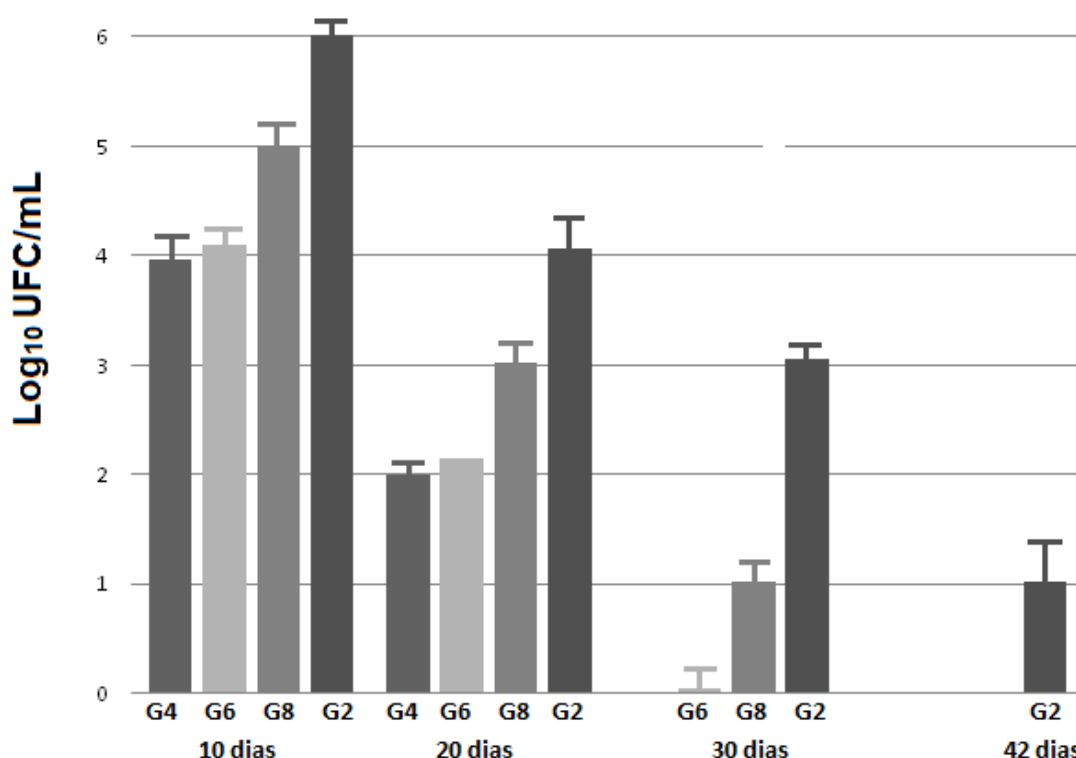
5.4. Contagem bacteriana

É uma premissa básica a capacidade de SE colonização, multiplicação e permanência no trato entérico das aves de produção, principalmente no ceco (CERQUETTI; GHERARDI, 2000; VAN IMMERSEEL et al., 2004). E, uma vez ocorrido o estabelecimento deste patógeno, é muito difícil eliminá-lo ou reduzir sua eliminação fecal sem utilizar-se de antibióticos específicos (NISBET et al., 1994). E reduzir a eliminação fecal e consequência contaminação ambiental é uma necessidade no que concerne à segurança alimentar (CRAVEN, 1995).

Nesse intuito, estudos prévios demonstraram que a colonização inicial do trato entérico e os componentes da primeira dieta administrada tomam parte importante na susceptibilidade futura à colonização por patógenos (AMIT-ROMACH et al., 2004).

Por isso, no presente experimento, nos utilizamos da contagem bacteriana a partir de fezes coletadas do ceco das aves, para avaliar a capacidade de controle ou inibição da multiplicação e permanência da SE no ceco das aves tratadas com pool de *Lactobacillus* (G8), Ácido caprílico (G4) e Promotor de crescimento halquinol (G6) em comparação ao grupo controle (G2). Os resultados estão expressos na Figura 2.

Figura 3 - Contagem bacteriana (UFC/g) de *Salmonella Enteritidis* no ceco das aves dos tratamentos 1 a 8 nos momentos 10, 20, 30 e 42 dias de vida, representada em Log_{10}



Aos dias 10 dias não houve diferença entre os tratamentos com Ácido caprílico e com Halquinol, que revelaram as menores contagens entre todos os tratamentos, seguidos do tratamento com *Lactobacillus*, o qual diferiu significativamente dos controles (Figura 3).

Aos 20 dias também não houve diferença entre os tratamentos com Ácido caprílico e com Halquinol, porém o grupo tratado com *Latobacillus* apresentou uma redução tão significativa em relação ao momento anterior quanto os grupos tratados com ácido caprílico e com haquinol, além de apresentar redução de 2 logs em relação ao grupo controle (Figura 3).

Aos 30 dias, só obtivemos contagem dentre o grupo tratado no *Lactobacillus* que diferiu dos controles novamente por 2 logs na contagem e também em relação ao momento anterior. Aos 42 só obtivemos contagem nos controles (Figura32).

Assim, concluímos que não houve diferença no controle de SE entre os grupos tratados com ácido caprílico e halquinol, que se mostrou um substituto interessante para a utilização de promotores de crescimento.

Esta constatação é bastante promissora devido às capacidades relatadas do Halquinol.

Com seu amplo espectro de ação, *in vitro* e *in vivo*, testado contra *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia* e *Vibrio*, e comprovadamente eficaz em cepas multirresistentes de *S. typhi* e *S. paratyphi*. Em infecções intestinais demonstrou-se capaz de abreviar o curso clínico da doença, cessar a excreção fecal do patógeno, e nos casos crônicos erradicar os reservatórios fecais e biliares de *Salmonella* (ASPERILLA et al., 1990).

Assim, é interessante ter comprovada e equiparada a eficácia do produto frente a um antimicrobiano, uma vez que, não apenas a exigência do mercado internacional em bani-los da produção animal se faz presente, mas também a resistência bacteriana se torna cada mais real.

Num levantamento feito em 13 países europeus, onde o controle do uso de antimicrobianos se faz rígido há mais de duas décadas, foram selecionadas 1215 cepas de *Salmonella*, originadas tanto de amostras animais quanto humanas, para a pesquisa do gene PMQR (*Plasmide- mediate quinolone resistance*). O resultado foi alarmante, com a presença detectada em 59% das amostras, sugerindo cautela no uso de antibióticos (VELDMAN et al., 2011).

Seguindo o mesmo cunho do trabalho anterior, desta vez em território brasileiro, Cardoso et al. (2006) selecionaram oitenta amostras de *Salmonella* Enteritidis, isoladas de carcaças de frango para testar a resistência a antimicrobianos, e 100% delas demonstrou resistência a colistina,

novobiocina, eritromicina e tetraciclina, seguido de 90% de resistência para nitrofurantoína, 86,25% para sulfonamida e diferentes níveis para canamicina, enrofloxacin, neomicina, fosfomicina, sulfonamida.

Semelhante aos nossos resultados, a administração de flavomicina ou mistura de ácidos orgânicos foi igualmente eficaz em prover a diminuição das contagens de bactérias gram negativas, tanto no ceco quanto no íleo, aos 21 e 42 dias, quando comparados ao grupo controle. Porém, não houve diferença de eficácia entre os dois tratamentos (GUNAL et al., 2006).

A eficácia de uma mistura de ácidos orgânicos (fumárico, propiônico, cítrico e fórmico) também foi testada para capacidade de diminuir a população de *Enterobacteriaceae* em comparação à bacitracina de zinco, e a combinação de ambos. Neste caso, a combinação foi o tratamento mais eficaz, seguido da administração da mistura de ácidos e da bacitracina sozinhos (ALP et al., 1999).

Em concordância com nossos resultados, Van Immerseel et al. (2005) reportou a eficácia do ácido butírico adicionado à alimentação em reduzir a eliminação de SE nas fezes das aves, porém, não obteve a eliminação total do patógeno do ceco. Diferentemente do nosso experimento, onde não havia mais contagem bacteriana 23 dias após o desafio, no grupo suplementado com ácido caprílico. Entretanto, sabendo-se do potencial séptico de *Salmonella*, não excluímos a possibilidade de sua permanência em outros órgãos, os quais à inspeção macroscópica não detectamos.

Muitos autores relatam essa dificuldade da eliminação total do patógeno (BEAL et al., 2004; VAN IMMERSEEL et al., 2004; BERTHELOT-HERAULT et al., 2003), o que mais uma vez comprova o caráter promissor do uso de ácido caprílico aqui relatado.

Também utilizando o ácido caprílico, Kollanoor-Johny et al. (2012) descreve a redução da população de SE não apenas nos cecos, mas no intestino delgado, cloaca, fígado e baço, tanto nas aves de 3 quanto de 4 semanas de vida, sendo que as mais jovens demonstraram uma colonização significativamente maior ($7. \log_{10}$ UFC/g) que as mais velhas ($4. \log_{10}$ UFC/g) à cultura cecal. Supostamente, isso se deve ao desenvolvimento do sistema imune (BEAL et al., 2004). Essa diferença também foi notada em nosso

experimento, no qual ao progredir da idade, houve eliminação do patógeno à contagem bacteriana, logo aos 30 dias de vida.

Jarquín et al. (2007) testaram a eficácia de uma mistura de ácidos orgânicos (MAO [0.024% tânico, 0.042% láctico, 0.048% butírico e 0.048% acético]) em reduzir a eliminação fecal e transmissão horizontal de SE. O tratamento com MAO mostrou-se válido para evitar a transmissão horizontal, mas não foi capaz de cessar a eliminação fecal. Foi testada também a associação da MAO a um probiótico comercial (5 *Escherichia*, 1 *Klebsiella*, 1 *Kluyvera* e 2 *Lactobacilli*), porém, não houve vantagem na associação.

Também se utilizando de uma mistura comercial de ácidos orgânicos na água de bebida, Wolfenden et al. (2007) reportou a redução significativa na recuperação de SE das amostras fecais (75%) quando comparado ao controle (100%). Associando ainda o tratamento com ácido à administração de um probiótico comercial constituído por *Lactobacillus*, e deste em solitário, houve recuperação de respectivamente de SE em 75%, 40% e 100% das amostras, respectivamente. Diferente do relato de Jarquín et al. (2007), o resultado da associação de probiótico e ácido orgânico foi bastante expressivo e, assim, consideramos uma interessante possibilidade a ser avaliada numa oportunidade futura, uma vez que os resultados obtidos com o grupo tratado com o pool de *Lactobacillus* não foram tão expressivos. Mesmo o grupo tratado com pool de *Lactobacillus* obteve o segundo melhor resultado entre os tratamentos, diferindo em todos os momentos do grupo controle.

A administração oral de bactérias probióticas, sobretudo logo após o nascimento, foi proposta no começo da década de 90, e é atualmente reconhecida como uma maneira de reduzir o risco de infecção intestinal por bactérias patogênicas como a *Salmonella* (LODINOVÁ-ZÁDNÍKOVÁ et al., 2003). Desde então, fornecer essas bactérias benéficas em culturas puras ou adicionadas aos componentes da dieta para animais de produção vem se tornando uma prática comum (MATEOS et al., 2002).

Quando *L. salivarius* CTC 2197 foi administrado via oral juntamente com *S. enteritidis* à aves de 1 dia, o patógeno foi completamente removido após 21 dias, e o mesmo resultado foi obtido com a administração via alimentação e água de bebida, comprovando sua eficiência em colonizar o trato entérico das aves após 1 semana da administração. (PASCUAL et al., 1999).

No intuito de evitar a capacidade de sepse da *Salmonella*, *L. casei* foi administrado 2 e 7 dias antes do desafio com SE, e então continuamente até 2, 5 e 8 dias após. Nesses três períodos evidenciou-se uma diminuição da translocação para baço e fígado, em comparação ao controle. E comprovando-se a capacidade imunomodulatória, a proliferação linfocitária também foi consideravelmente maior nos grupos tratados (JAIN et al., 2008).

Os mesmo autores concluíram também que a administração por 7 dias foi mais efetiva por permitir melhor desenvolvimento das imunidades inata e adaptativa.

Além dos vários estudos com cepas específicas de *Lactobacillus*, outros autores avaliaram também a atividade inibitória de misturas comerciais de composição indefinida e, similar ao nosso experimento, combinações definidas de bactérias probióticas.

Hiigins et al. (2010) constatou que uma mistura probiótica comercial foi mais eficaz na redução da contagem cecal de aves desafiadas com SE do que a combinação de diferentes cepas de *Lactobacillus* isoladas em laboratório (*Lactobacillus casei* 11578, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842, and *Lactobacillus fermentum* 14931), ambas fornecidas via oral, 24h antes do desafio.

Entretanto, apesar de alguns estudos mostrarem que o tratamento precoce das aves com bactérias probióticas poderia significativamente reduzir a colonização por *Salmonella* e sua eliminação fecal (HOSSEINI-MANSOU et al., 2011), outros não encontraram qualquer efeito Yamawaki et al. (2013) descreveram não haver benefício na imersão de ovos em cultura de *Lactobacillus* ou inoculação in ovo, prévia à incubação, frente a um posterior desafio com SE.

Lactobacillus também não demonstrou capacidade de redução na população cecal de bactérias gram negativas (OSTURK e YILDIRM, 2004).

A grande variabilidade de resultados encontrados entre diferentes fontes e doses de probióticos demonstra a importância de se considerar alguns parâmetros como período de vida, via de administração, espécie das bactérias e cepa, dose, etc (de OLIVEIRA et al., 2014).

5.5. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

5.5.1. Produção de IgM, IgY e IgA

Segundo Subba Rao et al. (1978), a IgM é a primeira classe de anticorpos a ser sintetizada tanto na ontogenia do sistema imune quanto no desenvolvimento de uma resposta imune específica, sendo detectada aproximadamente após 4 dias de vida (Martin; Leslie, 1973). Essas informações estão de acordo com nossos parâmetros, visto que houve produção de IgM em todos os grupos após 10 dias, embora sem diferença significativa entre os grupos (Figura 5).

Ainda segundo Martin e Leslie (1973), as concentrações de IgM atingem seu máximo após o 40º dia de vida, fato confirmado pelo aumento biológico nos grupos G1, G2, G4, G5, G6 e G7, embora não significativo. Já no G3, houve tendência à diminuição da produção dos 30 para os 42 dias (Figura 4). O mesmo foi observado por Lillehoj e Ruff (1987), embora Roumbout et al. (1992) afirmem que altos índices de IgM são indicativos de infecção ativa.

Em relação às aves tratadas com probiótico, a produção de anticorpos frente a um estímulo antigênico, destacando-se a IgM, é significativamente maior que nas aves não tratadas (HAGHIGHI et al., 2011; HUANG et al., 2003; KOENEN et al., 2004). Essa tendência pode ser observada em nosso experimento quando comparamos o G7 em relação a G2 aos 20 dias, o G7 aos 30 dias em relação a G2 e G4, e G7 aos 42 dias em relação a G2, G4 e G6 (Figuras 4 e 5).

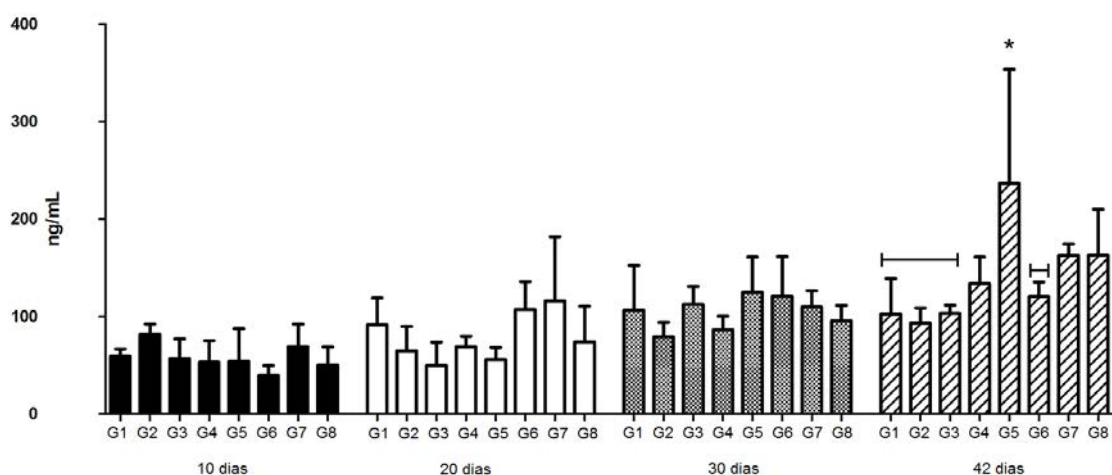


Figura 4 - Concentração de IgM no lavado intestinal das aves dos grupos 1 a 8 nos momentos 10, 20 30 e 42 dia de vida

Entretanto, em nosso experimento, o G7 apresentou aumento não significativo de IgM ($p > 0,05$) quando comparado a G8 após 10, 20 e 30 dias, havendo, contudo, equivalência no 42º dia (Figura 4). Este fato pode ser explicado pelo contato das bactérias comensais presentes no *pool* administrado com as células intestinais, modulando as respostas imunes locais e sistêmicas (MACPHERSON et al., 2000), caracterizadas pela produção de anticorpos com ampla afinidade e baixa especificidade a antígenos (BERLAND e WORTIS, 2002; HAAS et al., 2005), ditos anticorpos naturais, sem a exposição prévia a um patógeno específico (DONO et al., 2004; BERLAND; WORTIS, 2002).

A presença desses anticorpos naturais já foi descrita em humanos e ratos, sendo dos tipos IgM, IgY e IgA, com predominância de IgM (DONO et al., 2004; BERLAND e WORTIS, 2002), e também nas aves (LAMMERS et al., 2004; MATSON et al., 2005; PARMENTIER et al., 2004; RHEE et al., 2004), nas quais a predominância de IgM e IgY, sem diferença significativa, também foi confirmada (HAGHIGHI et al., 2006).

Cabe citar que muitos parâmetros estão envolvidos na determinação da eficácia dos probióticos em estimular a resposta imune e, por esta razão, o efeito imuno-estimulante dos probióticos não deve ser generalizado

(HAGHIGHI et al., 2011). De fato, outros estudos demonstraram que os grupos tratados com probióticos apresentaram resposta humoral aquém daquela apresentada pelos grupos não tratados, com redução dos anticorpos séricos ou da mucosa intestinal (DALLOUOL et al., 2003; BALEVI et al., 2001).

Nossos achados estão de acordo com Cox et al. (1990), os quais relataram que aves neonatas são altamente susceptíveis à infecção por *Salmonella*, sendo necessárias menos que 100 células do patógeno para que elas se tornem infectadas. Além disso, a população de linfócitos no trato intestinal das aves é esparsa na primeira semana pós-incubação, e células produtoras de anticorpos podem não ser encontradas no epitélio intestinal de 2 a 6 semanas após o nascimento (YAMAMOTO et al., 1997; JEURISSEN et al., 1989). De fato, o desenvolvimento máximo do tecido linfóide associado ao intestino requer 6 semanas (CHAT e MYERS, 1991; JEURISSEN et al., 1989; BEFUS et al., 1980) e, Consequentemente, a resposta das aves à SE na primeira semana pode ser limitada.

Ademais, a exposição precoce à *Salmonella* pode levar a uma resposta ineficiente ao patógeno e depleção do número de células nos tecidos linfóides (HASSAN; CURTIS, 1994; WILLIAMS; WHITTEMORE, 1975). Assim, o organismo poderia se tornar cronicamente hiporresponsivo ao patógeno (HASSAN; CURTIS, 1994) ou mesmo tolerante a ele por longos períodos (GOLUB; GREEN, 1991). Estas afirmações foram confirmadas mais recentemente por Holt et al. (1999) ao comparar o padrão de resposta imune local e sistêmica gerados pela infecção de aves ao 1º dia de vida e à 15ª semana.

Aos 42 dias pelo a produção de IgM pelo G5 foi significativamente maior que nos outros momentos por esse mesmo grupo, e também em relação a G1, G2, G3 e G6, além de ter sido maior em relação a G4, G7 e G8, embora sem diferença estatística, devido ao nível de confiança (Figuras 4 e 5).

Partindo do pressuposto de que os antibióticos alteram a composição da microbiota intestinal (GASKINS et al., 2002) e podem trazer impacto positivo à saúde local e sistêmica do hospedeiro, é cabível concluir que as bactérias remanescentes alteram qualitativa e quantitativamente a resposta imune do mesmo, tanto local quanto sistemicamente (Brisbin et al., 2008). Assim, estamos de acordo com os autores, pois consideramos a possibilidade de o

aumento na produção de IgM estar relacionado à microbiota favorecida pela administração do antibiótico, que pode estar enriquecida com bactérias de propriedades probióticas.

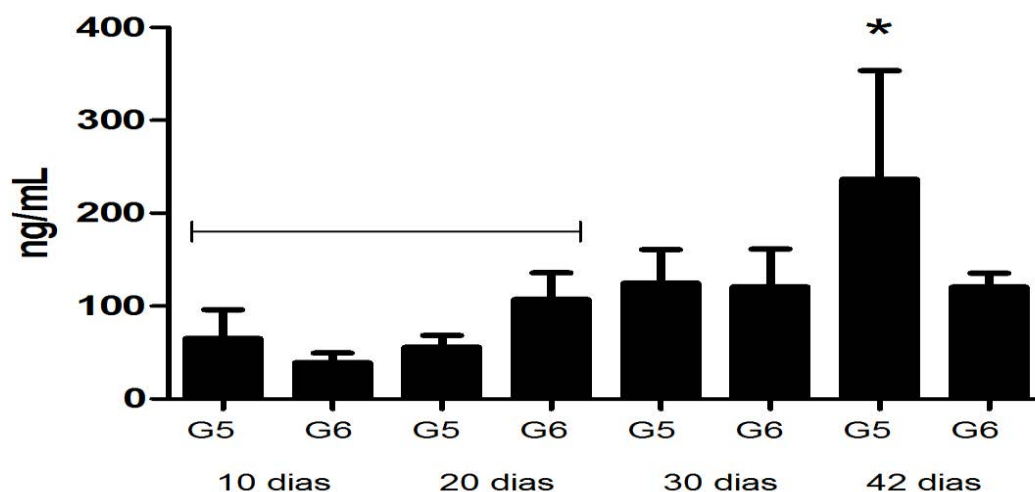


Figura 5 - Concentração de IgM no lavado intestinal das aves dos grupos 5 e 6 nos momentos 10, 20, 30 e 42 dias de vida

Em suma, como a administração de probiótico se deu em baixas doses contínuas, o efeito máximo só se fez notar na maior idade das aves, quando os efeitos do antibiótico estavam mais pronunciados.

Não descartamos também o possível efeito direto de antibióticos ao sistema imune, visto que sua capacidade de imunomodulação já foi descrita (WOO et al., 1999), todavia, não para o halquinol.

Com relação à quantificação de IgY e IgA, os resultados obtidos permaneceram indetectáveis em ng/mL, após conversão das absorbâncias. Visto que diferentes autores observaram a produção destas imunoglobulinas em aves, atribuímos a ausência de resultados aos *kits* utilizados, embora as curvas-padrão tenham sido confiáveis. O fabricante não sugeriu diluições a serem feitas com as amostras, ficando essas a critério do pesquisador. Embora tenhamos utilizado o mesmo esquema de diluição que se mostrou eficiente para IgM, não obtivemos sucesso, tampouco com outros esquema e, pode-se especular que outras diluições poderiam ter fornecido resultados confiáveis.

5.5.2. Produção de IL-8 e IL-17

A IL-8 é uma citocina produzida por uma grande variedade de tipos celulares, incluindo células epiteliais e endoteliais, com a capacidade de atração de neutrófilos e linfócitos T a um sítio infeccioso (WUYTS et al., 1998). Todavia, alguns autores aventavam a hipótese de que linfócitos e neutrófilos poderiam ser produtores desta citocina (KOGUT et al., 2003), ou recrutados por ela após produção pelas células epiteliais e endoteliais, ou ambas possibilidades (KOGUT, 2002).

Nesse sentido, é plausível conceber que sua maior produção ocorra quando o desenvolvimento do epitélio intestinal tenha atingido seu máximo, o que, conforme citado anteriormente, ocorre por volta da 6ª semana de vida (SCHAT e MYERS, 1991; JEURISSEN et al., 1989; BEFUS et al., 1980). Em concordância com esses dados, a maioria dos grupos apresentou maior produção de IL-8 após 20, 30 e 42 dias de vida em relação ao 10º dia (Figuras 6, 7, 8, 9, 10 e 11). Pode-se observar uma exceção com relação a G3, havendo maior produção significativa de IL-8 aos 30 dias em relação aos 20 e 42 dias ($p < 0,05$) (Figura 6).

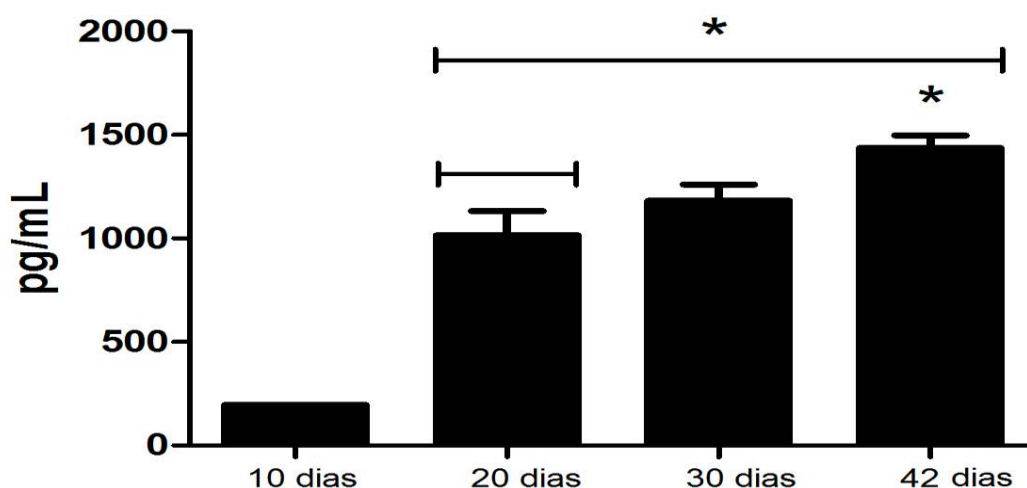


Figura 6 - Concentração de IL-8 no sangue das aves do grupo 4 nos momentos 10, 20, 30 e 42 dias de vida

Estudos prévios demonstraram que a contaminação com *Salmonella* induz a produção de IL-8 pelo epitélio intestinal, tanto em mamíferos (WALLIS;

GALYOV, 2000) quanto em aves (HENDERSON et al., 1999), aumentando o influxo de neutrófilos (HUGHES et al., 2001) E HETERÓFILOS (Wigley; KAISER, 2003; Henderson et al., 1999) em ambos os casos.

Esses dados corroboram nossos achados ao comparar G5 com seu correspondente desafiado (G6), o qual apresentou aumento na produção de IL-8 aos 20 dias ($p<0,05$) (Figura 10). A única exceção ocorreu com o G7 aos 20 dias, apresentando produção de IL-8 significativamente maior que G8 ($p<0,05$) (Figura 7).

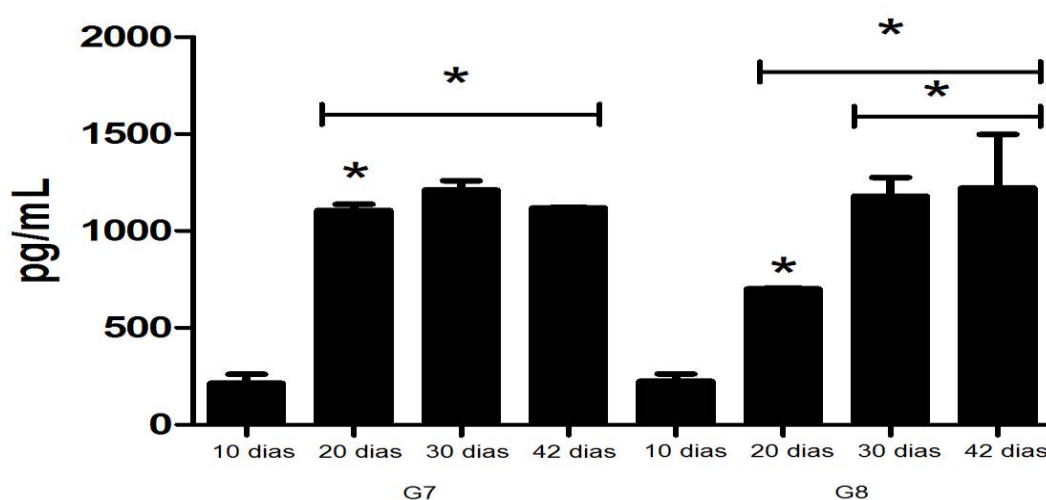


Figura 7 - Concentração de IL-8 no sangue das aves dos grupos 7 e 8 nos momentos 10, 20, 30 e 42 dias de vida.

Daqui em diante, consideraremos que os componentes de uma dieta comum não são capazes de induzir alterações imunes (GABORIAU-ROUTHIAU, 2009) e qualquer chance de contaminação indesejada está excluída, uma vez que realizamos cultura cecal e avaliação macroscópica de órgãos alvo (coração, fígado, baço e gônadas) à necropsia de todas as aves até o 42^a dia de vida. Assim, a expressão de IL-8 se deve apenas a alterações na microbiota.

Com relação à indução da produção de citocinas pela microbiota comensal, a qual intencionamos influenciar desde o primeiro dia de vida, via mudanças na dieta e administração de probiótico, Coloe et al. (1984) relataram que essa ligação não estaria descrita nas aves, mas sim nos mamíferos, nos

quais há diferentes padrões de expressão gênica relacionada à imunidade conforme variação da microbiota comensal (LAN et al., 2005).

A complexidade da microbiota das aves aumenta gradativamente do 1º ao 19º dia de vida, com mudanças mais significativas durante a primeira semana, que pode ser avaliada, também, pelo padrão de produção de IL-8, a qual atinge seu pico no 4º dia de vida e decresce até o 10º dia, não se alterando mais posteriormente (CHRANOVA et al., 2011).

Como nossas avaliações começaram a partir do 10º dia de vida das aves, isso não pôde ser avaliado, porém, nota-se que aos 10 dias, todos os grupos apresentaram produção semelhante de IL-8, condizente com o reportado pelo estudo citado a priori (Figura 8).

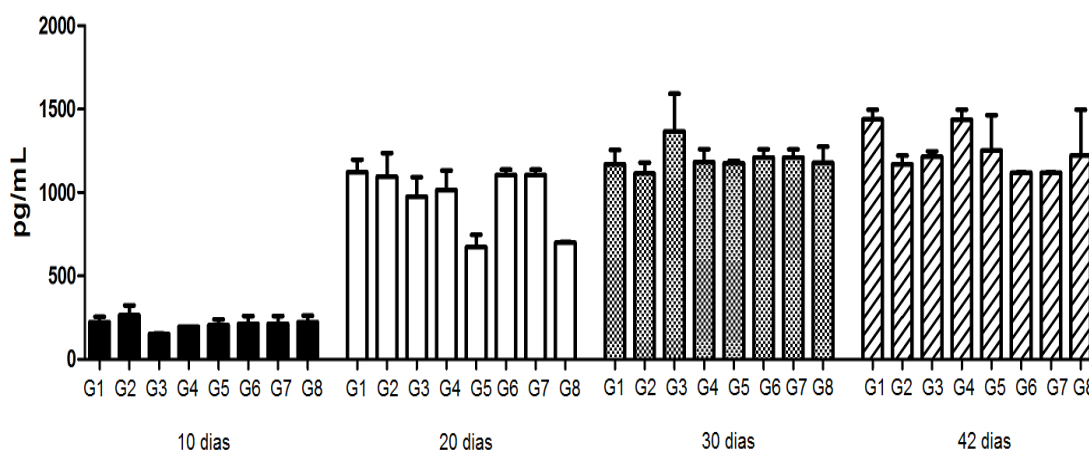


Figura 8 - Concentração de IL-8 no sangue das aves dos grupos 1 a 8 nos momentos 10, 20, 30 e 42 dias de vida

É importante citar que no período do 1º ao 19º dia há uma maior variação individual do que em aves mais velhas (LU et al., 2003; CHRANOVA et al., 2011), provavelmente pela colonização inicialmente aleatória durante o período da concepção e incubação, em que a microbiota se torna mais restrita. A partir do momento em que as aves passam a conviver num mesmo ambiente, os membros do mesmo lote apresentam microbiota de composição mais homogênea entre si (CHRANOVA et al., 2011). Nesse contexto, provavelmente nosso número de unidades experimentais pode ter sido restrito para avaliar tal variação.

Porém, diferindo deste mesmo estudo, nossos grupos atingiram o pico de produção de IL-8 em períodos variando entre o 20º (G7) (Figura 9), 30º (G5 e G3) (Figuras 10 e 6) e 42º (G1) (Figura 8) dias de vida. É interessante notar que G1, que não recebeu qualquer tratamento e, portanto, desenvolveu a microbiota ao acaso (METHNER et al., 2004), apresentou produção elevada de IL-8 até mais tardiamente, demonstrando o retardo no estabelecimento de uma microbiota comensal. Diferentemente deste, o G7, que recebeu o *pool* de *Lactobacillus*, via oral e diariamente do 1º ao 42º dia de vida, apresentou a maior produção de IL-8 mais precocemente, corroborando as afirmações da capacidade da administração de um probiótico em induzir o amadurecimento precoce da microbiota entérica das aves.

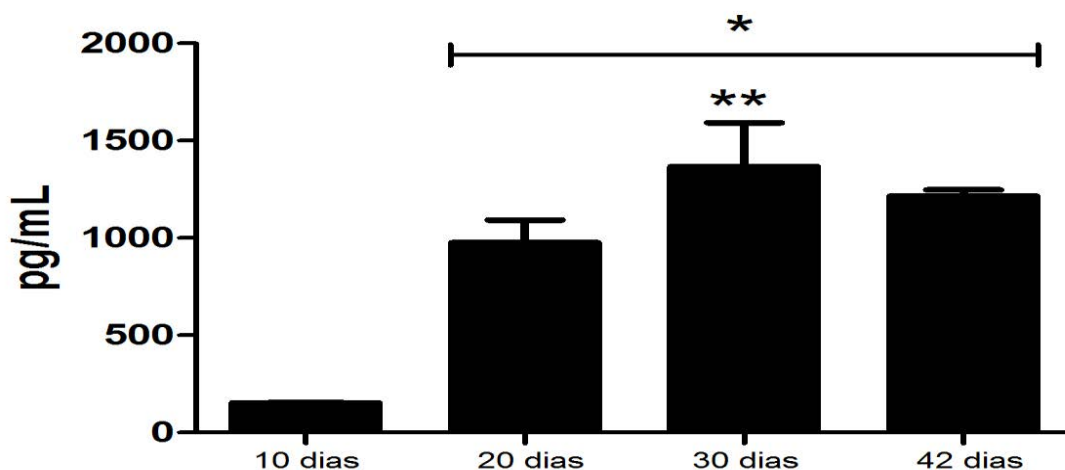


Figura 9 - Concentração de IL-8 no sangue das aves do grupo 3 nos momentos 10, 20, 30 e 42 dias de vida

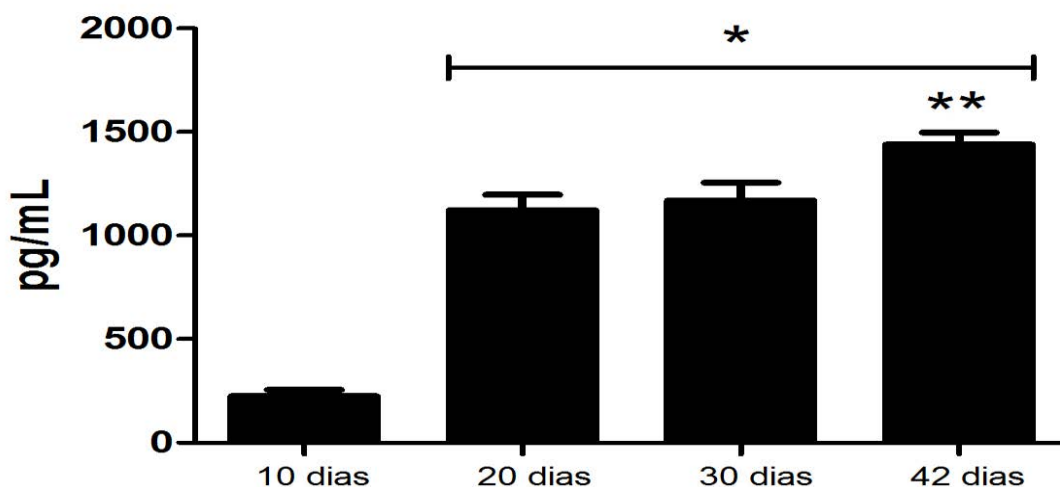


Figura 10 - Concentração de IL-8 no sangue das aves do grupo 1 nos momentos 10, 20, 30 e 42 dias de vida

Quanto aos grupos desafiados com SE, CHRANOVA et al. (2011) relataram que as aves desafiadas com essa bactérias apresentam maior produção de IL-8 em comparação às não desafiadas a partir do 3º dia pós-infecção, quando houve um pico, com declínio constatado do 10º ao 42º dia. Esse padrão não foi observado em nosso estudo, uma vez que 3 dias após o desafio realizamos nossa primeira mensuração de IL-8 e todos os grupos apresentaram padrões semelhantes, tanto entre os contaminados, quanto entre os livres de contaminação e seus respectivos pares desafiados (Figuras 8, 7, e 10).

Ressaltamos aqui que no experimento conduzido por CHRANOVA et al. (2011) houve mensuração de IL-8 diretamente no ceco das aves, onde há maior colonização de SE, também utilizada como desafio pelo autores, mas avaliando a expressão gênica desta quimiocina – técnica esta que confere menor influência do que o ensaio imunoenzimático, visto que nem sempre a expressão coincide com a produção de uma determinada molécula. Em contrapartida, optamos por trabalhar com amostras de lavado intestinal e determinar a produção de IL-8 por ELISA, quantificando a produção efetiva de IL-8 ao longo de trato entérico. Ainda assim, CHRANOVA et al. (2011)

relataram variação individual tão expressiva, que foi possível relatar apenas tendências no padrões de produção das citocinas.

Com relação à IL-17, não foi possível quantificar tal citocina, em função do *kit* utilizado para quantificação, embora inúmeras tentativas tenham sido realizadas. A curva-padrão não se apresentou confiável em nenhum ensaio, inviabilizando qualquer análise. Deste modo, qualquer interpretação sobre os resultados obtidos seria mera especulação, sem fundamentos.

Vale ressaltar que o fabricante do *kit* não sugere a diluição a ser feita, ficando à critério do pesquisador predizer se os valores a serem aferidos estarão dentro dos limites mensuráveis pelo *kit*.

Embora tenhamos tentado o mesmo esquema de diluição utilizado para IL-8, além de outras diluições sugeridas em literatura, não obtivemos resultados congruentes.

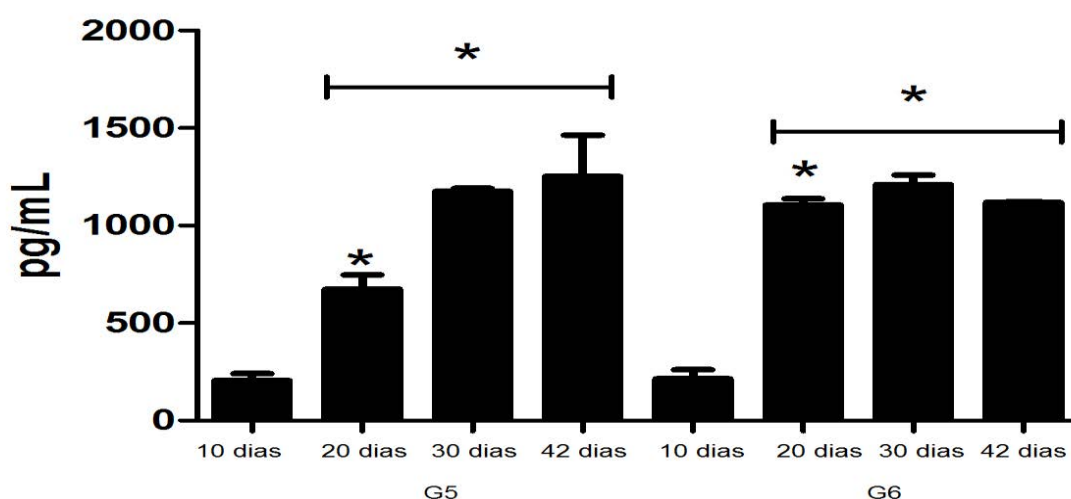


Figura 11 - Concentração de IL-8 no sangue das aves dos grupos 5 e 6 nos momentos 10, 20, 30 e 42 dias de vida

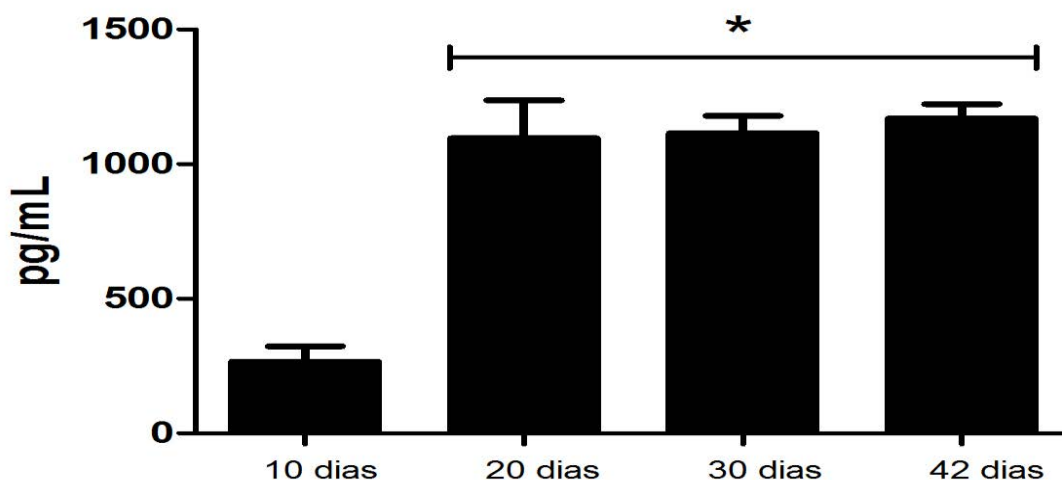


Figura 12 - Concentração de IL-8 no sangue das aves do grupo 2 nos momentos 10, 20, 30 e 42 dias de vida

5.6. TGGE

As amostras de fezes dos grupos experimentais, em seus respectivos momentos, não geraram bons resultados quando submetidas à técnica de TGGE, apresentando bandas pouco definidas ou mesmo a ausência das mesmas (Figura 12).

Embasados em literatura (HE et al., 2006; THOMPSON et al., 2002) levantamos algumas hipóteses do possível fator comprometedor da qualidade do resultados obtidos no método de TGGE e, na intenção de avaliar o produto obtido em cada uma das etapas de processamento das amostras de fezes até a realização efetiva da técnica de TGGE, isto é, extração, amplificação e purificação, submetemos todas elas à eletroforese em gel (Figura 16).

As bandas obtidas na eletroforese do produto da extração das amostras fecais mostraram-se pouco constante, com resultados variando de satisfatório a nulo, sem motivo evidente. Portanto, nossa primeira tentativa foi de utilizar o protocolo caseiro proposto por Dubernet et al. (2012) para extração à base de clorofórmio e formol. Todavia, o protocolo demonstrou-se muito eficiente para extração de bactérias gram negativas, e parcialmente eficiente para bactérias gram positivas e amostras fecais, o que nos levou a descartar a possibilidade de utilizá-lo. Nossa próxima tentativa foi a troca do kit de extração, utilizando o

Qlamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen®), e mesmo assim a qualidade das bandas geradas na técnica de TGGE não permitiram uma avaliação individual dos grupos, tampouco a comparação entre os diferentes e grupos e momentos.

Mediante a falha em otimizar o passo da extração, optamos por voltar a utilizar o kit da Norgen®, que, apesar da inconsistência, exibiu os melhores resultados, e partimos para regularização dos outros passos do protocolo.

Em seguida, optamos pela tentativa de aperfeiçoar a técnica de purificação proposta pelo fabricante do kit da *GE Healthcare®*. O passo final de eluição sugere que o produto pode ser eluído com 10 a 50 µL de água estéril (*nuclease free*) ou tampão (10mM Tris-HCl, pH 8). Optamos por utilizar a água, pois, nossa experiência laboratorial é de que ela, apesar de manter o produtos estável por menos tempo, interfere menos com os reagentes aplicados à amostras nas técnicas subsequentes.

Na tentativa de obter uma quantidade maior de DNA num volume menor, optamos pela quantidade mínima sugerida, entretanto, o resultado não foi satisfatório, haja vista que as bandas obtidas na eletroforese do purificado apresentaram qualidade inferior. Então, optamos pelo volume intermediário de 25µL, que também não alterou positivamente a qualidade das bandas na eletroforese do produto e, finalmente, tentamos dividir o passo da eluição em dois, procedendo duas eluições com 25µL cada e aumentando o tempo de descanso do eluente na coluna, de 1 minuto sugerido, para 5 minutos em cada eluição.

Ainda sem obter os resultados esperados, optamos por quantificar as amostras obtidas na purificação e concentrá-las para o mínimo de 25µL, ou mais, caso a mesma apresentasse pouca quantidade de DNA. Para tanto, utilizamos o Concentrador Eppendorf®. Os resultados obtidos com a quantificação e concentração estão expressos na Tabela 5.

Mesmo assim não obtivemos bons resultados e as bandas continuavam pouco definidas ou inaparentes.

Assim, hipotetizamos que a manipulação das amostras para confecção do *pool* de cada grupo, dentro de cada momento, poderia afetar a qualidade do DNA a ser utilizado. Por isso, trabalhamos com as amostras de uma ave dentro de cada grupo, procedendo com todas alterações já mencionadas e, ainda assim, o resultado não foi positivo no TGGE (Figura 15).

A ausência de bandas à utilização do método similar DGGE também foi reportada por Van der Wielen et al. (2002), tanto nas aves tratadas com antibiótico quanto nas do grupo controle, entretanto, somente até os 4 dias de vida. Os autores sugerem que este resultado não indica, obviamente, uma ausência de microbiota, mas presença num limite abaixo do detectável pela técnica.

Assim como os autores, nós também descartamos essa improvável possibilidade cultivando as amostras cecais, mesmo após longo período de armazenagem, e obtivemos crescimento tanto em ágar MacConkey quanto em ágar BHI.

Nosso resultado mais próximo do ideal está expresso na Figura 17, resultado da soma de todas as alterações anteriormente citadas. Todavia, não foi possível reproduzi-lo em tentativas subsequentes. Assim, as inferências feitas sobre esse resultado são hipóteses que para confirmação exigiram melhor adaptação da técnica de TGGE.

Na Figura 17 podemos observar que o padrão de bandas para G1 e G2 se manteve semelhante ao longo dos quatro momentos de coleta e, assim, concluímos que não houve variação da microbiota.

Nossos resultados diferem de van der Wielen et al. (2002) que reportaram, ao longo dos 38 dias de vida das aves, um aumento na complexidade da microbiota em todos os compartimentos intestinais evidenciado pelo aumento do número de bandas no gel de eletroforese. Esses resultados estão em concordância com estudos prévios de microscopia e cultivo (VAN DER WIELEN et al., 2000; BARNES, 1979).

Van der Wielen *et al.* (2002) afirmam ainda que aves mais velhas apresentam padrões de banda mais distintos umas em relação às outras, diferente das aves jovens, as quais apresentam padrões semelhantes. Esses resultados mostram que fatores intrínsecos ao hospedeiro influenciam na composição da microbiota, como genótipo (TOIVANNEN et al., 2001; ZOETENDAL et al., 2001), sistema imune, receptores intestinais específicos (ZOETENDAL et al., 2001) e complexos de histocompatibilidade maior (major histocompatibility complex- MHC) (TOIVANNEN et al., 2001). Entretanto, vale ressaltar que van der Wielen et al. (2002) trabalharam com aves em condições de laboratório e Toivannen et al. (2001) e Zoetendal et al. (2001) com

camundongos. Por isso, ainda não se sabe a importância desses fatores em aves em condições de criação industriais.

Nossos resultados não demonstraram essa variação dentre as aves jovens, nem dentre as adultas, e estão de acordo com Apajalahti et al. (1998).

Cabe ressaltar que estudos prévios da microbiota intestinal das aves mostraram uma diversidade de espécies, mas, ao regredirmos na escala filogenética, vemos que eles são pertencentes a basicamente 5 famílias, sendo as mais frequentes Enterobacteriaceae, Clostridiaceae e Lactobacillaceae (AMIT-ROMACH et al., 2004; LAN et al., 2004), conforme previamente citado neste estudo na fase de padronização da técnica de TGGE.

Em adição, sabendo que todos os nossos tratamentos objetivaram um controle de *Salmonella* e estabelecimento de uma microbiota “saudável”, pode ser que tenha ocorrido uma uniformização da microbiota dos tratamentos no que diz respeito às famílias predominantes, e que as variações tenham ocorrido ao nível de gênero, as quais a técnica, no presente estudo, não foi eficaz em revelar. Entretanto, não podemos especular sobre quais famílias representam as bandas presentes na Figura 17 devido à qualidade do resultado.

Nesse contexto, comunidades bacterianas que apresentam poucos grupos e dominantes, gerarão padrões de banda mais simples e aqueles grupos de menor abundância podem não ser adequadamente representados (MUZYER et al., 1993).

Também em discordância com a diversidade da microbiota relatada em literatura está o estudo de Pedroso et al. (2006). Os autores ressaltam que a real diversidade por ter sido subestimada pela técnica do gradiente em gel de eletroforese porque algumas populações bacterianas representam uma pequena fração do todo, consequentemente seus DNAs representam menos que 1% de todo material genético bacteriano das fezes (MUZYER e SMALLA, 1998) e, portanto, seus *amplicons* não são capturados pela densitometria. Convertendo em números, é improvável que gêneros, espécies ou mesmo comunidades com contagens inferiores a 10^8 UFC/g de fezes, sejam visualizados pela técnica (SIMPSON et al., 1999).

Outra possibilidade é a comigração de alguns fragmentos com poucos pares de base de diferença (JACKSON et al., 2002) ou mesmo número de G +

C na região 16S V3. Nessas situações temos bandas que não representam espécies ou gêneros, mas até famílias ou grupos (SIMPSON et al., 1999). Assim, em contraste com Nubel et al. (1996) que relataram a eficácia do método em separar sequências de DNA que diferiam por apenas um par de base, Vallaey et al. (1997) e Cleven et al. (1997) reportaram a ineficácia em separar fragmentos com substancial diferença previamente conhecida.

Outra observação interessante é que o método do gradiente em gel de eletroforese também não foi eficaz em demonstrar a alteração na microbiota de aves suplementadas com promotores de crescimento em relação ao controle; isto porque as mudanças não foram numéricas (PEDROSO et al., 2006), com redução da variedade microbiana, conforme exposto previamente (KAUTS, 1999; CURRY, 2002), mas sim qualitativas, sem alterar o padrão de *amplicons* (Knarreborg et al., 2002; McCracken et al., 2001).

A título de comparação, obtivemos amostras fecais de camundongos as quais submetemos ao mesmo protocolo de extração, amplificação e purificação, previamente à TGGE na qual colocamos também amostrais do presente experimento, sob o gradiente de temperatura para elas estabelecido. E, para nossa surpresa, o resultado obtido com as amostras de camundongos foi extremamente satisfatório, porém, as do experimento não (Figura 14)

As amostras de camundongos foram posteriormente submetidas à técnica de sequenciamento genético, em gentil parceria estabelecida com nossos colaboradores de instituição, e os resultados corroboraram aquilo que se esperava, tendo-se em vista o resultado da técnica de TGGE. Sendo assim, excluímos a possibilidade de algum erro técnico nos passos que antecedem a TGGE, bem como na realização da própria técnica.

Ressaltamos que a TGGE e técnicas similares são ainda ferramentas pouco exploradas e de grande potencial para avaliação de microbiota. Seu melhor conhecimento e associação com outras técnicas moleculares com a PCR e o sequenciamento genético são de grande valia para o estudo das alterações temporais, nutricionais e hospedeiro-específicas da microbiota.

Até o momento de conclusão desse estudo não encontramos em literatura trabalhos que se utilizassem da TGGE pro estudo da microbiota da aves, provando o pioneirismo do nosso intento. Por isso, esperamos numa

oportunidade vindoura, mais experientes e com mais tempo hábil, poder responder as questões levantadas no presente estudo.

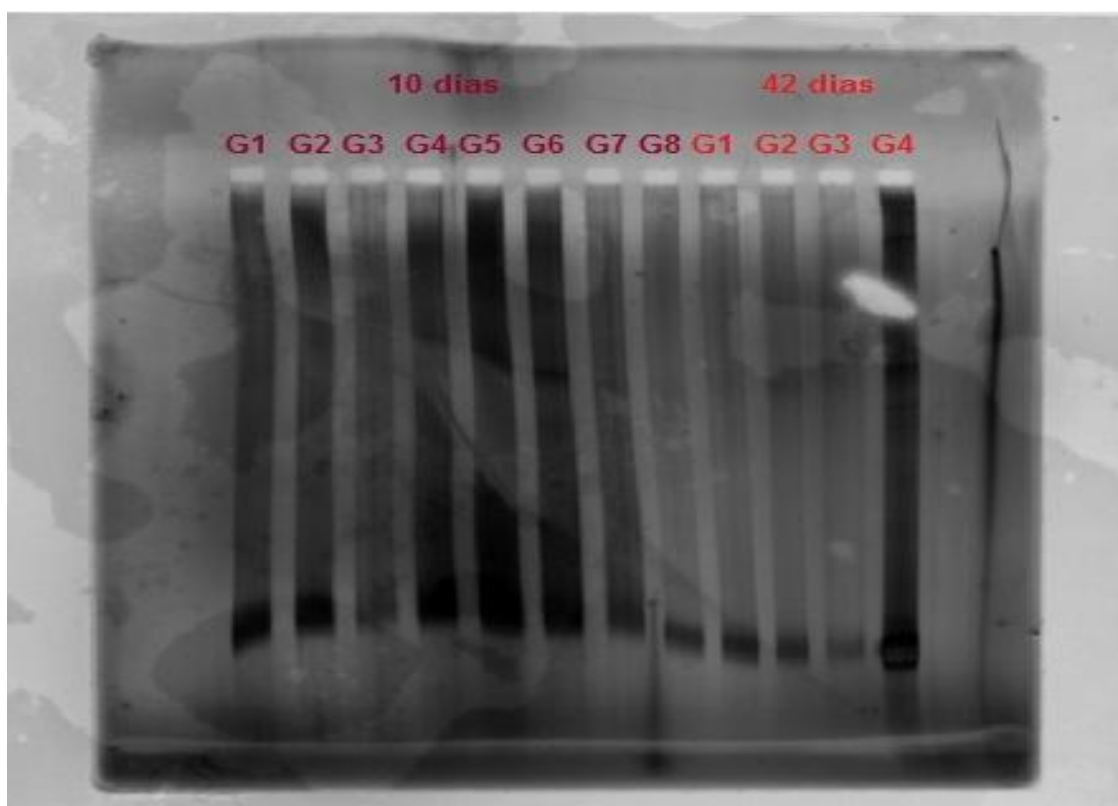


Figura 13 - Gel da técnica de TGGE com as amostras de DNA bacteriano amplificado referente às amostras cecais das aves

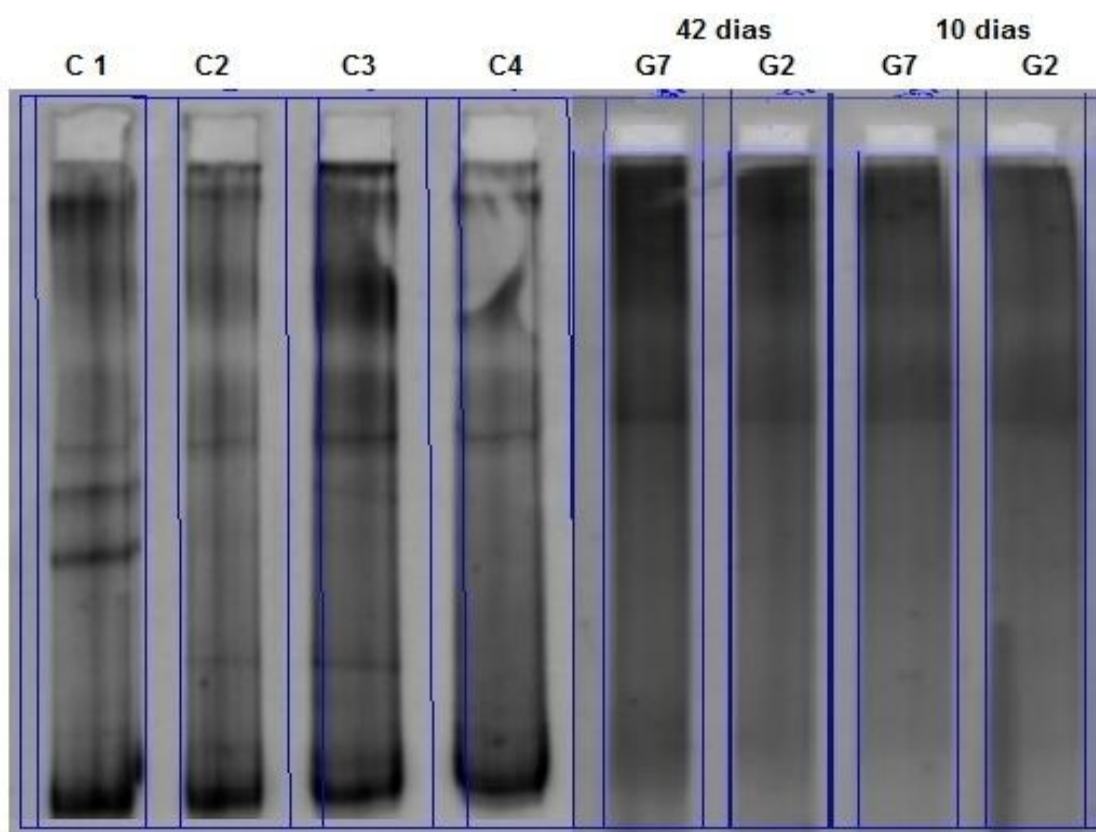


Figura 14 - Gel da técnica de TGGE com as amostras de DNA bacteriano amplificado referente às amostras cecais das aves e dos camundongos, sendo C1= camundongo 1, C2= camundongo 2, C3= camundongo 3 e C4= camundongo 4

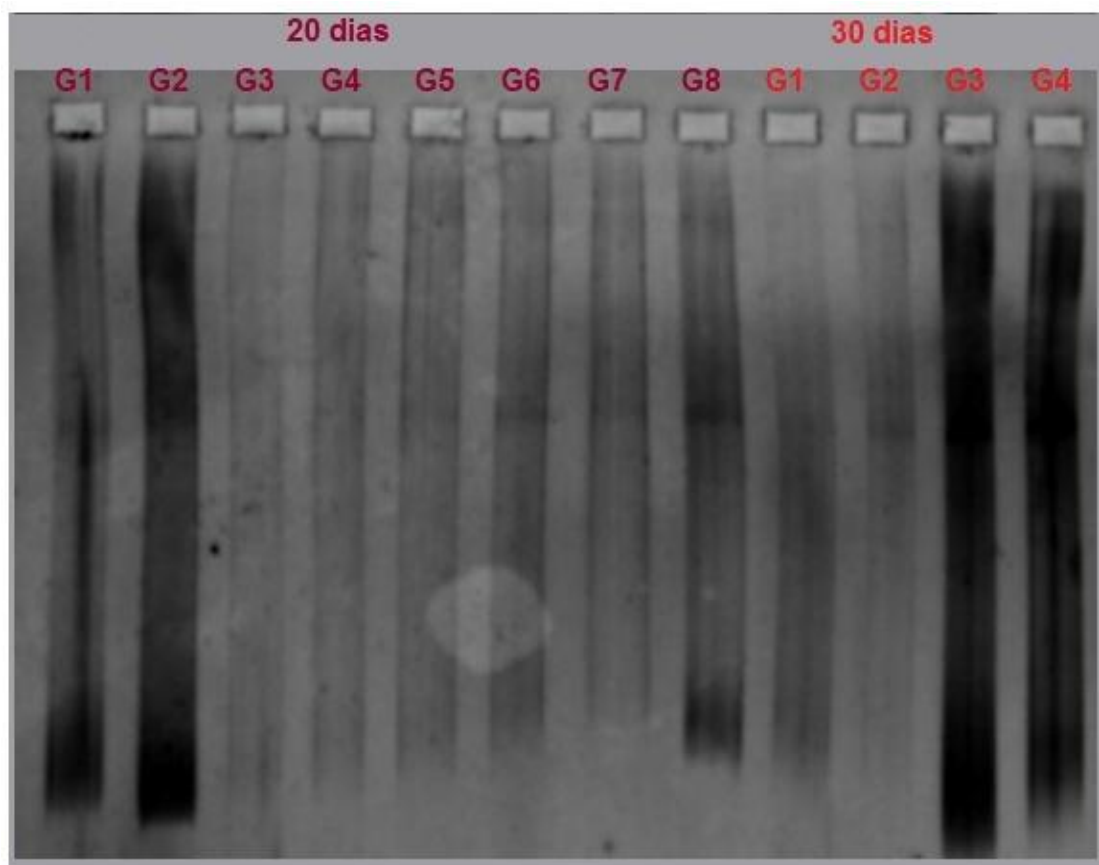


Figura 15 - Gel da técnica de TGGE com as amostras de DNA bacteriano amplificado referente às amostras cecais das aves

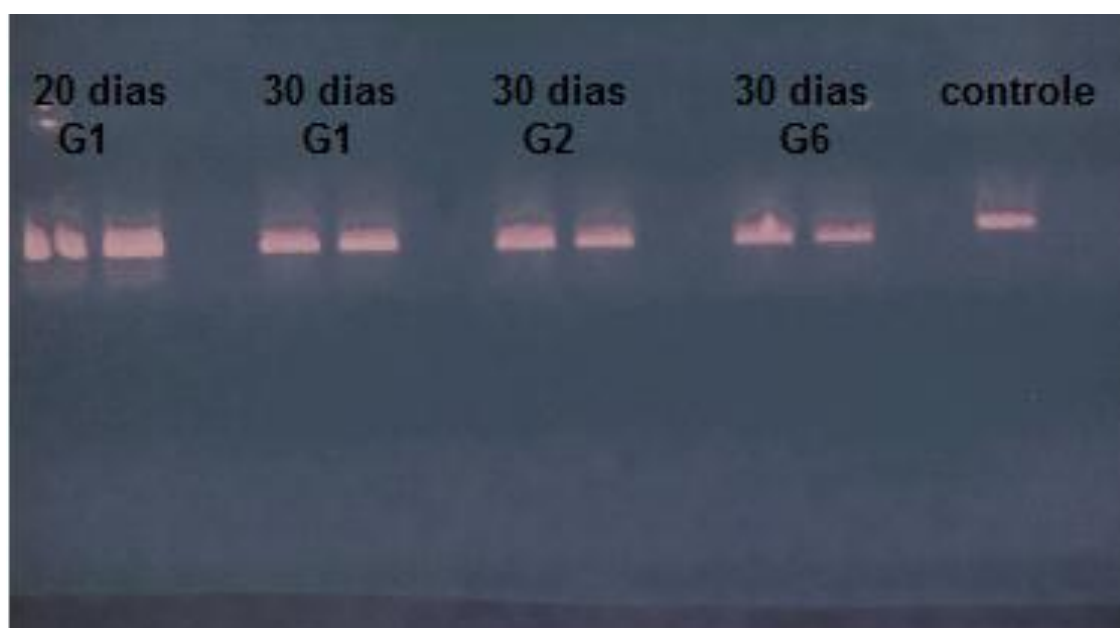


Figura 16 - Gel da técnica de TGGE com as amostras de DNA bacteriano amplificado referente às amostras cecais das aves

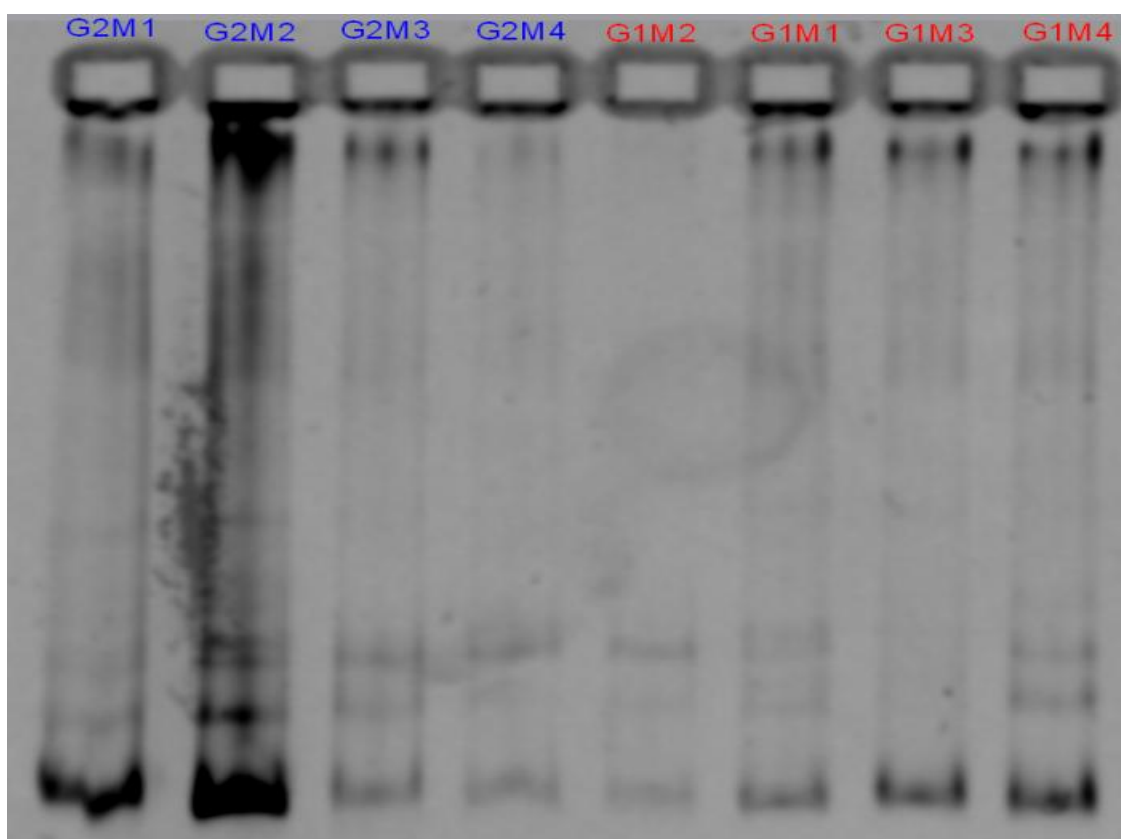


Figura 17 - Gel de técnica de TGGE com as amostras de DNA bacteriano amplificado referente às amostras cecais das aves, repectivamente da esquerda para direita, de G2M1, G2M2, G2M3, G2M4, G1M2, G1M1, G1M3 e G1M4 (sendo M1= 10 dias, M2= 20 dias, M3= 30 dias, M4= 42 dias)

Tabela 6 - Quantificação dos produtos da purificação das amostras cecais dos grupos listados na tabela

Amosta	Quantidade de DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
G2M1	12.10^{-3}
G3M1	12.10^{-3}
G4M1	17.10^{-3}
G5M1	13.10^{-2}
G6M1	1.10^{-2}
G7M1	1.10^{-2}
G8M1	1.10^{-2}
G1M4	1.10^{-2}
G3M4	1.10^{-2}
G4M4	14.10^{-3}

5.7. HISTOPATOLOGIA DE TONSILA CECAL

Os enterócitos as aves do grupo 1 apresentaram-se íntegros ao longo de todo período de criação (Figuras 18, 19 e 21), com exceção dos 30 dias quando apresentaram discreta degeneração (Figura 20). Resultado similar demonstrou o grupo 7, com amostras íntegras aos 10 e 30 dias (Figuras 18 e 20), e amostras com degeneração discreta aos 20 dias (Figura 19) e aos 42 dias (Figura 21) amostras, íntegras, discreta e moderadamente degeneradas.

Assim como os grupos anteriores, as amostras de G3 e G5 também apresentaram-se majoritariamente íntegras com baixo número de amostras discreta e moderadamente degeneradas (Figuras 18, 19, 20 e 21). Como os grupos G1, G3, G5 e G7 não foram desafiados com *Salmonella*, assumimos que a provável fonte de degeneração foram variações nas condições de armazenagem e processamento dos fragmentos intestinais.

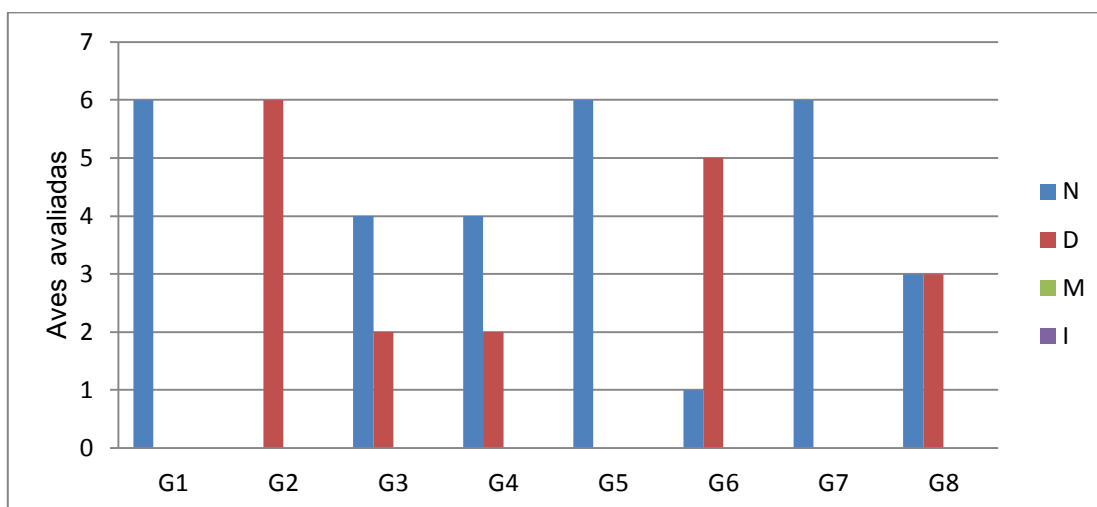


Figura 18 - Nível de alteração histopatológica dos enterócitos que compõem as tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 no aos 10 dias de vida (N= nenhuma, D= discreta, M= moderada, I= intensa).

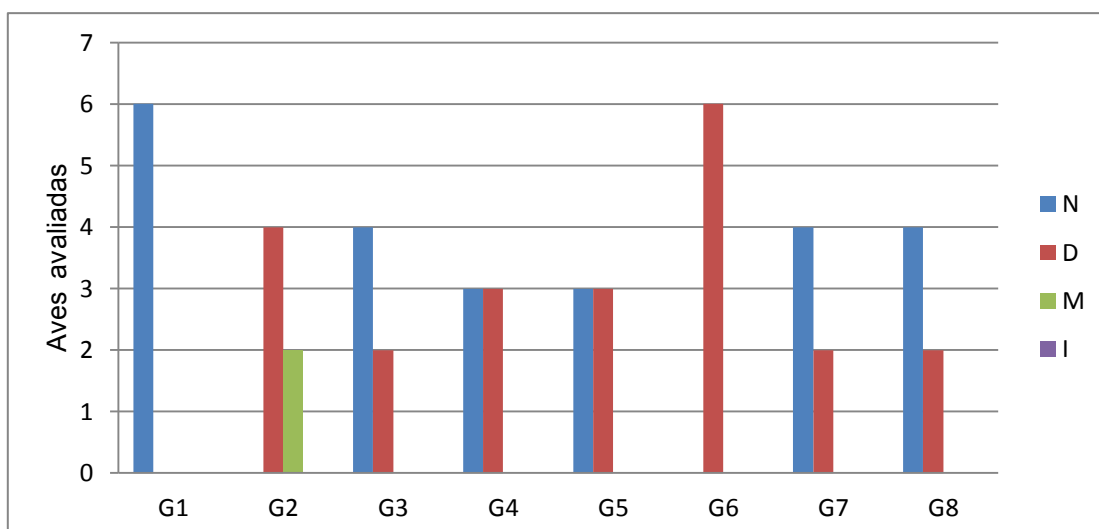


Figura 19 - Nível de alteração histopatológica dos enterócitos que compõem as tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 no aos 20 dias de vida (N= nenhuma, D= discreta, M= moderada, I= intensa).

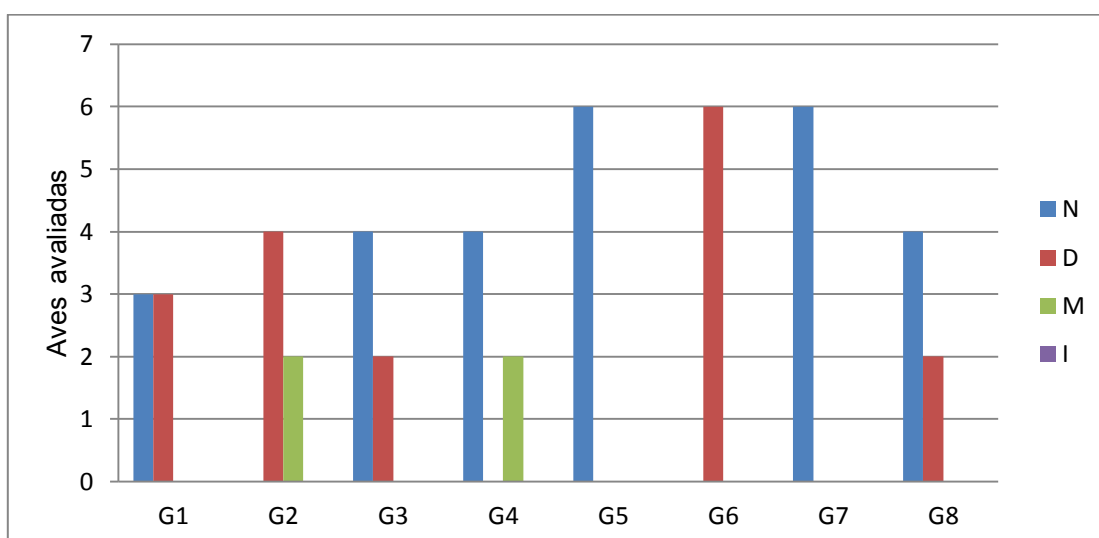


Figura 20 - Nível de alteração histopatológica dos enterócitos que compõem as tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 no aos 30 dias de vida (N= nenhuma, D= discreta, M= moderada, I= intensa).

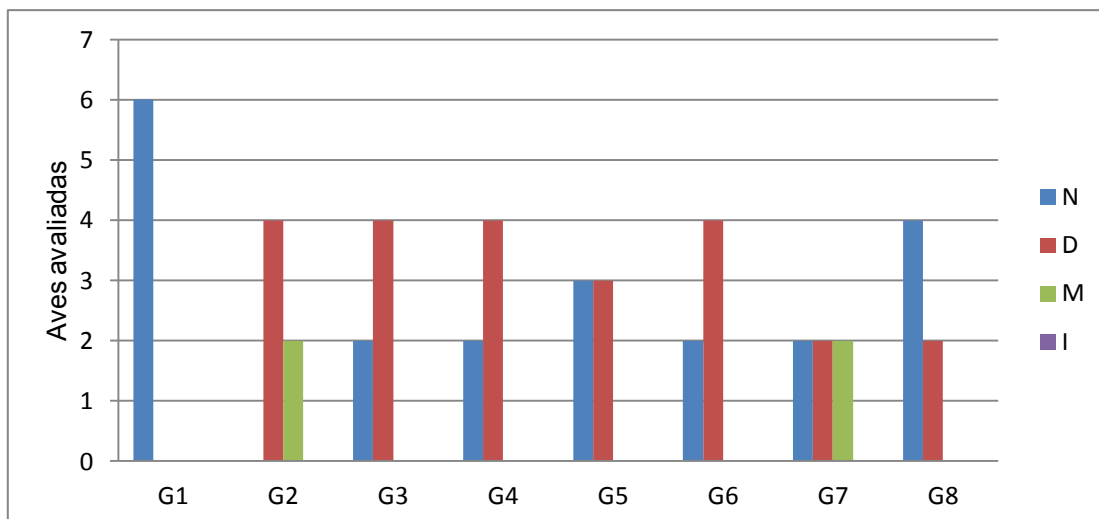


Figura 21 - Nível de alteração histopatológica dos enterócitos que compõem as tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 no aos 42 dias de vida (N= nenhuma, D= discreta, M= moderada, I= intensa).

Avaliamos no G5 a possibilidade da dieta acrescida de ácido causar lesões ao epitélio intestinal, entretanto descartamos a hipótese já que outros estudos (JOHNY et al., 2009; KOLLANOOR-JOHNYY et al., 2011) utilizaram-se da mesma metodologia que nós e não relataram danos ao epitélio intestinal. Ressaltamos também que os resultados entre os grupos não desafiados com SE em relação à amostras discreta e moderadamente degenerada foi similar quando avaliamos os quatro grupos dentro dos mesmos momentos.

Dos grupos desafiados com SE, aos 10 dias notou-se maior alteração da integridade dos enterócitos no G2 seguido do G6, os quais não diferiram estatisticamente (Figura 18). Os outros grupos tratados não diferiram entre si.

Ao longo dos demais três momentos, G2 e G8 demonstraram resultados estáveis com predomínio de amostras discreta e sem alterações, respectivamente (Figuras 18, 19, 20 e 21).

O tratamento com *Lactobacillus* (G8) demonstrou-se mais eficiente na manutenção da integridade intestinal, com resultados similares e sem diferença estatística ao longo dos quatro momentos (Figuras 18, 19, 29 e 21). Na sequência, maior estabilidade e menor alteração foram apresentadas por G4 e G6, respectivamente.

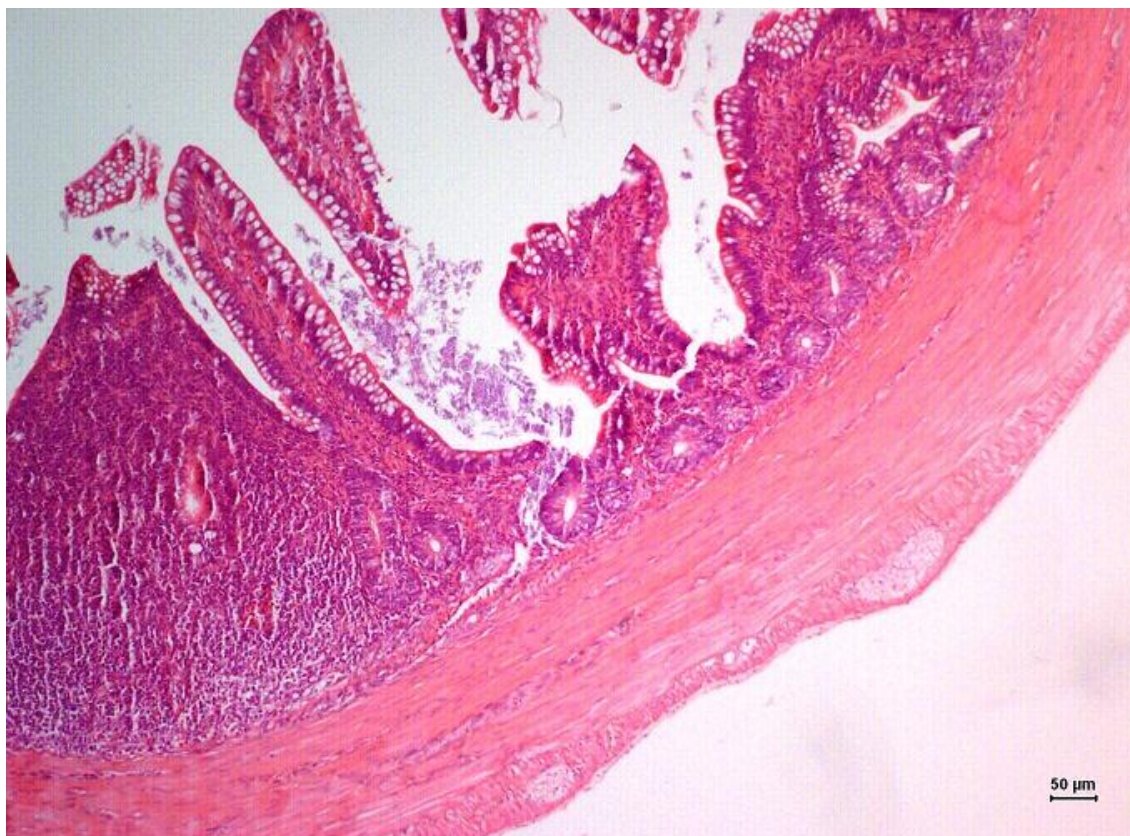


Figura 22 – Fotomicrografia de um corte de tonsila cecal de um exemplar de G2 aos 20 dias ressaltando as alterações nos enterócitos (20x).

Quando mencionamos o critério reação das tonsilas cecais nos referimos à proliferação celular intrínseca aos folículos linfóides e do aumento do número dos folículos que compõem a estrutura do tecido linfoide das tonsilas (GEORGESCU et al., 2007).

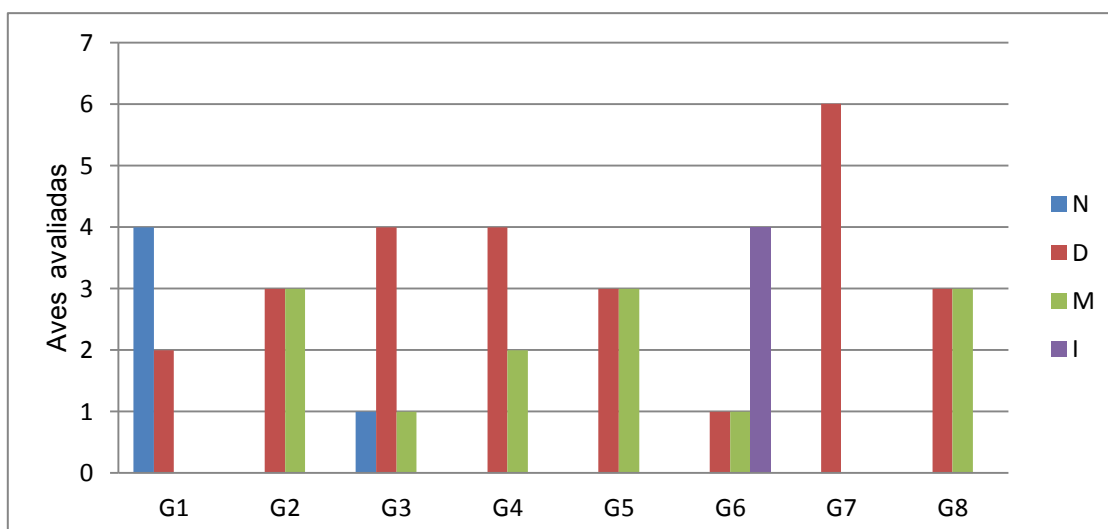


Figura 23- Nível de reatividade das tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 no aos 10 dias de vida (N= nenhuma, D= discreta, M= moderada, I= intensa).

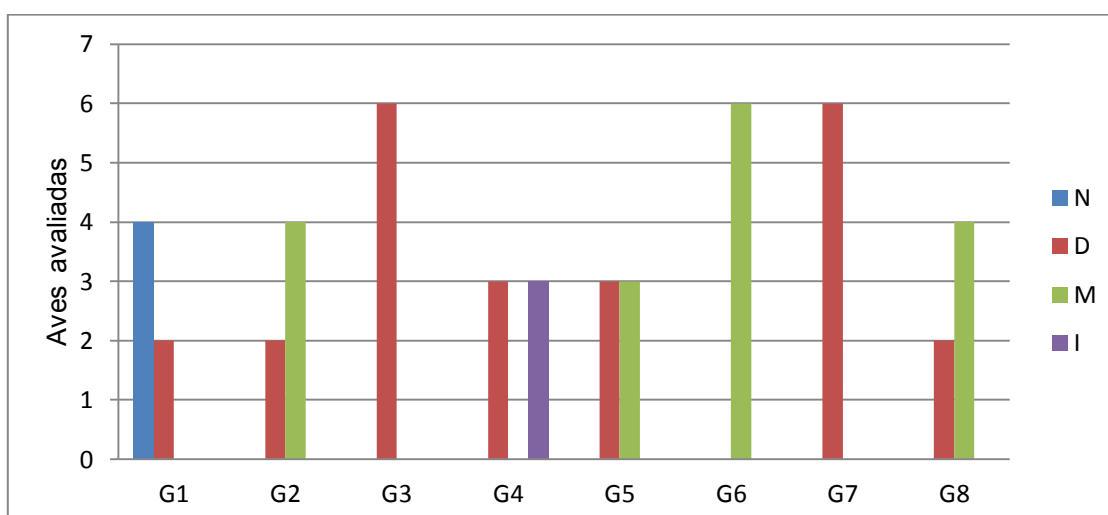


Figura 24 - Nível de reatividade das tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 no aos 20 dias de vida (N= nenhuma, D= discreta, M= moderada, I= intensa).

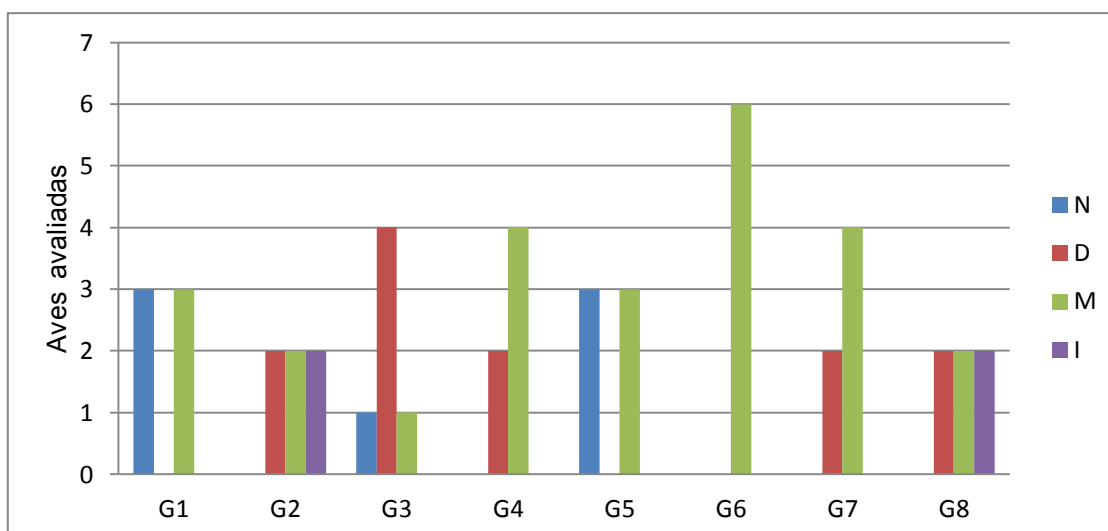


Figura 25 - Nível de reatividade das tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 no aos 30 dias de vida (N= nenhum, D= discreta, M= moderada, I= intensa).

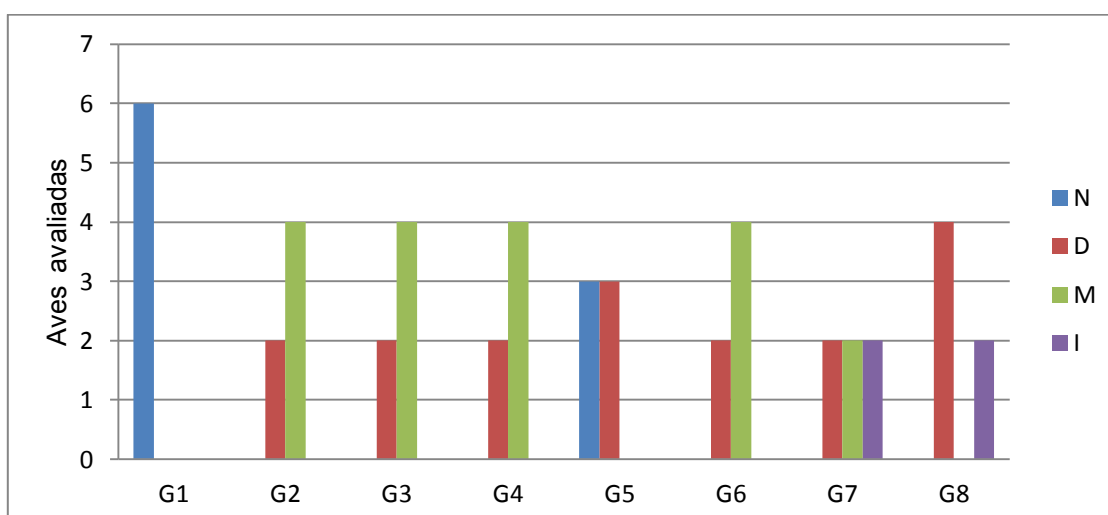


Figura 26 - Nível de reatividade das tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 no aos 42 dias de vida (N= nenhum, D= discreta, M= moderada, I= intensa).

Os grupos que não foram desafiados com SE se mantiveram, majoritariamente, com alteração discreta a moderada (Figuras 22, 23, 24 e 25). Para o G5 cabe citar a capacidade imunomodulatória dos antibióticos (WOO et al., 1999), todavia ainda não descrita especificamente para o halquinol, mas passível de ter ocorrido, elevando o número de aves com reação moderada

das tonsilas superando G6, seu similar desafiado, como correu aos 10 dias (Figura 23).

Os resultados mais uniformes entre os grupos desafiados e seus pares ocorreram em G7 e G8 que só diferiram estatisticamente aos 30 dias (Figura 25), com G8 apresentando alterações intensas e inesperadamente G7 apresentando mais alterações moderadas que G8, muito provavelmente pela capacidade imunomodulatória do *pool* de *Lactobacillus* (BAR-SHIRA e FRIEDMAN, 2006), cuja administração contínua ao longo do período de criação afetou mais a dinâmica da população linfocitária das tonsilas do que a administração pontual do desafio com SE.

A maior diferença ocorreu entre os controles, sendo que as amostras de G1 apresentaram mais frequentemente amostras sem alteração e discretamente alteradas, enquanto seu similar desafiado G2 apresentou amostras com alterações predominantemente moderadas (Figuras 23, 24, 25, e 26).

O grupo G1 foi o único cujas aves apresentaram a maioria das amostras enquadradas no critério sem alterações, que só foi encontrado em G3 aos 10 e 30 dias, e em G5 aos 30 e 42 dias (Tabela 2), mesmo assim com baixa incidência. Provavelmente deve-se à capacidade de influência do sistema imune de todos os tratamentos aqui testados (SANCHEZ et al., 2010; DESBOIS et al., 2009; GASKINS et al., 2002), já comprovada também pelas avaliações anteriores no presente estudo.

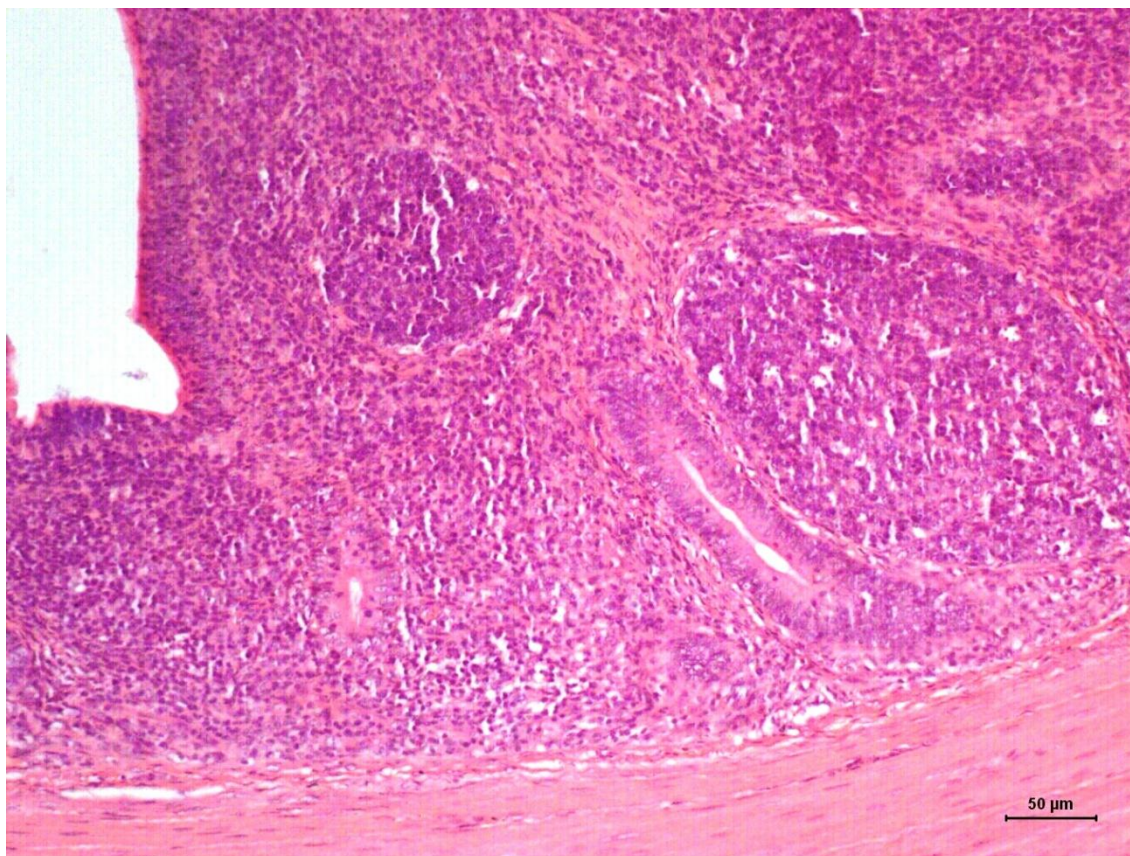


Foto 27 - Fotomicrografia de um corte de tonsila cecal de um exemplar de G8 aos 30 dias destacando nódulos linfóides marcando a reatividade das tonsilas cecais (20x).

A congestão vascular foi o critério menos proeminente dos avaliados. Em todos os grupos durante os quatro momentos os resultados variaram de ausente a discreta (Figuras 28, 29, 30 e 31).

Mesmo assim, quando comparamos os grupos contaminados com seus pares desafiados avaliamos em todos os momentos uma diferença significativa ou pelo menos uma tendência dos grupos desafiados apresentarem maior número de amostras com congestão discreta (Tabela 3). Resultado congruente com o potencial inflamatório dos sorotipos tifóides de *Salmonella*, com destaque para SE, devido à indução da produção de citocinas como iNOS, CXCL1 e 2 (SETTA et al., 2012).

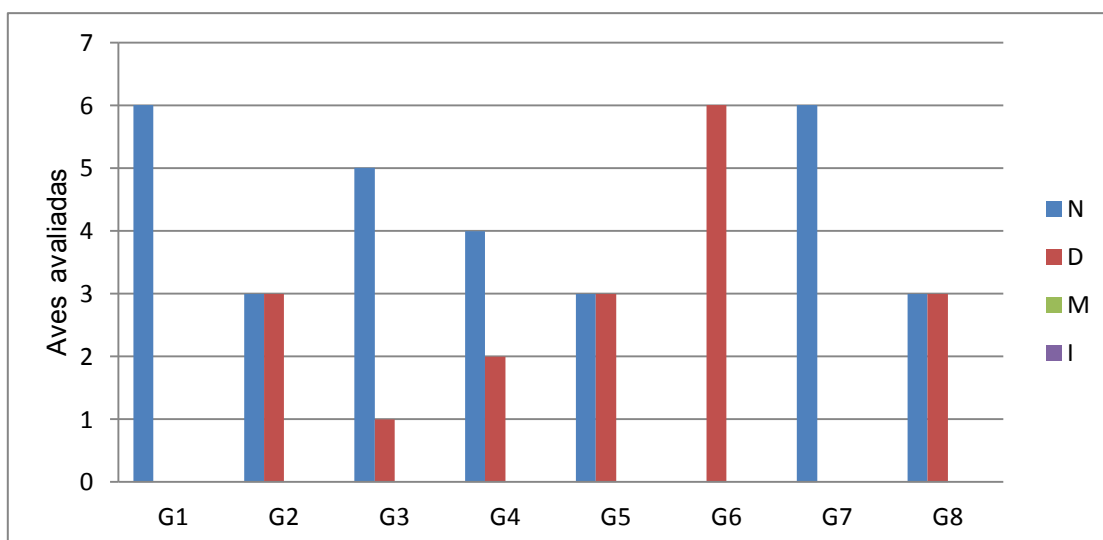


Figura 28 - Nível congestão vascular nas tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 no aos 10 dias de vida (N= nenhuma, D= discreta, M= moderada, I= intensa).

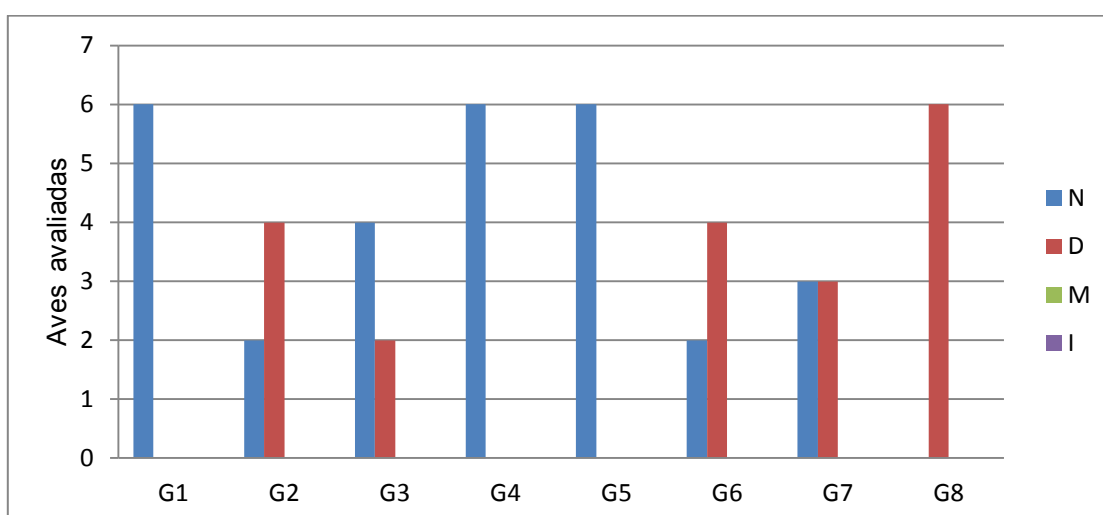


Figura 29 - Nível congestão vascular nas tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 no aos 20 dias de vida (N= nenhuma, D= discreta , M= moderada , I= intensa).

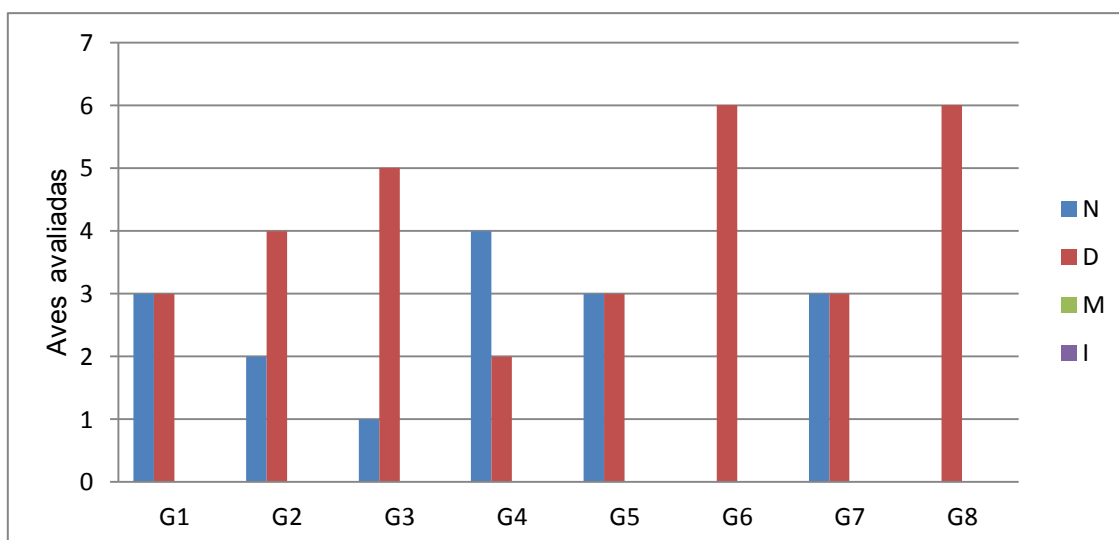


Figura 30 - Nível congestão vascular nas tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 no aos 30 dias de vida (N= nenhum , D= discreta , M= moderada , I= intensa).

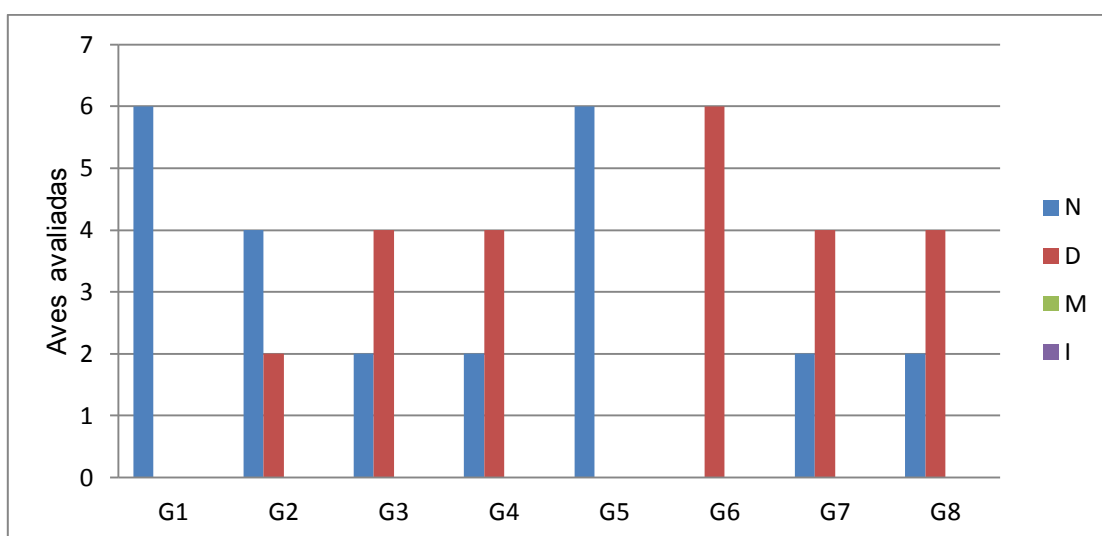


Figura 31 - Nível congestão vascular nas tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 no aos 42 dias de vida (N= nenhum alteração, D= discreta , M= moderada , I= intensa).

Observamos também uma tendência prevalente do aumento da congestão vascular ao longo do período de criação (Figuras 26, 27, 28 e 29), o que provavelmente se deve mais ao desenvolvimento tecidual e da microbiota que perduram até a quarta semana de vida, do que ao desafio com SE cujas

alterações teciduais inflamatórias são breves e mais visíveis até 48 a 72h (HOLT, 2011; IVO, 2010).

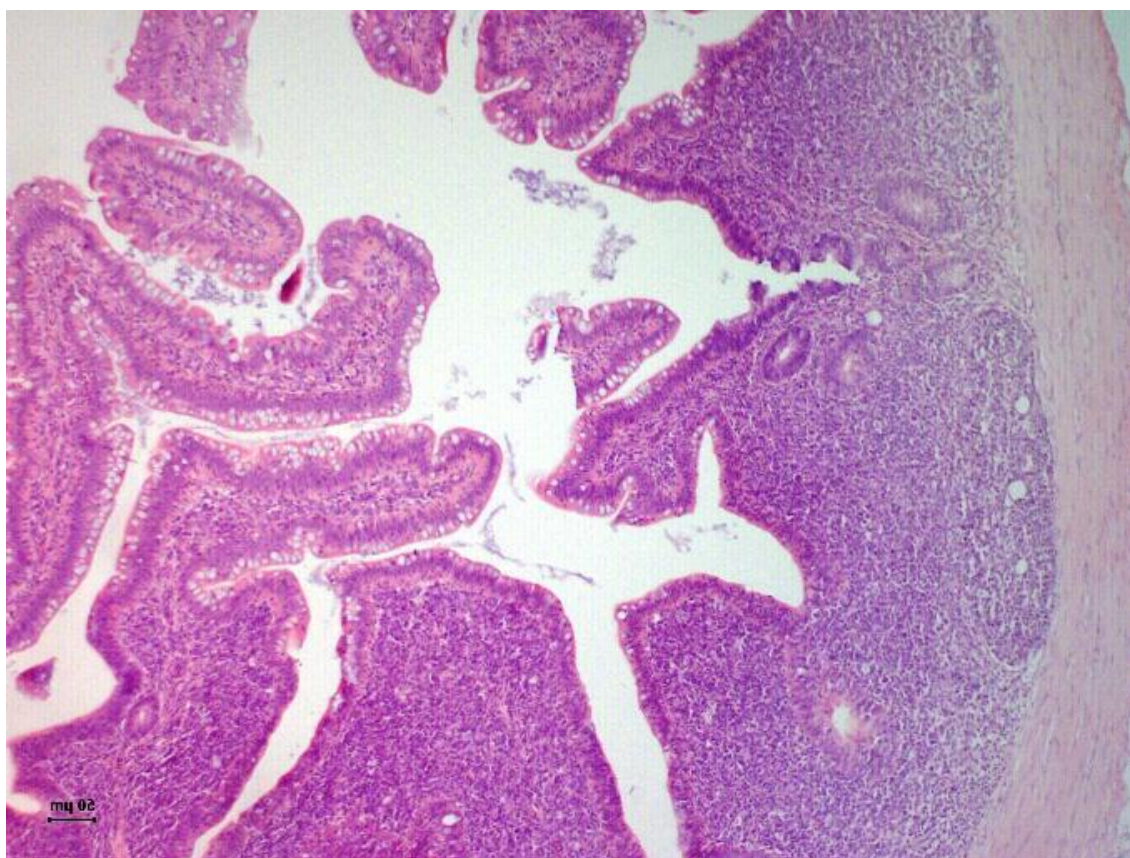


Figura 32 - Fotomicrografia de um corte de tonsila cecal de um exemplar de G5 aos 10 dias demonstra áreas de discreta congestão (10x).

A respeito da quantidade de bactérias observada nas tonsilas cecais, o resultado foi bastante homogêneo entre os grupos e nos quatro momentos avaliados (Figuras 30, 31, 32 e 33). Isto porque alterações na microbiota ao longo da vida das aves são mais qualitativas do que quantitativas (Knarreborg *et al.*, 2002; McCracken *et al.*, 2001), o que explica a quantidade ter se mantido estável.

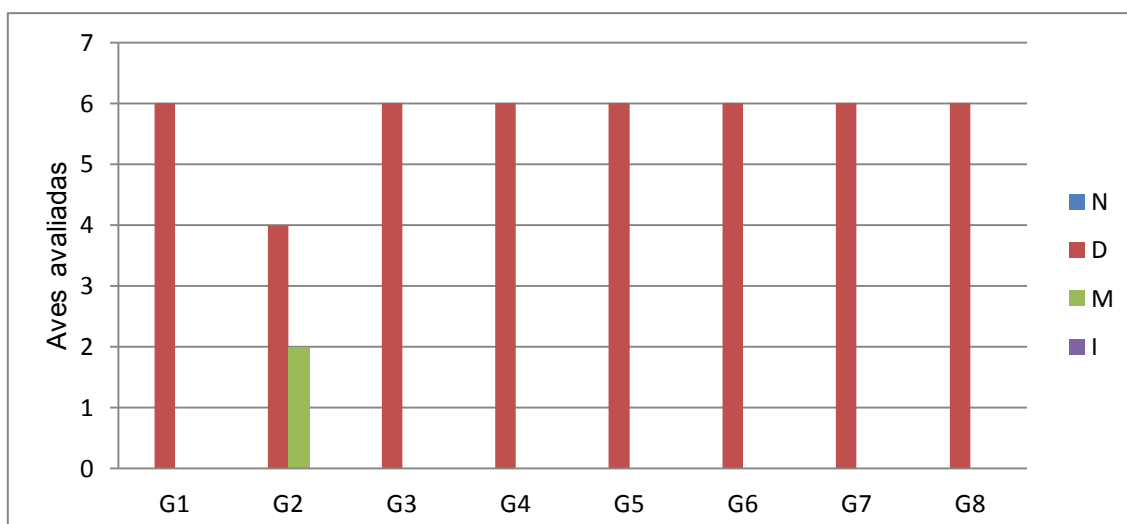


Figura 33 – Presença de bactérias nas tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 aos 10, 20, 30 e 42 dias de vida (N= nenhuma alteração, D= discreta, M= moderada, I= intensa).

G2 cujas amostras apresentaram quantidade moderada em alguns exemplares durante todo o período avaliado (Figura 33). A isso atribuímos a presença de SE administrada como desafio e presente no ceco das aves deste grupo até os 42 dias, conforme expostos pela contagem bacteriana ou, menos provavelmente à variação individual entre as aves, uma vez que o número de aves por grupo em cada momento foi diminuto.

Provavelmente nos outros grupos essa variação não ocorreu devido à ação dos tratamentos que precocemente estabilizaram a microbiota das aves, conforme demonstrados pelos padrões de IL-8 e IgM exposto previamente, e também impediram a permanência e multiplicação exacerbada de SE, conforme demonstrado pela contagem de SE no ceco.

Ao avaliar o infiltrado leucocitário, visualizamos nos capilares, além de hemácias linfócitos em processo de diapedese. Essa observação, somada às figuras de mitose sugerem que a população celular compõe-se tanto de células oriundas de proliferação *in situ* quanto por células que migraram via corrente sanguínea. O processo de diapedese também foi observado por del MORAL et al. (1998).

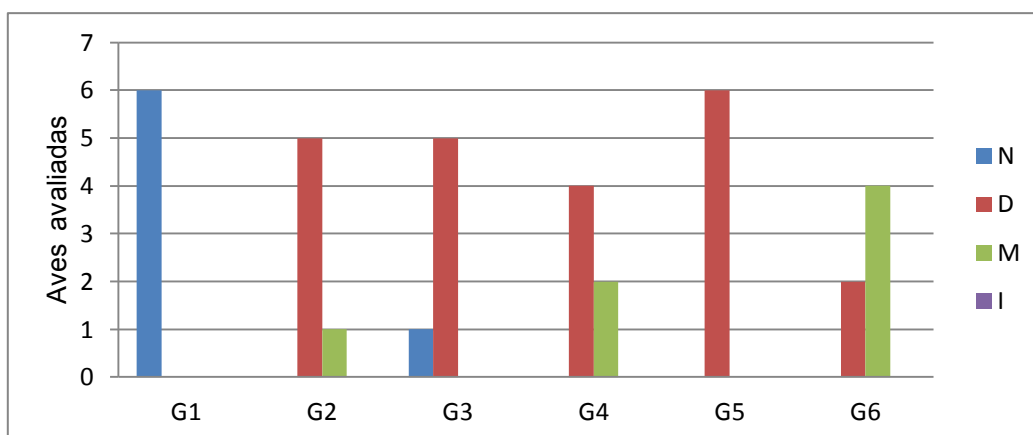


Figura 34 – Presença de infiltrado leucocitário nas tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 aos 10 dias de vida (N= nenhum alteração, D= discreta, M= moderada, I= intensa).

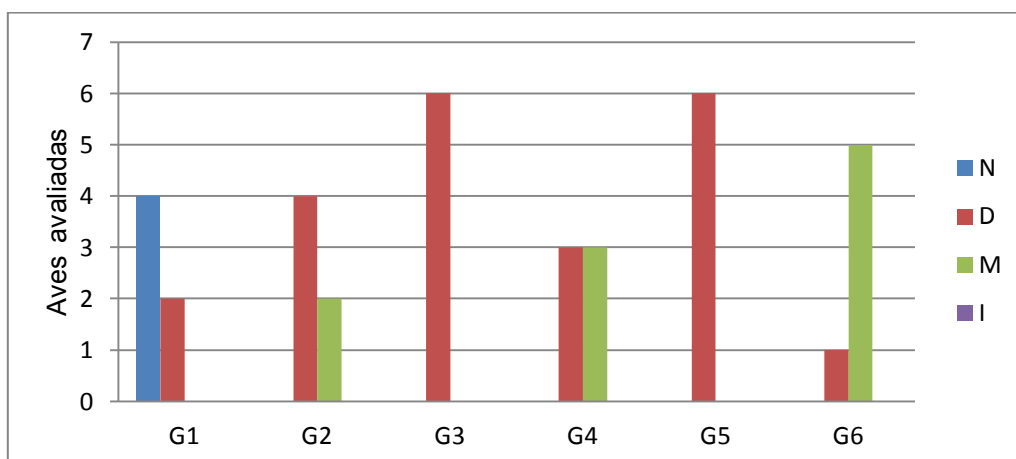


Figura 35 – Presença de infiltrado leucocitário nas tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 aos 20 dias de vida (N= nenhum alteração, D= discreta, M= moderada, I= intensa).

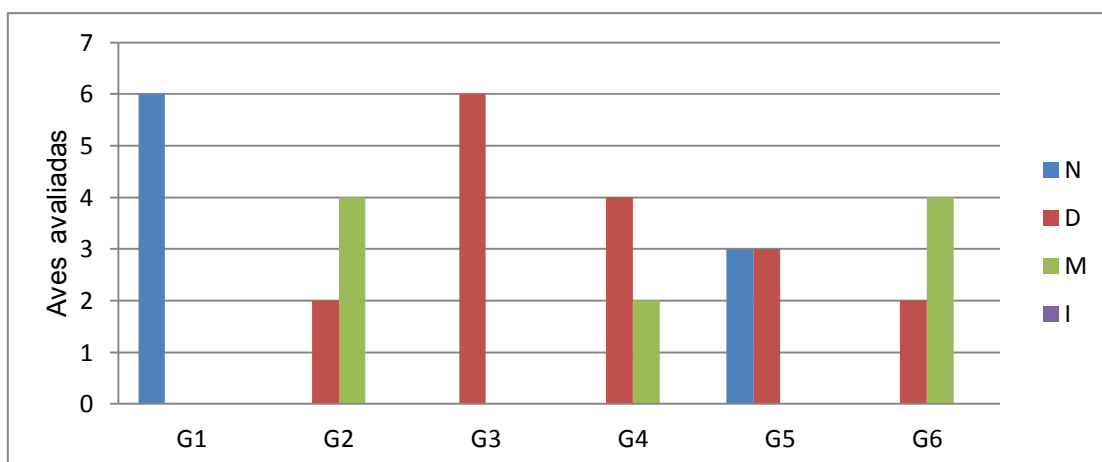


Figura 36 – Presença de infiltrado leucocitário nas tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 aos 30 dias de vida (N= nenhum alteração, D= discreta, M= moderada, I= intensa).

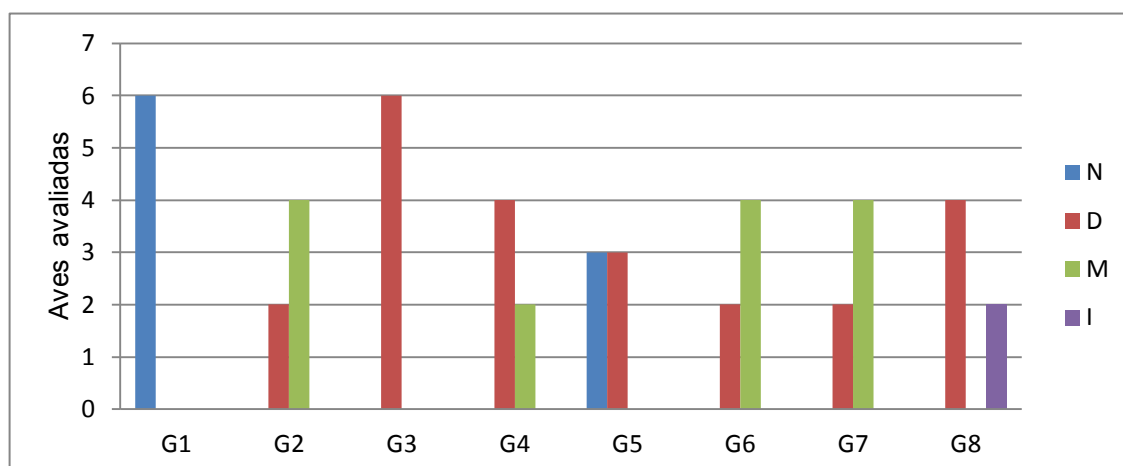


Figura 37 – Presença de infiltrado leucocitário nas tonsilas cecais das aves avaliadas nos grupos 1 a 8 aos 42 dias de vida (N= nenhum alteração, D= discreta, M= moderada, I= intensa).

Nesse quesito, foram mais uma vez os controles, G1 e G2, que demonstram maior variação entre si e nos quatro momentos de coleta (Figuras 34, 35, 36 e 37).

Logo aos 10 dias as amostras de G1 apresentaram ausência de infiltrado leucocitário, enquanto a grande maioria de G2 apresentou infiltrado discreto a moderado (Figura 34). Esse comportamento se estendeu pelos outros três momentos, com as amostras de G1 variando entre ausência de

infiltrado e infiltrado discreto, e as amostras de G2 entre infiltrado discreto e moderado (Figuras 35, 36 e 37).

Como não havia outro agente capaz de induzir esse aumento do infiltrado leucocitário nas aves, consideramos obviamente o desafio e presença de SE nas aves de G2 a causa do mesmo, haja visto essa capacidade já estar previamente descrita (CHAPPEL *et al.*, 2009; BERNDT e METHNER, 2004).

Para as amostras de G1 nas quais identificamos infiltrado discreto, lembramos que a estrutura da tonsila cecal é composta de folículos e leucócitos infiltrados no tecido (KITAGAWA *et al.*, 1998)

Em G5 e G6, aos 30 e 42 dias, houve uma tendência do primeiro apresentar maior número de amostras com infiltrado moderado que seu correspondente desafiado, o qual apresentou mais amostras com infiltrado ausente e discreto (Figuras 36 e 37). O mesmo ocorreu para G7 e seu correspondente G8, aos 10, 20 e 42 dias (Figuras 34, 35 e 37), e para G3 e seu correspondente G4 aos 30 dias (Figura 36).

Atribuímos a discreta diferença apresentada pelos grupos e seus correspondentes desafiados à influência ao sistema imune, seja ela direta ou indireta, causada pelas alterações na deita. Além disso, como já dito a priori, a presença de linfócitos nas tonsilas podem indicar tanto o desenvolvimento do órgão imune quanto uma resposta à SE administrada como desafio. Diferenciar essas duas possibilidades exigiria o uso de técnicas mais específicas como a imunohistoquímica, a qual permite diferenciar as subpopulações de linfócitos, por consequência suas funções, e então supor o motivo de sua presença no tecido.

Podemos ainda, observando os dados de contagem cecal de SE e correlacionando-os com o infiltrado leucocitário, observar que a eliminação do patógeno não está temporalmente ligada à eliminação do patógeno, haja vista que G4 aos 30 dias não apresentava mais contagem de SE no ceco (Figura 3), mas o infiltrado leucocitário manteve-se de discreto a moderado até os 42 dias (Figura 37). O mesmo ocorreu para G6 e G8, cuja eliminação se deu aos 42 dias (Figura 3), mas o infiltrado manteve-se presente (Figura 37).

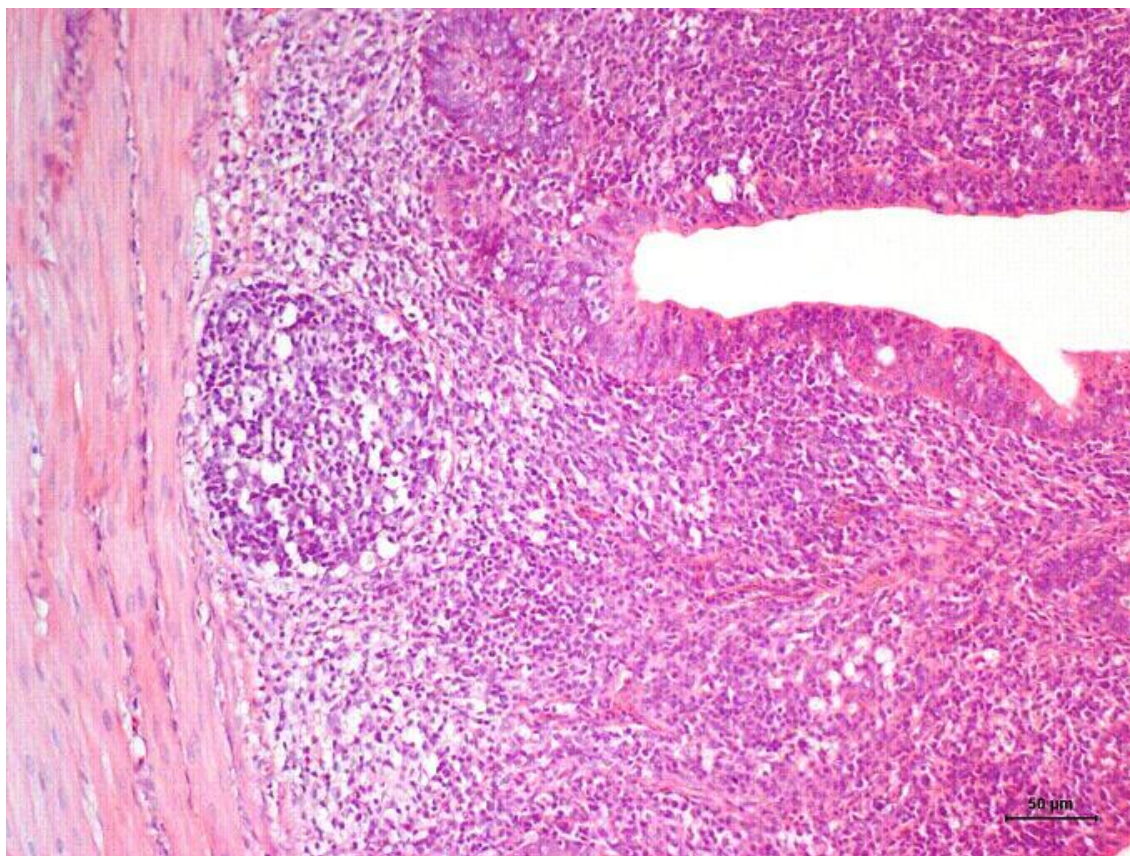


Figura 38 – Fotomicrografia de um corte de tonsila cecal de um exemplar de G7 aos 42 dias ressaltando o infiltrado leucocitário na vilosidade dos enterócitos; numerosas células linfóides, bem como células linfóides germinativas (10x).

6. CONCLUSÕES

No presente trabalho não obtivemos sucesso na reprodução do método TGGE, e também não foi possível definir se isso se deve à baixa reprodutibilidade do método ou algum fator intrínseco às amostras. Assim, não podemos especular sobre a relação da microbiota cecal com os outros dados gerados.

Todos os tratamentos foram eficazes em reduzir a contagem bacteriana de SE no ceco das aves, quando comparados ao grupo controle, entretanto, o ácido caprílico e o halquinol demonstraram ser capazes de eliminar a SE mais precocemente, seguido do tratamento com *Lactobacillus*.

Os dados de IgM e IL-8 gerados ao longo do período de vida das aves nos permitiram concluir que a concentração dos mesmos no soro e intestino das aves relacionam-se ao desenvolvimento imune local e sistêmico e também

morfológico intestinal, todavia não houve diferença significativa entre os tratamentos, nem destes com seus respectivos desafiados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA (Associação Brasileira de Proteína Animal). Relatório Anual 2014. Disponível em:

<<http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842.pdf>>. Acesso em: 02 outubro. 2014.

AHIR, V. B., SINGH, K. M., TRIPATHI, A. K., MATHAKIYA, R. A., JAKHESARA, S. J., KORINGA, P. G., JOSHI, C. G. Study of bacterial diversity in poultry gut using denaturing gradient gel electrophoresis. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v. 2, n. 3, p. 227-232, 2012.

AKKERMANS, A. D., VAN ELSAS, J. D., DE BRUIJN, F. J. **Mol. Microb. man.** Dordrecht: Kluwer academic publishers, 1995. P. 188.

AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNI, Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. **Poult. Sci.** v. 83, n. 7, p. 1093-1098, 2004.

ANTUNES, A.; RAINEY, F. A.; NOBRE, M. F.; SCHUMANN, P.; FERREIRA, A. M.; RAMOS, A.; SANTOS, H. *Leuconostoc ficulneum* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from a ripe fig, and reclassification of *Lactobacillus fructosus* as *Leuconostoc fructosum* comb. nov. **IJ of syst. Evol. Microbial.**, v. 52, n. 2, p. 647-655, 2002.

AKINLEYE, S.B., E.A. IYAYI., K.D. AFOLABI. The Performance, Haematology and Carcass Traits of Broilers as Affected by Diets Supplemented with or Without Biomin a Natural Growth Promoter. **W. J. Agr. Sci.**, v.4, n.4, p.467-470, 2008.

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. **Ci. Anim. Bras.** v. 10, n. 2, p. 568-573, 2009.

APAJALAHTI, J.; RINTTILÄ, T.; KETTUNEN, A. Does the composition of intestinal microbiota determine or reflect feed conversion efficiency?. In: **Proceedings of the 23rd Australian Poultry Science Symposium**. 2012. p. 32-39.

ASPERILLA, Marianito O.; SMEGO, Raymond A.; SCOTT, Louis Keith. Quinolone antibiotics in the treatment of *Salmonella* infections. **Rev. Infec. Dis.**, v. 12, n. 5, p. 873-889, 1990.

APAJALAHTI, J.; KETTUNEN, A.; GRAHAM, H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. **W. Poult. Sci. J.**, v. 60, n. 02, p. 223-232, 2004.

BÄCKHED, F.; DING, H.; WANG, T.; HOOPER, L. V.; KOH, G. Y.; NAGY, A.; GORDON, J. I. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Am. J. Clin. Nut.**, v. 101, n. 44, p. 15718- 15723, 2004.

BALEVI, T.; UCAN, U. S.; COŞUN, B.; KURTOĞU, V.; CETİNGÜL, I. S. Effect of dietary probiotic on performance and humoral immune response in layer hens. **Brit. Poult. Sci.**, v. 42, n. 4, p. 456-461, 2001.

BARBAZAN, P.; PALABODEEWAT, S.; NITATPATTANA, N.; GONZALEZ, J. P. Detection of host virus-reactive antibodies in blood meals of naturally engorged mosquitoes. **Vect-B. Zoon. Dis.**, v. 9, n. 1, p. 103-108, 2009.

BARBÉS, M. C. Microbiota and gastrointestinal system. **Revista española de enfermedades digestivas: organo oficial de la Sociedad Española de Patología Digestiva**, v. 93, n. 5, p. 325, 2001.

BARNES, H. J.; GROSS, W. B. Colibacillosis. In: ALEXANDER, D. J.; CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; MCDOUGALD, L. R. **Dis. Poult.** Ames: Iowa State University Press, 1997, p. 131–142.

BARNES, E. M. The intestinal microflora of poultry and game birds during life and after storage. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 46, n. 3, p. 407–419. 1979.

BARROW, P. A. ELISAs and the serological analysis of Salmonella infections in poultry: a review. **Epidemiol. Infect.**, v. 109, n. 03, p. 361–369, 1992.

BARKER, K. A.; HAMPE, A.; STOECKLE, M. Y.; HANAFUSA, H. Transformation-associated cytokine 9E3/CEF4 is chemotactic for chicken peripheral blood mononuclear cells. **J. of Virol.**, v. 67, n. 6, p.3528–3533, 1993.

BAR-SHIRA, E.; FRIEDMAN, A. Development and adaptations of innate immunity in the gastrointestinal tract of the newly hatched chick. **Dev. Comp. Immunol.** v. 30, n. 10, p. 930–941, 2006.

BEACHEY, E. H. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. **J. Infect. Dis.**, v. 143, n. 3, p. 325–345, 1981.

Beal, R. K.; Wigley, P.; Powers, C.; Hulme, S. D.; Barrow, P. A.; Smith, A. L. Age at primary infection with Salmonella enterica serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and subsequent immunity to re-challenge. **Vet. Immunol immunopathol.**, v. 100, n. 3, p. 151–164, 2004.

BEFUS, A. D.; JOHNSTON, N.; LESLIE, G. A.; BIENENSTOCK, J. Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny, and some functional characteristics of Peyer's patches. **J. Immunol.**, v. 125, n. 6, p. 2626–2632, 1980.

BEIER, S., WITZEL, K. P., MARXSEN, J. Bacterial community composition in Central European running waters examined by temperature gradient gel

electrophoresis and sequence analysis of 16S rRNA genes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, n. 1, p. 188–199, 2008.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses. In: MACARI, M.; JÚNIOR, A. B. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, p.435-456, 2009.

BERCHIERI, A.; FERNANDES, S. A.; IRINO, K.; QUINTANA, J. L.; SANTOS, A. J. Salmonella in poultry feeds in Brazil. **Rev. Microbiol.**, v. 24, p. 22-25, 1993.

BERGSSON, G.; STEINGRIMSSON, O.; THORMAR, H. *In vitro* susceptibilities of Neisseria gonorrhoeae to fatty acids and monoglycerides. **Antimicrob. Agents Ch.**, v. 43, p. 2790–2792, 1999.

BERLAND, R.; WORTIS, H. H. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, n. 1, p.253–300, 2002.

BERTECHINI, A. G. **Nutrição de monogástricos**. Lavras: UFLA, 2006. 301p.

BIANCHI, M. A.; DEL RIO, D.; PELLEGRINI, N.; SANSEBASTIANO, G.; NEVIANI, E.; BRIGHENTI, F. A fluorescence-based method for the detection of adhesive properties of lactic acid bacteria to Caco-2 cells. **Lett. App. Microbial.**, v. 39, n. 3, p. 301-305, 2004.

BIASUCCI, G.; RUBINI, M.; RIBONI, S.; MORELLI, L.; BESSI, E.; RETETANGOS, C. Mode of delivery affects the bacterial community in newborn gut. **Early Human Develop.**, v. 86, n. 1, p. S13-S15, 2010.

BJERRUM, L.; ENGBERG, R. M.; LESER, T. D.; JENSEN, B. B.; FINSTER, K.; PEDERSEN, K. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. **Poult. Sci.**, v. 85, n. 7, p. 1151-1164, 2006.

BJÖRKSTÉN, B. The gut microbiota: a complex ecosystem. **Clin. Exp. Allergy**, v. 36, n. 10, p. 1215-1217, 2006.

BLUM, S.; RENIERO, R.; SCHIFFRIN, E. J.; CRITTENDEN, R.; MATTILDA-SANDHOLM, T.; OUWEHAND, A.C., SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. **Trends Food Sci.Techn.**, v. 10, p. 405–410, 1999.

BORGES, S. A.; MAIORKA, A.; SILVA, A. V.F. Fisiologia do estresse calórico e a utilização de eletrólitos em frangos de corte. **Ciência Rural**, set/out., v. 33, n.5, p. 975 – 981, 2003.

BOUZAINÉ, T.; DAUPHIN, R.D.; THONART, P.; URDACI, M.C.; HAMDÍ, M. Adherence and colonization properties of *Lactobacillus rhamnosus* TB1, a broiler chicken isolate. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 40, n. 5, p. 391–396, 2005.

BOYLE, E. C.; BISHOP, J. L.; GRASSL, G. A.; FINLAY, B. B. Salmonella: from pathogenesis to therapeutics. **J. Bacteriol.**, v. 189, n. 5, p. 1489-1495, 2007.

CALLAWAY, T. R., DOWD, S. E., WOLCOTT, R. D., SUN, Y., MCREYNOLDS, J. L., EDRINGTON, T. S., NISBET, D. J. Evaluation of the bacterial diversity in cecal contents of laying hens fed various molting diets by using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing. **Poult. Sci.**, v. 88, n. 2, p. 298-302, 2009

CALNEK, B. W. **Diseases of Poultry**. Ames: IA, 1997. p. 81–121.

CARDINALE, E.; PERRIER GROS-CLAUDE, J. D.; RIVOAL, K.; ROSE, V.; TALL, F.; MEAD, G. C.; SALVAT, G. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from humans and broiler chickens in Senegal using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility. **J. app. Microbial.**, v. 99, n. 4, p. 968-977, 2005.

CARDOSO, M. O.; RIBEIRO, A. R.; SANTOS, L. R. D.; PILOTTO, F.; DE MORAES, H. L.; SALLE, C. T. P.; NASCIMENTO, V. P. D. Antibiotic resistance in *Salmonella Enteritidis* isolated from broiler carcasses. **Braz. J. Microbiol.**, v. 37, n. 3, p. 368-371, 2006.

CARDOSO, M. A. B.; FLEMMING, J. S.; FLEMMING, F. F. Utilização do halquinol como promotor de crescimento e coadjuvante no controle da coccidiose em frangos de corte. **Arch. Vet. Sci.**, v. 7, n. 1, 2002.

CHADALAVADA, D. M.; BEVILACQUA, P. C. Analyzing RNA and DNA folding using temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) with application to in vitro selections. **Meth. Enzimol.** v. 468, n. 18, p. 390-406, 2009.

CHANDLER, D. P., BROCKMAN, F. J., FREDRICKSON, J. K. Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. **Mol. Ecol.** v. 6, n. 5, p. 475–482, 1997.

CHARREL, R.N.; de LAMBALLERIE, X. Le virus West Nile, un arbovirus emergent. **Presse Med.**, v. 33, n. 21, p. 1521–1526, 2004.

CHAPMAN, J. D. Probiotics, acidifiers and yeast culture: A place for natural additive in pigs and poultry production, Biotechnology in Feed Industry. Alltech Inc. In: **Proceeding of ALLTECH'S. Seventh Annual Symposium**. TP: Lyons. Nicholasville, Kentucky. 1989. p. 62-77.

CHEN, Y. C.; NAKTHONG, C.; CHEN, T.C. Improvement of laying hen performance by dietary rebiotic chicory oligofructose and inulin. **Intl. J. Poult. Sci.**, v. 4, n. 2, p.170-78, 2005.

COLOE, P. J.; BAGUST, T. J.; IRELAND, L. Development of the normal gastrointestinal microflora of specific pathogen-free chickens. **J. of hygiene.**, v. 92, n. 01, p. 79-87, 1984.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA C. M. Paratífos em geral. In: *Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos*. Rio de Janeiro: MEDSI. 1992, p. 167-174.

COX, N. A.; BAILEY, J. S.; BLANKENSHIP, L. C.; MEINERSMANN, R. J.; STERN, N. J.; MCHAN, F. Research note: Fifty percent colonization dose for *Salmonella typhimurium* administered orally and intracloacally to young broiler chicks. **Poult. Sci.**, v. 69, n. 10, p. 1809-1812, 1990.

CRHANOVA, M.; HRADECKA, H.; FALDYNOVA, M.; MATULOVA, M.; HAVLICKOVA, H.; SISAK, F.; RYCHLIK, I. Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microflora and to *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection. **Infect. Immune.**, v. 79, n. 7, p. 2755-2763, 2011.

CURTIS, M.M.; WAY, S.S. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. **Immunol.**, v. 126, n. 2, p. 177-185, 2009.

DALLOUL, R. A.; LILLEHOJ, H. S.; SHELLEM, T. A.; DOERR, J. A. Intestinal immunomodulation by vitamin A deficiency and *Lactobacillus*-based probiotic in *Eimeria acervulina*-infected broiler chickens. **Avian diseases**, v. 47, n. 4, p. 1313-1320, 2003.

DANA, M. G.; SALMANIAN, A. H.; YAKHCHALI, B.; JAZI, F. R. High folate production by naturally occurring *Lactobacillus* sp. with probiotics potential isolated from dairy products in Ilam and Lorestan provinces of Iran. **Afr. J. Biotechnol**, v. 9, n. 33, 2013.

DEEPIKA, G.; CHARALAMPOPOULOS, D. Surface and adhesion properties of lactobacilli. **Adv. App. Microbiol.**, v. 70, p. 127-152, 2010.

DE LA COCHETIERE, M. F., DURAND, T., LEPAGE, P., BOURREILLE, A., GALMICHE, J. P., & DORE, J. Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 11, p. 5588-5592, 2005.

DE LEEUW, E.; XIANGQUN, L.; WUYUAN, L.. Binding characteristics of the *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 surface layer to extracellular matrix proteins. **FEMS microbiology letters**, v. 260, n. 2, p. 210-215, 2006.

DELOACH, J. R. Development of PREEMPT: the first FDA approved CE product to reduce *Salmonella* in poultry. In: **Proceed. Technol. Transfer Soc.**, Annual Meeting, International Symposium and exhibit. 1998.

DE LOS SANTOS, F. S.; HUME, M.; VENKITANARAYANAN, K.; DONOGHUE, A. M.; HANNING, I.; SLAVIK, M. F.; DONOGHUE, D. J. Caprylic acid reduces enteric *Campylobacter* colonization in market-aged broiler chickens but does not appear to alter cecal microbial populations. **J. Food. Prot.**, v. 73, n. 4, p. 251–257, 2010.

DE LOS SANTOS, F. S.; DONOGHUE, A. M.; VENKITANARAYANAN, K.; REYES-HERRERA, I.; METCALF, J. H.; DIRAIN, M. L.; DONOGHUE, D. J. Therapeutic supplementation of caprylic acid in feed reduces *Campylobacter jejuni* in broiler chicks. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, n. 14, p. 4564–4566, 2008.

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

DESBOIS A. P., MEARNS-SPRAGG A., SMITH V. J. A fatty acid from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Mar. Biotechnol.**, v. 11, n. 1, p. 45–52, 2009.

DESMIDT, M., DUCATELLE, R., MAST, J., GODDEERIS, B. M., KASPERS, B., & HAESEBROUCK, F. Role of the humoral immune system in *Salmonella enteritidis* phage type four infection in chickens. **Vet. Immunol. immunopathol.**, v. 63, n. 4, p. 355-367, 1998.

DRAKE, M.; SMALL, C. L.; SPENCE, K. D.; SWANSON, B. G. Rapid detection and identification of *Lactobacillus* spp. in dairy products by using the polymerase chain reaction. **J. Food Protection**, v. 59, n. 10, p. 1031-1036, 1996.

DWORKIN, M. S.; SHOEMAKER, P. C.; GOLDOFT, M. J.; KOBAYASHI, J. M. Reactive arthritis and Reiter's syndrome following an outbreak of gastroenteritis caused by *Salmonella enteritidis*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 33, n. 7, p. 1010-1014, 2001.

DUBERNET, S., DESMASURES, N., GUÉGUEN, M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 214, n. 1 p. 271-275, 2002.

DUNKLEY, K. D.; CALLAWAY, T. R.; CHALOVA, V. I.; MCREYNOLDS, J. L.; HUME, M. E.; DUNKLEY, C. S.; RICKE, S. C. Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. **Anaerobe**, v. 15, n. 1, p. 26-35, 2009.

EDENS, F.W. An alternative for antibiotic use in poultry: probiotics. **Braz. J. Poult. Sci.**, v. 5, n. 2, p. 75-97, 2003.

ENDERS, G.; KNOTEK, F. Detection of IgM antibodies against rubella virus: comparison of the indirect ELISAs and anti IgM capture immunoassay. **J. Med. Virol.** v. 19, n. 1, p. 377-386, 1986.

ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: Novel strategies for detection of microbes in food. **J. Microbiol. Meth.**, v. 56, p. 297-314, 2004.

ESCARCHA, J. F.; CALLAWAY, T. R.; BYRD, J. A.; MILLER, D. N.; EDRINGTON, T. S.; ANDERSON, R. C.; NISBET, D. J. Effects of dietary alfalfa inclusion on *Salmonella* Typhimurium populations in growing layer chicks. **Food. Path. Dis.**, v. 9, n. 10, p. 945-951, 2012.

FELSKE, A., A. WOLTERINK, R. VAN LIS.; A. D. L. AKKERMANS. Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in Drentse A Grassland soils. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 1, p. 871–879, 1998.

FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; GHILARDI, Â. C.; DIAS, Â. M.; DE ALMEIDA, I. A.; DE MELO, L. C. Salmonella serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Rev. Instit. Med. Trop. SP.**, v. 48, n. 4, p. 179-184, 2006.

FORSHELL, L. P.; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. **Rev. Sci. Tech. O. I. E.**, v. 25, n. 2, p. 541-554, 2006.

FOOKS, L. J.; GIBSON, G. R. Probiotics as modulators of the gut flora. **Brir. J. Nutr.**, v. 88, n. 1, p. 39–49. 2002.

DE FREITAS NETO, O. C., PENHA FILHO, R. A. C., BARROW, P., & BERCHIERI JUNIOR, A. Sources of human non-typhoid salmonellosis: a review. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, v. 12, n. 1, p. 01-11, 2010.

FULLER, M.E.; STREGER, S.H.; ROTHMEL, R.K.; MAILLOUX, B.J.; HALL, J.A.; ONSTOTT, C.T.; FREDRICKSON, K.J.; BALKWILL, L.D. Development of vital fluorescent staining method for monitoring bacterial transport in subsurface environments. **App. Env. Microbiol.**, v. 66, n. 1, p. 4486–4496, 2000.

FULLER, R. The chicken Gut Microflora and Probiotic Supplements. **J. Poult. Sci.**, v. 38, n. 3, p. 189-96, 2001.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. App. Bacteriol.**, v. 66, n. 1, p. 365-78, 1989.

FUHRMAN, J. A.; MCCALLUM, K.; DAVIS, A. A. Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. **App. Env. Microbiol.**, v. 59, n. 5, p. 1294-1302, 1993.

GABORIAU-ROUTHIAU, V.; RAKOTOBÉ, S.; LÉCUYER, E.; MULDER, I.; LAN, A.; BRIDONNEAU, C.; CERF-BENSUSSAN, N. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. **Immunity**, v. 31, n. 4, p. 677-689, 2009.

Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Gast, R., Humphrey, T. J., & Van Immerseel, F. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. **FEMS microbiology reviews**, v. 33, n. 4, p. 718-738, 2009.

GARRAUD, O., PERRAUT, R., RIVEAU, G., NUTMAN, T. B. Class and subclass selection in parasite-specific antibody responses. **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 1, p. 300–304, 2009.

GASKINS, H. R.; COLLIER, C. T.; ANDERSON, D. B. Anti-biotics as growth promotants: Mode of action. **Anim. Biotechnol.**, v. 13, n. 1, p. 29–42, 2002.

GLEESON, T. M.; STAVRIC, S.; BLANCHFIELD, B. Protection of chicks against *Salmonella* infections with a mixture of pure cultures of intestinal bacteria. **Avian Dis.**, v. 33, n. 4, p. 636-642, 1989.

GODINEZ, I.; HANEDA, T.; RAFFATELLU, M.; GEORGE, M. D.; PAIXÃO, T. A.; ROLÁN, H. G.; BÄUMLER, A. J. T cells help to amplify inflammatory responses induced by *Salmonella* enterica serotype Typhimurium in the intestinal mucosa. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 5, 2008.

GOLUB, E. S.; GREEN, D. R. **Immunology: A Synthesis**: p. 494. 1991.

GONG, J.; SI, W.; FORSTER, R. J.; HUANG, R.; YU, H.; YIN, Y.; HAN, Y. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 59, n. 1, p. 147-157, 2007.

GONG, J.; FORSTER, R. J.; YU, H.; CHAMBERS, J. R.; SABOUR, P. M.; WHEATCROFT, R.; CHEN, S. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 208, n. 1, p.1–7, 2002.

GREY, J. P.; HERWIG, R. P. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 4049–4059, 1996.

GRIFFITHS, R. I.; WHITELEY, A. S.; O'DONNELL, A. G.; BAILEY, M. J. Rapid methode for coextraction of DNA and RNA from natural envirommnents fror analysis of ribossomal DNA and rRNA-based microbial community composition. **App. Env. Microbiol.**, v. 66, n. 12, p. 5488-5941, 2000.

GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F.; BOUVET, P. Taxonomy of the genus *Salmonella*. **Salmonella in domestic animals**, p. 1-17, 2000.

GUNAL, M.; YAYLI, G.; KAYA, O.; KARAHAN, N.; SULAK, O. The effects of antibiotic growth promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broilers. **Int. J. Poult. Sci**, v. 5, n. 2, p. 149-155, 2006.

HAAS, K. M.; POE, J. C.; STEEBER, D. A.; TEDDER, T. F. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. **Immunity**, v. 23, n. 1, p. 7-18, 2005.

HAGHIGHI, H. R.; GONG, J.; GYLES, C. L.; HAYES, M. A.; ZHOU, H.; SANEI, B.; SHARIF, S. Probiotics stimulate production of natural antibodies in chickens. **Clin. Vac. Immunol.**, v. 13, n. 9, p. 975-980, 2006.

HAGHIGHI, H. R.; GONG, J.; GYLES, C. L.; HAYES, M. A.; ZHOU, H.; SANEI, B.; SHARIF, S. Modulation of antibody-mediated immune response by

probiotics in chickens. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v. 12, n. 12, p. 1387-1392, 2005.

HARMSSEN, H. J. M.; ELFFERICH, P.; SCHUT, F.; WELLING, G. W. A 16S rRNA-targeted probe for detection of lactobacilli and enterococci in faecal samples by fluorescent in situ hybridization. **Microb. Ecol. Health Dis.**, v. 11, n. 1, p. 3-12, 1999.

HASSAN, J. O.; CURTISS, R. I. I. I. Virulent *Salmonella* typhimurium-induced lymphocyte depletion and immunosuppression in chickens. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 5, p. 2027-2036, 1994.

HAVENAAR, R.; TEN BRINK, B.; HUIS, J. H. Selection of strains for probiotic use. In: **Probiotics**. Springer: Netherlands, 1992. p. 209-224.

HEILIG, H. G.; ZOETENDAL, E. G.; VAUGHAN, E. E.; MARTEAU, P.; AKKERMANS, A. D.; DE VOS, W. M. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. **App. Env. Microbiol.**, v. 68, n. 1, p. 114-123, 2002.

HERMANS, D.; MARTEL, A.; VAN DEUN, K.; VERLINDEN, M.; VAN IMMERSEEL, F.; GARMYN, A.; PASMANS, F. Intestinal mucus protects *Campylobacter jejuni* in the ceca of colonized broiler chickens against the bactericidal effects of medium-chain fatty acids. **Poult. Sci.**, v. 89, n. 6, p. 1144-1155, 2010.

HIGGINS, J. P.; HIGGINS, S. E.; WOLFENDEN, A. D.; HENDERSON, S. N.; TORRES-RODRIGUEZ, A.; VICENTE, J. L.; TELLEZ, G. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture treatment timing on *Salmonella* Enteritidis in neonatal broilers. **Poult. Sci.**, v. 89, n. 2, p. 243-247, 2010.

HILMARSSON, H.; THORMAR, H.; THRAINSSON, J. H.; GUNNARSSON, E. Effect of glycerol monocaprate (monocaprin) on broiler chickens: An attempt at

reducing intestinal *Campylobacter* infection. **Poult. Sci.**, v. 85, n. 4, p. 588-592, 2006.

HOLT, P. S.; GAST, R. K.; PORTER, R. E.; STONE, H. D. Hyporesponsiveness of the systemic and mucosal humoral immune systems in chickens infected with *Salmonella enterica* serovar enteritidis at one day of age. **Poult. Sci.**, v. 78, n. 11, p. 1510-1517, 1999.

HOLT, K. E.; THOMSON, N. R.; WAIN, J.; PHAN, M. D.; NAIR, S.; HASAN, R.; PARKHILL, J. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A harbors IncHI1 plasmids similar to those found in serovar Typhi. **J. Bacteriol.**, v. 189, n. 1, p. 4257-4264, 2007.

HOLLISTER, A. G.; CORRIER, D. E.; NISBET, D. J. Effects of chicken derived cecal microorganisms maintained in continuous culture on cecal colonization by *Salmonella typhimurium* in turkey poults. **Poult. Sci.**, v. 7, n. 8, p. 546-549, 1999.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. **J. Food Sci.**, v. 53, n. 1, p. 1514-1516, 1988.

HOOPER, L.V. Bacterial contributions to mammalian gut development. **Tr. Microbio.**, v. 12, n. 1 p. 129-134, 2004.

HORIE, M.; ISHIYAMA, A.; FUJIHARA-UEKI, Y.; SILLANPAA, J.; KORHONEN, T. K.; TOBA, T. Inhibition of the adherence of *Escherichia coli* strains to basement membrane by *Lactobacillus crispatus* expressing an S-layer. **J. App. Microbiol.**, v. 92, n. 1, p. 396-403, 2002.

HUANG, C., QIAO, S., LI, D., PIAO, X., & REN, J. Effects of lactobacilli on the performance, diarrhea incidence, VFA concentration and gastrointestinal microbial flora of weaning pigs. **ASIAN AUSTRALASIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCES**, v. 17, n. 3, p. 401-409, 2004.

HUANG, M. K., Y. J. CHOI, R. HOUE, J. W. LEE, B. LEE, AND X. ZHAO. 2004. Effects of Lactobacilli and an acidophilic fungus on the production performance and immune responses in broiler chickens. **Poult. Sci.**, v.83, n.1, p. 788–795.

HUBENER, K., VAHJEN, W., SIMON, O. Bacterial responses to different dietary cereal types and xylanase supplementation in the intestine of broiler chicken. **Arch. Anim. Nutr.**, v. 56, p.167–187, 2002.

HUGHES, S.; HAYNES, A.; O'REGAN, M.; BUMSTEAD, N. Identification, mapping and phylogenetic analysis of three novel chicken CC chemokines. **Immunogenetics**. v. 58, p. 674-683, 2001.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microb. Ecol. Food Comm.**, Blackie Academic & Professional, 1998.

INOUE, R.; USHIDA, K. Development of the intestinal microbiota in rats and its possible interactions with the evolution of the luminal IgA in the intestine. **FEMS microbiol. Ecol.**, v. 45, n. 2, p. 147-153, 2003.

IRINO, K.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G. Progression of Salmonella enteritidis phage type 4 strains in São Paulo State, Brazil. **Ver. Inst. Med. Trop. SP.**, v. 38, n. 3, p. 193-196, 1996.

IVANOV, I. I.; DE LLANOS FRUTOS, R.; MANEL, N.; YOSHINAGA, K.; RIFKIN, D. B.; SARTOR, R. B.; LITTMAN, D. R. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. **Cell. Host. Microbe**. v. 4, n. 4, 4337–349, 2008.

IVO, M. A. **Estudo da ultraestrutura da tonsila cecal de frangos SPF tratados com produtos comerciais de exclusão competitiva, e desafiados com *Salmonella* Enteritidis, observados através de microscopia eletrônica**

de varredura (MEV). 2010. 130f. Tese (Mestrado) - Universidade de São Paulo., 2010.

JARQUIN, R. L., NAVA, G. M., WOLFENDEN, A. D., DONOGHUE, A. M., HANNING, I., HIGGINS, S. E., & HARGIS, B. M. The evaluation of organic acids and probiotic cultures to reduce *Salmonella enteritidis* horizontal transmission and crop infection in broiler chickens. **Int. J. Poult. Sci.**, v. 6, n. 3, p.182-186, 2007.

JANCZYK, P.; PIEPER, R.; SOUFFRANT, W. B.; BIMCZOK, D.; ROTHKÖTTER, H. J.; SMIDT, H. Parenteral long-acting amoxicillin reduces intestinal bacterial community diversity in piglets even 5 weeks after the administration. **The ISME journal**, v. 1, n. 2, p. 180-183, 2007.

JEURISSEN, S. H. M. The role of various compartments in the chicken spleen during an antigen-specific humoral response. **Immunology**, v. 80, n. 1, p. 29–33, 1993.

JEURISSEN, S. H. M., ROOZELAAR, D. V., JANSE, E. M. Absorption of carbon from the yolk into gut associated lymphoid tissues of chickens. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 15, n. 1, p. 437–442, 1991.

JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. Clustering, distance methods, and ordination. **App. Multiv. Stat. analysis**, v. 4, n. 3, p. 726-99, 1998.

JOHNY, A. K.; BASKARAN, S. A.; CHARLES, A. S.; AMALARADJOU, M. A. R.; DARRE, M. J.; KHAN, M. I.; VENKITANARAYANAN, K. Prophylactic supplementation of caprylic acid in feed reduces *Salmonella Enteritidis* colonization in commercial broiler chicks. **J. Food Prot.** v.72, n. 4, p.722–727, 2009.

KAISER, A.; GAIDZIK, N.; BECKER, T.; MENGE, C.; GROH, K.; CAI, H.; KUNZ, H. Fully Synthetic Vaccines Consisting of Tumor-Associated MUC1

Glycopeptides and a Lipopeptide Ligand of the Toll-like Receptor 2. **AC Int. Ed.**, v. 49, n. 21, p. 3688-3692, 2010.

KAUFFMANN, F. **Classification of bacteria. A realistic scheme with special reference to the classification of Salmonella-and Escherichia-species.** Munksgaard, Noerie Soegade 35, DK-1370, Copenhagen, Denmark., 1975.

KAUTS, W. **Escogiendo el microbo adecuado.** Alimentos balanceados para animales, Hansen Biosystems DFM Products; 1999.

KLASING, K.C.; JOHNSTON, B.K.; BENSON, B.N. Implications of an immune response on growth and nutrition require-ments of chicks. In: GARNSWORTHY, P.C.; WISEMAN. **Recent Devel. Poult. Nutri..** Nottingham: Nottingham University Press, 1999. p.35-47.

KNARREBORG, A.; SIMON, M. A.; ENGBERG, R. M.; JENSEN, B. B.; TANNOCK, G. W. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 5, p. 6425–6428, 2002.

KOENEN, M. E.; KRAMER, J.; VAN DER HULST, R.; HERES, L.; JEURISSEN, S. H. M.; BOERSMA, W. J. A. Immunomodulation by probiotic lactobacilli in layer-and meat-type chickens. **Brit. Poult. Sci.**, v. 45, n. 3, p. 355-366, 2004.

KOCHERGINSKAYA, S.; AMINOV, R. I.; WHITE, B. A. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, & statistical ecology approaches. **Anaerobe**, v. 7, n. 2, p. 19-134, 2001.

KOGUT, M. H.; LISA, R. I.; KAISER, P. Priming by recombinant chicken interleukin-2 induces selective expression of IL-8 and IL-18 mRNA in chicken heterophils during receptor-mediated phagocytosis of opsonized and nonopsonized Salmonella enterica serovar enteritidis. **Molec. Immunol.**, v. 40, n. 9, p. 603-610, 2003.

KOLLANOOR-JOHNY, A., MATTSON, T., BASKARAN, S. A., AMALARADJOU, M. A. R., HOAGLAND, T. A., DARRE, M. J., VENKITANARAYANAN, K. Caprylic acid reduces *Salmonella* Enteritidis populations in various segments of digestive tract and internal organs of 3- and 6-week-old broiler chickens, therapeutically. **Poul. Sci.**, v. 91, n. 7, p. 1686-94, 2012.

KUMAR, R.; GROVER, S.; KAUSHIK, J. K.; BATISH, V. K. IS30-related transposon mediated insertional inactivation of bile salt hydrolase (bsh1) gene of *Lactobacillus plantarum* strain Lp20. **Microb. Research**. v. 169, n. 7 p. 553-560, 2014.

LAMMERS, K. M.; BRIGIDI, P.; VITALI, B.; GIONCHETTI, P.; RIZZELLO, F.; CARAMELLI, E.; CAMPIERI, M. Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 38, p. 165–172, 2003.

LAMMERS, A.; KLOMP, M. E.; NIEUWLAND, M. G.; SAVELKOU, H. F.; PARMENTIER, H. K. Adoptive transfer of natural antibodies to non-immunized chickens affects subsequent antigen-specific humoral and cellular immune responses. **DC Immunol.**, v. 28, n. 1, p. 51-60, 2004.

NGOC LAN, P. T.; BINH, L. T.; BENNO, Y. Impact of two probiotic *Lactobacillus* strains feeding on fecal *lactobacilli* and weight gains in chicken. **J of General and App Microbiol.**, v. 49, n. 1, p. 29-36, 2003.

LAN, J. G.; CRUICKSHANK, S. M.; SINGH, J. C.; FARRAR, M.; LODGE, J. P.; FELSBURG, P. J.; CARDING, S. R. Different cytokine response of primary colonic epithelial cells to commensal bacteria. **World J. of Gastroentero.** v. 11, n. 22, 2005.

LANNING, D.; ZHU, X.; ZHAI, S. K.; KNIGHT, K. L. Development of the antibody repertoire in rabbit: gut-associated lymphoid tissue, microbes, and selection. **Immunol. reviews**, v. 175, n. 1, p. 214-228, 2000.

LEANDRO, N. S. M., OLIVEIRA, A. S. C., GONZALES, E., CAFÉ, M. B., STRINGHINI, J. H., ANDRADE, M. A. Probiótico na ração ou inoculado em aovos embrionados. 1. Desempenho de pintos de corte desafiados com *Salmonella Enteritidis*. **R. Bras. Zootec.**, v. 39, n.7, p.1509-1516, 2010.

LEE, S. ; BARBE, M.F. ; SCALIA, R. ; GOLDFINGER, L.E. Three-dimensional reconstruction of neovasculature in solid tumors and Basement Membrane Matrix using Ex Vivo X-ray Microcomputed Tomography. **Microcirculation**, v. 21, n. 1, p. 159-170. 2014.

LEE, Y. K.; HO, P. S.; LOW, C. S.; ARVILOMMI, H.; SALMINEN, S. Permanent colonization by *Lactobacillus casei* is hindered by the low rate of cell division in mouse gut. **App. Env. Microbiol.**, v. 70, n. 2, p. 670–674, 2004.

LERMAN, L. S.; FISCHER, S. G.; HURLEY, I.; SILVERSTEIN, K.; LUMELSKY, N. Sequence-determined DNA separations. **Annu. Rev Biophys. Bioeng.**, v. 13, n. 1, p. 399-423, 1984.

LI, S. P.; ZHAO, X. J.; WANG, J. Y. Synergy of *Astragalus* polysaccharides and probiotics (*Lactobacillus* and *Bacillus cereus* on immunity and intestinal microbiota in chicks. **Poult. Sci.**, v. 88, n. 3, p. 519-525, 2009.

LILLEHOJ, H. S.; RUFF, M. D. Comparison of disease susceptibility and subclass-specific antibody response in SC and FP chickens experimentally inoculated with *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina* or *Eimeria maxima*. **Avian Dis.**, v.31, p.112-119, 1987.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. J. Probiotics, growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, p. 477-48, 1965.

LIU, G.; GRIFFITHS, M. W.; WU, P.; WANG, H.; ZHANG, X.; LI, P. *Enterococcus faecium* LM-2, a multi-bacteriocinogenic strain naturally

occurring in “Byaslag”, a traditional cheese of Inner Mongolia in China. **Food Control**, v. 22, n. 2, p. 283–289, 2011.

LOWANTHAL, J. W.; CONNICK, T. E.; MCWATERS, P. G.; YORK, J. J. Development of T cell immune responsiveness in the chicken. **Immunol. Cell Biol.**, v. 72, n. 2, p. 115–122, 1994.

LYTE, M. The microbial organ in the gut as a driver of homeostasis and disease. **Med. Hypoth.**, v. 74, n. 4, p. 634–638, 2010.

LU, J.; IDRIS, U.; HARMON, B.; HOFACRE, C.; MAURER, J. J.; LEE, M. D. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. **App. Env. Microbiol.**, v. 69, n. 11, p. 6816–6824, 2003.

MAASSEN, C. B.; VAN HOLTEN-NEELEN, C.; BALK, F.; DEN BAK-GLASHOUWER, M. J. H.; LEER, R. J.; LAMAN, J. D.; CLAASSEN, E. Straindependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. **Vaccine**. v. 18, n. 23, p. 2613–2623, 2000.

MARCUS, R.; VARMA, J. K.; MEDUS, C.; BOOTHE, E. J.; ANDERSON, B. J.; CRUME, T.; ANGULO, F. J. Re-assessment of risk factors for sporadic Salmonella serotype Enteritidis infections: a case-control study in five FoodNet Sites, 2002–2003. **Epidemiol. Infec.**, v. 135, n. 01, p. 84–92, 2007.

MATIN, H. R. H.; SAKI, A. A.; ALIARABI, H.; SHADMANI, M.; ABYANE, H. Z. Intestinal broiler microflora estimation by artificial neural network. **Neural Comput. App.**, v. 21, n. 5, p. 1043–1047, 2012.

MARTINS-GREEN, M.; FEUGATE, J. E. The 9E3/CEF4 gene product is a chemotactic and angiogenic factor that can initiate the wound-healing cascade in vivo. **Cytokine**. v. 10, n. 7, p. 522–535, 1998.

MATEOS, G. G.; JIMÉNEZ-MORENO, E.; SERRANO, M. P.; LÁZARO, R. P. Poultry response to high levels of dietary fiber sources varying in physical and chemical characteristics. **J. Appl. Poult. Res.**, v. 21, n.1, p.156-174, 2012.

MATHLOUTHI, N.. Effects of xylanase and -glucanase addition on performance, nutrient digestibility, and physico-chemical conditions in the small intestine contents and caecal microflora of broiler chickens fed a wheat and barley-based diet. **J. Anim. Sci.**, v. 51, n. 1, p. 395–406, 2002.

MATSON, K.D.; RICKLEFS, R.E.; KLASING, K.C. A hemolysis-hemagglutination assay for characterizing constitutive innate humoral immunity in wild and domestic birds. **Dev. Comp. Immunol.** v. 29, n. 1, p. 275–286, 2005.

MCCRACKEN, V. J.; SIMPSON, J. M.; MACKIE, R. I.; GASKINS, H. R. Molecular ecological analysis of dietary and antibiotic-induced alterations of the mouse intestinal microbiota. **J. Nutr.**, v. 131, n. 6, p. 1862-1870, 2001.

MCAULIFFE, L.; ELLIS, R. J.; LAWES, J. R.; AYLING, R. D.; NICHOLAS, R. A. 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating Mycoplasma species. **J. Med. Microbiol.**, v.54, n.8, p.731-39, 2005.

MCGHEE, J. R.; MESTECKY, J.; DERTZBAUGH, M. T.; ELDRIDGE, J. H.; HIRASAWA, M.; KIYONO, H. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. **Vaccine**, v. 10, n. 2, p. 75-88, 1992.

MEAD, G. C. Prospects for competitive exclusion treatment to control salmonellas and other foodborne pathogens in poultry. **Vet. J.**, v. 159, n. 2, p. 111-123, 2000.

MEAD, G. C. Bacteria in the gastrointestinal tract of birds. In: MACKIE, R. I.; WHITE, B. A. E.; ISAACSON, R. E. **Gastrointest. Microbiol.** New York: Chapman & Hall. 1997. p. 216–240.

MEAD, G. C. Anaerobic utilization of uric acid by some group D Streptococci. **J. Gen. Microbiol.**, v.82, n. 6, p.421–423, 1974.

METHNER, U.; BARROW, P. A.; GREGOROVA, D.; RYCHLIK, I. Intestinal colonisation-inhibition and virulence of *Salmonella* phoP, rpoS and ompC deletion mutants in chickens. **Vet. Microbiol.**, v. 98, n. 1, p.37–43, 2004.

MILLER, R. W.; SKINNER, J.; SULAKVELIDZE, A.; MATHIS, G. F.; HOFACRE, C. L. Bacteriophage therapy for control of necrotic enteritis of broiler chickens experimentally infected with *Clostridium perfringens*. **Avian Dis.**, v. 54, n. 1, p. 33-40, 2010.

MILNER, K. C.; SCHAFFER, M. F. Bacteriological studies of experimental *Salmonella* infections in chicks. **J. Infect. Dis.**, v. 90, n. 3, pp. 81–96, 1952.

MOCKETT, A. P. A.; COOK, J. K. A. The detection of specific IgM to infectious bronchitis virus in chicken serum using an ELISA. **Avian Pathol.**, v. 15, n. 6, p. 437-416, 1986.

MONTAGNE, L., J. R.; PLUSKE, J. R.; HAMPSON, D. J. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 108, n. 8, p. 95–117, 2003.

MOUNTZOURIS, K. C.; TSIRTSIKOS, P.; KALAMARA, E.; NITSCH, S.; SCHATZMAYR, G.; FEGEROS, K. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. **Poult. Sci.**, v. 86, n. 2, p. 309–317, 2007.

MOURA, L. N.; NEUMANN, E.; VIEIRA, L. Q.; NICOLI, J. R. Protection by *Lactobacillus acidophilus* UFV- H2B20 against experimental oral infection

with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium in gnotobiotic and conventional mice. **Braz J Microbiol.**, v. 32, n. 8, p. 66-69, 2001.

MUZYER, G. DGGE/TGGE a method for identifying gens from natural ecosystems. **Curr. op. Microbiol.**, v. 2, n. 4, p.3, 1999.

MUZYER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Anton. van Lee.**, v. 73, n. 6, p. 127-141, 1998.

MUIR, W. I.; BRYDEN, W. L.; HUSBAND, A. J. Immunity, vaccination and the avian intestinal tract. **Dev. Comp. Immunol.**, v.24, n.2-3, p.325-342, 2000.

MUÑOZ-PROVENCIO, D.; LLOPIS, M.; ANTOLÍN, M.; TORRES, I.; GUARNER, F.; PÉREZ-MARTÍNEZ, G.; MONEDERO, V. Adhesion properties of *Lactobacillus casei* strains to resected intestinal fragments and components of the extracellular matrix. **Arch. Microbiol.**, v. 191, p. 153–161, 2009.

NAKAGAWA, T.; SHIMADA, M.; MUKAI, H.; ASADA, K.; KATO, I.; FUJINO, K.; SATO, T. (1994) Detection of alcohol-tolerant hiochi bacteria by PCR. *Appl. Environ., Microbiol.*, v. 60, n. 3, p. 637-640.

NASIR, Z.; GRASHORN, M. A. Use of Black cumin (*Nigella sativa* Linn.) as alternative to antibiotics in poultry diets. In: **9. Tagung Schweine-und Geflügelernährung, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.** Halle, Germany, 28-30 November 2006. Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg, 2006. p. 210-213.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutri. Req. Poult.** Washington, DC: National Academy Press. 1994.

NOGRALES, K. E.; ZABA, L. C.; GUTTMAN-YASSKY, E.; FUENTES-DUCULAN, J.; SUÁREZ-FARIÑAS, M.; CARDINALE, I.; KRUEGER, J. G. (2008). Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct

inflammatory and keratinocyte-response pathways. **Brit. J. Dermatol.**, v. 159, n. 5, p. 1092-1102, 2008.

NOVERR, M. C.; HUFFNAGLE, G. B. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut?. **Trends Microbiol.**, v. 12, n. 7, p. 562–568, 2004.

NURMI, E.; RANTALA, M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. **Nature**, v. 241, n. 8, p. 210–211, 1973.

OLIVEIRA, D. D.; SILVA, E. N. *Salmonella* em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. **Ar. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 52, n. 6, p. 655-61, 2000.

ORLANDI-PRADINES, E.; ALMERAS, L.; DENIS DE SENNEVILLE, L.; BARBE, S.; REMOUE, F.; VILLARD, C.; CORNELIE, S.; PENHOAT, K.; PASCUAL, A.; BOURGOUIN, C.; FONTENILLE, D.; BONNET, J.; CORRE-CATELIN, N.; REITER, P.; PAGES, F.; LAFFITE, D.; BOULANGER, D.; SIMONDON, F.; PRADINES, B.; FUSAI, T.; ROGIER, C. Antibody response against saliva antigens of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* in travellers in tropical Africa. **Microbes Infect.**, v. 9, n. 4, p. 1454–1462, 2007.

OUWEHAND, A. C.; KIRJAVAINEN, P. V.; SHORTT, C.; SALMINEN, S.; Probiotics: mechanisms and established effects. **Intl. Dairy J.**, v. 9, n. 1, p. 43-52, 1999.

OUWEHAND, A. C.; TUOMOLA, E. M.; TOLKKO, S.; SALMINEN, S. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. **Intl. J. Food Microbiol.**, v. 64, n. 1, p. 119-126, 2001.

OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S.; TOLKKO, S.; ROBERTS, P.; OVASKA, J.; SALMINEN, E. Resected human colonic tissue: new model for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. **Clin Diagn Lab Immunol.**, v. 9, n. 6, p. 184–186, 2002.

OOZEER, R.; LEPLINGARD, A.; MATER, D. D.; MOGENET, A.; MICHELIN, R.; SEKSEK, I.; MARTEAU P, DORE J, BRESSON JL, CORTIER G. Survival of *Lactobacillus casei* in the human digestive tract after consumption of fermented milk. **Appl Environ Microbiol.**, v. 72, n. 8, p. 5615–5617, 2006.

O'HALLORAN, F. M.; MORRISSEY, S. D.; MURPHY, L.; THORNTON, G.; SHANAHAN, F.; O'SULLIVAN, G. C.; COLLINS, J. K. Adhesion of potential probiotic bacteria to human epithelial cell lines. **Int. Dairy J.**, v. 8, p. 596, 1998.

PARCELLS, M. S.; LIN, S. F.; DIENGLEWICZ, R. L.; MAJERCIK, V.; ROBINSON, D. R.; CHEN, H. C.; KUNG, H. J. Marek's disease virus (MDV) encodes an interleukin-8 homolog (vIL-8): characterization of the vIL-8 protein and a vIL-8 deletion mutant MDV. **J. Virol.**, v. 75, n. 11, p. 5159-5173, 2001.

PARKER, R. B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Anim. Nutr. Health.**, v. 29, n. 7, p.4-8, 1974.

PARMENTIER, H. K.; LAMMERS, A.; HOEKMAN, J. J.; REILINGH, G. D. V.; ZAAANEN, I. T.; SAVELKOUL, H. F. Different levels of natural antibodies in chickens divergently selected for specific antibody responses. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 28, p. 39–49, 2004.

PASCUAL, M.; HUGAS, M.; BADIOLA, J. I.; MONFORT, J. M.; GARRIGA, M. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens. **App. Env. Microbiol.**, v. 65, n. 11, p. 4981-4986, 1999.

PEDROSO, A. A.; MENTEN, J. F.; LAMBAIS, M. R.; RACANICCI, A. M. C.; LONGO, F. A.; SORBARA, J. O. B. Intestinal bacterial community and growth performance of chickens fed diets containing antibiotics. **Poult. Sci.**, v. 85, n. 4, p. 747-752, 2006.

PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: Mcgraw. Hill do Brasil, 1981.

PERDIGON, G.; ALVAREZ, S.; RACHID, M.; AGÜERO, G.; GOBBATO, N. Immune System Stimulation by Probiotics. **J. Dairy Sci.**, v. 78, n. 7, p. 1597-1606, 1995.

QUERE, F.; DESCHAMPS, A.; URDACI, M. C. DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. **J. App. Microbiol.**, v. 82, n. 6, p. 783-790, 1997.

RAFFATELLU, M.; GEORGE, M. D.; AKIYAMA, Y.; HORNSBY, M. J.; NUCCIO, S. P.; PAIXAO, T. A.; BÄUMLER, A. J. Lipocalin-2 resistance confers an advantage to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine. **Cell host & microbe**, v. 5, n. 5, p. 476-486, 2009.

RAHIMI, S.; GRIMES, J. L.; FLETCHER, O.; OVIEDO, E.; SHELDON, B. W. Effect of a direct-fed microbial (Primalac on structure and ultrastructure of small intestine in turkey poult. **Poult. Sci.**, v. 88, n. 3, p. 491-503, 2009.

RHEE, K. J.; SETHUPATHI, P.; DRIKS, A.; LANNING, D. K.; KNIGHT, K. L. Role of commensal bacteria in development of gut-associated lymphoid tissues and preimmune antibody repertoire. **J. Immunol.**, v. 172, n. 2, p. 1118-1124, 2004.

ROCHA, T. S.; BAPTISTA, A. A. S.; DONATO, T. C.; MILBRADT, E. L.; OKAMOTO, A. S.; RODRIGUES, J. C. Z., ANDREATTI FILHO, R. L. Evaluation of *in vitro* and *in vivo* adhesion and immunomodulatory effect of *Lactobacillus* species strains isolated from chickens. **Poult. Sci.** v.91, p.362-369, 2012.

ROCHA, T. S. **Isolamento, identificação, avaliação da capacidade de adesão in vitro e efeito imunomodulatório de lactobacillus isolados de aves.** 2011. 88 ff. Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health during life and after storage. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 46, n. 8, p. 407–419, 2000.

ROSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMZ Microbiol. Rev.**, v. 25, n. 9, p. 39-67, 2001.

ROMBOUT, J. H.W.M, et al. Effect of vitamin A deficiency and Newcastle disease virus infection on IgA and IgM secretion in chickens. **British J. of Nutrition.**, v. 68, n. 3, p. 753-763, 1992.

ROSE, M. ELAINE; V PEPPARD, J. A. N. E.; HOBBS, S. M. Coccidiosis: characterization of antibody responses to infection with *Eimeria nieschulzi*. **Parasite Immunol.**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 1984.

ROSENBAUM, V.; RIESNER, D. Temperature-gradient gel electrophoresis: Thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts. **Biophys. Chem.**, v. 26, n. 8, p. 235–246, 1987.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. D.; LOPES, D. C.; EUCLIDES, R. F. Composição de alimentos e exigências nutricionais. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**. 2005.

SALO-ZIEMAN, V. L.; SIVONEN, T.; PLUMB, J. J.; HADDAD, C. M.; LAUKKANEN, K.; KINNUNEN, P. H.; PUHAKKA, J. A. Characterization of a thermophilic sulfur oxidizing enrichment culture dominated by a *Sulfolobus* sp. obtained from an underground hot spring for use in extreme bioleaching conditions. **J. Indust. Microbiol. Biotech.**, v. 33, n. 12, p. 984-994, 2006.

SAMBRI, V., MARANGONI, A., STORNI, E., CAVRINI, F., MORONI, A., SPARACINO, M., CEVENINI, R. Infezioni zoonosiche trasmesse da zecche: aspetti clinici e diagnostici in medicina umana. **Parassitologia.**, v. 46, n. 7, 109–113, 2004.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Estudos e Pesquisas em Medicina Veterinária e Zootecnia. 2002

SANTOS, W. L. M. **Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347, de origem carnico**. Tese (Doutorado) – Universidade Complutense de Madrid. 1993.

SÁNCHEZ, A.; ESTARRÓN-ESPINOSA, M.; OBLEDO-VÁZQUEZ, E. N.; PADILLA-CAMBEROS, E.; SILVA-VÁZQUEZ, R.; LUGO-CERVANTES, E. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* HBK) with different composition when microencapsulated in β -cyclodextrin. **Lett. App. Microbiol.**, v. 50, n. 6, p. 585-590, 2010.

SCHWARZ, A.; MEDRANO-MERCADO, N.; BILLINGSLEY, P. F.; SCHAUB, G. A.; STERNBERG, J. M. IgM-antibody responses of chickens to salivary antigens of *Triatoma infestans* as early biomarkers for low-level infestation of triatomines. **Int. J. Parasitol.**, v. 40, n. 11, p. 1295-1302, 2010.

SCHAR-ZAMMARETTI, P.; UBBINK, J. The cell wall of lactic acid bacteria: Surface constituents and macromolecular conformations. **Biophys. J.**, v. 85, n. 7, p. 4076–4092, 2003.

SCHAT, K. A.; MYERS, T. J. Avian intestinal immunity. **Crit. Rev. Poult. Biol.**, v. 3, n. 8, p. 19–34, 1991.

SCHULZ, S. M.; KÖHLER, G.; SCHÜTZE, N.; KNAUER, J.; STRAUBINGER, R. K.; CHACKERIAN, A. A.; ALBER, G. Protective immunity to systemic infection with attenuated *Salmonella enterica* serovar enteritidis in the absence of IL-12 is associated with IL-23-dependent IL-22, but not IL-17. **J. Immunol.** v.181,n. 11, p. 7891–7901, 2008.

SEARS, C.L. A. Dynamic partnership: celebrating our gut flora. **Anaerobe**, v.11, n. 7, p.247–251, 2005.

SEIDAVI, A. Molecular Approaches for the Study of Genetic Diversity in Microflora of Poultry Gastrointestinal Tract. In: CALISKAN, M. **Analysis of Genetic Variation in Animals**. Rijeka: InTech, p.83-104, 2012.

SCHNEITZ, C.; KIISKINEN, T.; TOIVONEN, V.; NASI, M. Effect of Broilact on the physicochemical conditions and nutrient digestibility in the gastrointestinal tract of broilers. **Poult. Sci.**, v. 77, n. 3, p. 426-432, 1998.

SCHOENI, J. L.; WONG, A. C. Inhibition of *Campylobacter jejuni* colonization in chicks by defined competitive exclusion bacteria. **App Env Microbiol.**, v. 60, n. 9, p. 1191-1197, 1994

SEKSIK, P.; RIGOTTIER-GOIS, L.; GRAMET, G.; SUTREN, M.; POCHART, P.; MARTEAU, P.; DORE, J. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. **Gut**. v. 52, n. 4, p. 237-242, 2003.

SETTANNI, L. U. C. A.; CORSETTI, A. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food-and beverage-associated microorganisms: a review. **J. Microbiol. Meth.**, v. 69, n. 1, p. 1-22, 2007.

SIMPSON, J. M.; MARTINEAU, B.; JONES, W. E.; BALLAM, J. M.; MACKIE, R. I. Characterization of fecal bacterial populations in canines: effects of vage, breed and dietary fiber. **Microb. Ecol.**, v. 44, n. 2, p. 186-197, 2002.

SIMPSON, J. M.; MCCracken, V. J.; WHITE, B. A.; GASKINS, H. R.; MACKIE, R. I. Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. **J. Microbiol. Meth.**, v. 36, n. 3, p. 167-179, 1999.

SINGH, T. P.; KAUR, G.; MALIK, R. K.; SCHILLINGER, U.; GUIGAS, C.; KAPILA, S. Characterization of intestinal *Lactobacillus reuteri* strains as potential probiotics. **Prob. Antimicl Pteins.**, v. 4, n. 1, p. 47-58, 2012.

SINGH, T. P.; KAUR, G.; MALIK, R. K.; SCHILLINGER, U.; GUIGAS, C.; KAPILA, S. Quantification of bacterial groups within the human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 1, p. 2263–2266, 2000.

SKRIVANOVA, E.; MAROUNEK, M.; BENDA, V.; BREZINA, P. Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Clostridium perfringens* to organic acids and monolaurin. **Vet. Med-Czech.**, v. 51, n. 4, p. 81-88, 2005.

SPEKSNIJDER, A. G., KOWALCHUK, G. A., DE JONG, S., KLINE, E., STEPHEN, J. R., & LAANBROEK, H. J. Microvariation artifacts introduced by PCR and cloning of closely related 16S rRNA gene sequences. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 1, p. 469–472, 2001.

SHIVAPRASAD, H. L. Pullorum disease and fowl typhoid. In: SAIF, Y.M., **Avian Diseases**. Ames: Iowa State Press. 2003. p. 568–582.

SNOEYENBOS, G. H. **O presente e o futuro do controle de Salmonella em aves**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AVICULTURA, 12., 1991, Brasília. Anais. Brasília: 991. p.59-69.

STAPPENBECK, T. S.; HOOPER, L. V.; GORDON, J. I. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via paneth cells. **Proc. Nat. Acdm. Sci.**, v. 99, p. 15451–15455, 2002.

SWETHA, R.; JAYAKUMAR, K.; NARAYANASWAMY, M.; SHRIDHAR, N. B.; SANGANAL, J.; RAO, S. Organ directed toxicity of halquinol in a repeated dose 28 day oral toxicity study in female rats. **Indian J. Pharmacol.**, v. 39, n. 2, p. 97-102, 2007.

SUBBA RAO, D. S. V.; MCDUFFIE, F. C.; GLICK, B. The regulation of IgM production in the chick: roles of the bursa of Fabricius, environmental antigens and plasma IgY. **J. Immunol.**, v. 120, n. 3, p. 783-787, 1978.

SUN, C. Q.; O'CONNOR, C. J.; TURNER, S. J.; LEWIS, G. D.; STANLEY, R. A.; ROBERTON, A. M. The effect of pH on the inhibition of bacterial growth by physiological concentrations of butyric acid: Implications for neonates fed on suckled milk. **Chem. Biol. Interact.**, v. 113, n. 2, p. 117–131, 1998.

SUZUKI, M. T.; GIOVANNONI, S. J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 2, p. 625–630, 1996.

TELLEZ, G.; HIGGINS, S. E.; DONOGHUE, A. M.; HARGIS, B. M. Digestive physiology and the role of microorganisms. **J. Appl. Poult. Res.**, v. 15, n. 1, p. 136–144, 2006.

LAN, P. T. N.; HAYASHI, H.; SAKAMOTO, M.; BENNO, Y. Phylogenetic of cecal microbiota in chicken by the use of 16S rDNA clone libraries. **Microbiol. Immunol.**, v. 46, n. 2, p. 371–82, 2002.

THOMPSON, C. L.; WANG, B.; HOLMES, A. J. The immediate environment during postnatal development has long-term impact on gut community structure in pigs. **ISME J.**, v. 2, n. 4, p. 739–748, 2008.

TILSALA-TIMISJARVI, A.; ALATOSSAVA, T. Development of oligonucleotide primers from the 16S²³S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 35, n. 6, p. 49–56, 1997.

TLASKALOVA-HOGENOVA, H. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. **Immunol. Lett.** v. 93, p. 97–108, 2004.

TOIVANNEN, P., VAAHTUVO, J., EEROLA, E. Influence of major histocompatibility complex on bacterial composition of fecal flora. **Infect. Immun.** v. 69, n. 2, p. 2372–2377, 2001.

TOLLEFSON, L.; ALTEKRUSE, S. F.; POTTER, M. E. Therapeutic antibiotics in animal feeds and antibiotic resistance. **Rev. Scient. Tech.**, v. 16, n. 2, p. 709–715, 1997.

TOROK, V. A.; OPHEL-KELLER, K.; LOO, M.; HUGHES, R. J. Application of methods for identifying broiler chicken gut bacterial species linked with increased energy metabolism. **App. and Env. Microbiol.** v. 74, n. 3, p. 783-791, 2008.

TORTUERO, F. Influence of implantation of lactobacillus acidophilus in chicks on the growth, Feed conversion, Malabsorption of fats syndrome and intestinal flora. **Poult. Sci.**, v. 52, n. 1, p. 197-203, 1973.

TSAI, C. C.; HSIH, H. Y.; CHIU, H. H.; LAI, Y. Y.; LIU, J. H.; YU, B.; TSEN, H. Y. Antagonistic activity against Salmonella infection in vitro and in vivo for two Lactobacillus strains from swine and poultry. **I. J. Food Microbiol.**, v. 102, n. 2, p. 185-194, 2005.

TYNKKYNEN, S.; SATOKARI, R.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T.; SAXELIN, M. Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of Lactobacillus rhamnosus and *L. casei*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 4, p. 3908-3914, 1999.

YAMAMOTO, H.; WATANABE, H.; MIKAMI, T. Distribution of immunoglobulin and secretory component containing cells in chickens. **Am. J. Vet. Res.**, v. 38, n. 8, p.1227–1230, 1977.

UENISHI, G., FUJITA, S., OHASHI, G., KATO, A., YAMAUCHI, S., MATSUZAWA, T., USHIDA, K. Molecular Analyses of the intestinal microbiota of chimpanzees in the wild and in captivity. **Ame. Jour. Primatol.**, v. 69, n. 5, p. 367-376, 2007.

VAN COILLIE, E.; GORIS, J.; CLEENWERCK, I.; GRIJSPEERDT, K.; BOTTELDOORN, N.; VAN IMMERSEEL, F.; HEYNDRICKX, M. Identification of lactobacilli isolated from the cloaca and vagina of laying hens and characterization for potential use as probiotics to control *Salmonella* Enteritidis. **J. of App. Microbiol.** v. 102, n. 4, p. 1095-1106, 2007.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiol. Rev.**, v. 60, n. 5, p. 407-438, 1996.

VAN DER WIELEN, P. W.; LIPMAN, L. J.; VAN KNAPEN, F.; BIESTERVELD, S. Competitive exclusion of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis by *Lactobacillus crispatus* and *Clostridium lactatifermentans* in a sequencing fed-batch culture. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 2, p. 555-559, 2002.

VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; DE SMET I, M. J.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Dynamics of immune cell infiltration in the cae-cal lamina propria of chickens after neonatal infection with a *Salmonella enteritidis* strain. **Dev Comp Immunol.**, v. 26, n. 4, p. 355–364, 2002.

VAN IMMERSEEL, F.; BOYEN, F.; GANTOIS, I.; TIMBERMONT, L.; BOHEZ, L.; PASMANS, F.; DUCATELLE, R. Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of *Salmonella* in poultry. **Poult. Sci.**, v. 84, n. 12, p. 1851-1856, 2005.

VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; BOYEN, F.; BOHEZ, L.; PASMANS, F.; VOLF, J.; DUCATELLE, R. Medium chain fatty acids decrease colonization and invasion through hlaA suppression shortly after infection of chickens with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 6, p. 3582–3587, 2004.

VAN IMMERSEEL, F.; CAUWERTS, K.; DEVRIESE, L. A.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Feed additives to control *Salmonella* in poultry. **World's Poult. Sci. J.**, v. 58, n. 4, p. 501–513, 2002.

VAUGHAN, E. E., SCHUT, F., HEILIG, H. G. H. J., ZOETENDAL, E. G., DE VOS, W. M., & AKKERMANS, A. D. A molecular view of the intestinal ecosystem. **Curr. Issues Intest. Microbiol.**, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2000.

VELDMAN, K.; CAVACO, L. M.; MEVIUS, D.; BATTISTI, A.; FRANCO, A.; BOTTELDOORN, N.; AARESTRUP, F. M. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. **J. Antimicrob. chemotherapy.** (2011): dkr084.

VIDANARACHCHI, J. K.; MIKKELSEN, L. L.; SIMS, I. M.; IJI, P. A.; CHOCT, M. Selected plant extracts modulate the gut microflora in broilers. **Aust. Poult. Sci. Symp.** 2006. p.145–148.

VILA, B. et al. Reduction of *Salmonella enterica* var. Enteritidis colonization and invasion by *Bacillus cereus* var. toyoi inclusion in poultry feeds. **Poult. Sci.** v. 88, n. 5, p. 975-979, 2009.

WISEK, W.J. The mode of growth promotion by antibiotics. **J. Anim. Sci.**, v.46, p.1447-1469, 1978.

VOGEL, G., 2008. Clinical trials. Deaths prompt a review of experimental probiotic therapy. **Science.**, v. 19, n. 557, 2008.

VON WINTZINGERODE, F.; GOEBEL, U. B.; STACKEBRANDT, E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 21, n. 4, p. 213–229, 1997.

WALLIS, T S.; GALYOV, E. E. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. **Molec. Microbiol.**, v. 36, n. 8, p. 997-1005, 2000.

WANG, Z. Y.; SHI, S. R.; XU, M. J.; YANG, H. M. 16S rRNA-based analysis of bacterial diversity in the microbial flora of the goose intestinal tract. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.18, p.531-540, 2009.

WANG, Y.; ZHANG, Z. S.; NARENDRAKUMAR, R. The actinomycete *Thermobispora bispora* contains two distinct types of transcriptionally active 16S rRNA genes. **J. Bacteriol.**, v. 179, n. 5, p. 3270–3276, 1997.

WARTELL, R.; HOSSEINSI, M.; MORANC, P. Detecting base pair substitutions in DNA fragments by temperature-gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids**, 1990.

WALTER, J.; HERTEL, C.; TANNOCK, G. W.; LIS, C. M.; MUNRO, K.; HAMMES, W. P. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 2, p. 2578-2585, 2001.

WALTER, J.; TANNOCK, G. W.; TILSALA-TIMISJARVI, A.; RODTONG, S.; LOACH, D. M.; MUNRO, K.; ALATOSSAVA, T. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. **Appl. Environ. Microbiol.** V. 66, n. 3, p. 297-303, 2000.

WIGLEY, P.; KAISER, P. Avian cytokines in health and disease. **Ver. Bras. Ci. Avícola.**, v. 5, n. 1, p. 1-14, 2003.

WILLIAMS, L. D.; BURDOCK, G. A.; JIMÉNEZ, G.; CASTILLO, M. Literature review on the safety of toyocerin, a non-toxigenic and non-pathogenic *Bacillus cereus* var. *toyoi* preparation. **Reg. Toxicol. Pharmacol.**, v. 55, n. 2, p. 236–246, 2009.

WHYTE, P.; GILL, M C.; COLLINS, K.; GORMLEY, E. The prevalence and PCR detection of Salmonella contamination in raw poultry. **Vet. Microbiol.**, v. 89, n. 1, p. 53–60, 2002.

WILLIAMS, B. A.; VERSTEGEN, M. W. A.; TAMMINGA, S. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. **Nutr, Res. Rev.**, v.14, n. 1, p.207–227, 2001.

WILLIAMS, J. E.; WHITTEMORE, A. D. Influence of age on the serological response of chickens to Salmonella typhimurium infection. **Avian Dis.** v. 19, n. 8, p. 745–760, 1975.

WOO, P. C.; TSOI, H. W.; WONG, L. P.; LEUNG, H. C.; YUEN, K. Y. Antibiotics modulate vaccine-induced humoral immune response. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 6, n. 6, p. 832-837, 1999.

WOJTCZAK, L.; WIĘCKOWSKI, M. R. The mechanisms of fatty acid-induced proton permeability of the inner mitochondrial membrane. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 31, n. 3, p. 447–455, 1999.

WOLFENDEN, A. D.; VICENTE, J. L.; HIGGINS, J. P.; ANDREATTI FILHO, R. L.; HIGGINS, S. E.; HARGIS, B. M.; TELLEZ, G. Effect of organic acids and probiotics on Salmonella enteritidis infection in broiler chickens. **Int. J. Poult. Sci** 6 (2007): 403-405.

WUYTS, A.; PROOST, P.; VAN DAMME, J. Interleukin-8 and other CXC chemokines. In: Thomson, A. W. **The Cytokine Handbook**. Academic Press: San Diego. 1998. p.229-269.

YAMAWAKI, R. A.; MILBRADT, E. L.; COPPOLA, M. P.; RODRIGUES, J. C. Z.; ANDREATTI FILHO, R. L.; PADOVANI, C. R.; OKAMOTO, A. S. Effect of immersion and inoculation in ovo of *Lactobacillus* spp. in embryonated chicken eggs in the prevention of *Salmonella* Enteritidis after hatch. **Poult. Sci.**, v. 92, n. 6, p. 1560-1563, 2013.

YIN, Y.; LEI, F.; ZHU, L.; LI, S.; WU, Z.; ZHANG, R.; WANG, X. Exposure of different bacterial inocula to newborn chicken affects gut microbiota development and ileum gene expression. **ISME J.**, v. 4, n. 1, p. 367–376, 2010.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. 5th ed. Prentice Hall, New Jersey. 2009.

ZOETENDAL, E. G.; AKKERMANS, A. D. L.; DE VOS, W. M. Temperature gradient gel electrophoresis analysis from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 3854-3859, 1998.

ZHU, X. Y.; JOEGERT, R. D. Composition of microbiota in content and mucus from cecae of broiler chickens as measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific, 16S rRNA-targeted Oligonucleotide Probes. **Poult. Sci.**, v. 82, p. 1242-49, 2003.

ZHU, X. Y.; ZHONG, T.; PANDYA, Y.; JOERGER, R. D. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of boiler chickens. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 68, n. 1, p. 124-137, 2002

ZHU, X. Y.; JOERGER, R. D. Composition of microbiota in content and mucus from cecae of broiler chickens as measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific, 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Poult. Sci.**, v. 82, n. 8, p. 1242-1249, 2003.