

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

DETECÇÃO DE LINFÓCITOS T NO INTESTINO DE FRANGOS DE
CORTE TRATADOS COM *Lactobacillus* spp. E DESAFIADOS COM
Salmonella Enteritidis

JOSÉ CHARL NOUJAIM

BOTUCATU – SP
Dezembro/2005

JOSÉ CHARL NOUJAIM

**DETECÇÃO DE LINFÓCITOS T NO INTESTINO DE FRANGOS DE
CORTE TRATADOS COM *Lactobacillus* spp. E DESAFIADOS COM
Salmonella Enteritidis**

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

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

**BOTUCATU
2005**

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

Noujaim, José Charl.

Detecção de linfócitos T no intestino de frangos de corte tratados com *Lactobacillus* spp. e desafiados com *Salmonella* Enteritidis / José Charl Noujaim. – 2005.

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

Orientador: Raphael Lucio Andreatti Filho

Assunto CAPES: 50501062

1. Imunidade celular 2. Aves 3. Salmonella

CDD 616.079

Palavras-chave: Ave; Imunoistoquímica; *Lactobacillus*; Probiótico; *Salmonella*

JOSÉ CHARL NOUJAIM

**DETECÇÃO DE LINFÓCITOS T NO INTESTINO DE FRANGOS DE
CORTE TRATADOS COM *Lactobacillus* spp. E DESAFIADOS COM
Salmonella Enteritidis**

Banca Examinadora:

Raphael Lucio Andreatti Filho

Paulo Lourenço da Silva

Renée Laufer Amorim

Botucatu, 09 de dezembro de 2005.

Aos meus pais
SAMI YOUSSEF NOUJAIM e
URSOLINA FAIDIGA NOUJAIM,
pelo amor, pelo exemplo de vida, por todos os
ensinamentos, pela honestidade e coragem, pelo trabalho -
com muitos carneiros recheados-, pelas oportunidades e
confiança, pela determinação, fé em DEUS e
pelo orgulho de ter vocês como pais,

Às minhas irmãs
HUDA MARIA NOUJAIM,
SORAIA CRISTINA NOUJAIM e
PATRICIA MALVINA NOUJAIM,
pela maravilhosa vida de harmonia, amizade,
tolerância, exemplos de honestidade, determinação, coragem e
trabalho, compreensão , paz, e muito amor,

Ao meu orientador
prof. RAPHAEL ANDREATTI,
pelas oportunidades, confiança,
ensinamentos, conselhos, companheirismo e amizade
na realização desse projeto,

DEDICO ESSE TRABALHO.

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo a Deus, pela vida maravilhosa e oportunidades que me oferece todos os dias, e à minha família (pais e irmãs), pela credibilidade, confiança, apoio e oportunidade.

Agradeço ao prof. Raphael por ter me recebido, primeiramente como estagiário, e depois como orientado, e dado a oportunidade de trabalhar em sua equipe e realizar um sonho.

Agradeço aos meus professores José Fernando Garcia, sua esposa Caris e ao Marcelo Meireles, da UNESP de Araçatuba, pela confiança e recomendação.

Agradeço a todos os amigos que me ajudaram, direta e indiretamente, na realização desse trabalho. Aos amigos e amigas, como Julio Simões Marcondes, Camila de Paula Freitas, Caio Burini, Alfredo Lima (“Cabelo”), Junior (“Jr”), Paola (“Strags”), Edna (“Galega”), Marcela (“Marcelesa”), Guilherme Marieto, Silvia, Aline, Catharine, Adriano (“Japonês”), Fábio (“Gambiarra”), Louisiane, Mércia, Leandro, Camila, e todos os outros que conviveram e me apoiaram nessa trajetória.

Ao amigo Rafael Torres Neto que teve disposição, vontade, companheirismo e paciência para me ensinar e ajudar na realização das 920 reações de imunoistoquímica feitas nesse trabalho.

À Vanessa Riesz Salgado (“Vã”, minha namorada), pela força, confiança, paciência e carinho.

Aos professores Lígia Boretti, Renée L. Amorim, Noeme Rocha, Julio Lopes Sequeira, pela confiança prestada, convivência amiga e sempre prazerosa, e por todos os ensinamentos e atenção nos momentos de dúvidas.

Agradeço a todos os funcionários da FMVZ – Botucatu, sempre dispostos à desejar um bom dia e a fazer uma “brincadeira” todas as vezes nas quais nos encontramos, e em especial ao Mauri Raul e ao Sr. Antônio Matiazzi, sempre prestativos e amigos.

Ao amigo Paulo Roberto Gratão, que iniciou esse trabalho de maneira tão brilhante.

Ao professor Adalberto José Crocci, pelo auxílio e orientação na análise estatística.

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

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 - Quantidade de bactérias administrada nos tratamentos fornecidos às aves com as culturas de <i>Lactobacillus</i> spp. ou microbiota cecal (MC) e desafiadas com <i>S. Enteritidis</i> .	17
TABELA 2 - Anticorpos utilizados para marcação de linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+.	18
TABELA 3 - Quantidade de linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+ no duodeno, jejuno e cecos de aves tratadas com <i>L. reuteri</i> e desafiadas com <i>S. Enteritidis</i> .	22
TABELA 4 - Quantidade de linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+ no duodeno, jejuno e cecos de aves tratadas com <i>L. salivarius</i> e desafiadas com <i>S. Enteritidis</i> .	23
TABELA 5 Quantidade de linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+ no duodeno, jejuno e cecos de aves tratadas com <i>L. acidophilus</i> e desafiadas com <i>S. Enteritidis</i> .	24
TABELA 6 Quantidade de linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+ no duodeno, jejuno e cecos de aves tratadas com microbiota cecal e desafiadas com <i>S. Enteritidis</i> .	25
TABELA 7 Médias da quantidade de linfócitos CD3+ no intestino de aves tratadas com <i>Lactobacillus</i> spp. ou microbiota cecal (MC) e desafiadas com <i>S. Enteritidis</i> (SE) em relação à idade (C.V.= 30,1%).	32
TABELA 8 Médias da quantidade de linfócitos CD3+ obtidas a partir dos tratamentos com <i>Lactobacillus</i> spp. ou microbiota cecal (MC) e desafiadas com <i>S. Enteritidis</i>	

	microbiota cecal (MC) e desafiadas com <i>S. Enteritidis</i> (SE), em relação aos segmentos intestinais (C.V.=30.1%).	34
TABELA 9	Médias da quantidade de linfócitos CD4+ no intestino de aves tratadas com <i>Lactobacillus</i> spp. ou microbiota cecal (MC) e desafiadas com <i>S. Enteritidis</i> (SE), em relação à idade (C.V.= 29,2%).	35
TABELA 10	Médias da quantidade de linfócitos CD4+ obtidas a partir dos tratamentos com <i>Lactobacillus</i> spp. ou microbiota cecal (MC) e desafiadas com <i>S. Enteritidis</i> (SE), em relação aos segmentos intestinais (C.V.=29.2%).	37
TABELA 11	Médias da quantidade de linfócitos CD8+ no intestino de aves tratadas com <i>Lactobacillus</i> spp. ou microbiota cecal (MC) e desafiadas com <i>S. Enteritidis</i> (SE), em relação à idade (C.V.=26,7%).	38
TABELA 12	Médias da quantidade de linfócitos CD8+ obtidas a partir dos tratamentos com <i>Lactobacillus</i> spp. ou microbiota cecal (MC) e desafiadas com <i>S. Enteritidis</i> (SE), em relação aos segmentos intestinais (C.V.=26.7%).	39
TABELA 13	Médias da quantidade de linfócitos CD3+ em relação a idade das aves e segmento intestinal (C.V.=30.1%).	40
TABELA 14	Médias da quantidade de linfócitos CD4+ em relação a idade das e segmento intestinal (C.V.=29.2%).	41
TABELA 15	Médias da quantidade de linfócitos CD8+ em relação a idade das aves e segmento intestinal (C.V.=26.7%).	42

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA1 - Imunomarcacão de linfócitos CD3+ (seta) na membrana basal do duodeno de ave com 12 dias de idade e tratada com microbiota cecal (40x).	26
FIGURA 2 - Imunomarcacão de linfócitos CD3+ (seta) na membrana basal do jejuno de ave com oito dias de idade e tratada com <i>L. salivarius</i> (40x).	27
FIGURA 3 - Imunomarcacão de linfócitos CD4+ (seta) na membrana basal do ceco de ave com dois dias de idade e tratada com <i>L. reuteri</i> (40x).	28
FIGURA 4 - Imunomarcacão de linfócitos CD4+ (seta) na membrana basal do duodeno de ave com quatro dias de idade e tratada com <i>L. acidophilus</i> (40x).	29
FIGURA 5 - Imunomarcacão de linfócitos CD8+ (seta) na membrana basal do duodeno de ave com oito dias de idade e tratada com <i>L. salivarius</i> (40x).	30
FIGURA 6 - Imunomarcacão de linfócitos CD8+ (seta) na membrana basal do jejuno de ave com quatro dias de idade, tratada com <i>L. acidophilus</i> e desafiada com <i>S. Enteritidis</i> (40x).	31
FIGURA 7 Médias da quantidade de linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+ em cada tratamento/desafio, independente do segmento intestinal e da idade das aves.	42

SUMÁRIO

	PÁGINAS
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	ixii
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Importância e saúde pública	4
2.2. Exclusão competitiva e <i>Lactobacillus</i> spp	6
2.3. Imunidade celular	9
3. OBJETIVOS	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1. Local	15
4.2. Aves utilizadas	15
4.3. Preparo das culturas da microbiota cecal e <i>Lactobacillus</i> .	15
4.4. Preparo do inóculo de <i>Salmonella</i> Enteritidis	16
4.5. Delineamento experimental	17
4.6. Imunoistoquímica	17
4.7. Análise estatística	20

5. RESULTADOS	22
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÕES	49
8. BIBLIOGRAFIA	51

NOUJAIM, J. C. Detecção de linfócitos T no intestino de frangos de corte tratados com *Lactobacillus* spp. e desafiados com *Salmonella* Enteritidis. Botucatu, 2005, 64p., Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar por meio de imunoistoquímica se a inoculação oral de culturas de *Lactobacillus acidophilus*, *L. reuteri*, *L. salivarius* e a microbiota cecal de aves estimula a resposta imune celular no intestino de pintos de linhagem comercial, desafiadas ou não por *Salmonella* Enteritidis, na forma de infiltrado leucocitário por células T CD3+, CD4+ e CD8+. Foram utilizados 320 aves com um dia de vida, não sexados e livres de quimioterápicos. Cada grupo foi subdividido em quatro subgrupos com 20 aves cada e classificados em grupo que não recebeu tratamento (controle negativo), tratamento com L. spp ou MC, tratamento com L. spp ou MC e desafio com S. Enteritidis e tratamento com S. Enteritidis (controle positivo). Os resultados obtidos mostram que o tratamento com L. reuteri, L. salivarius, L. acidophilus ou microbiota cecal e o desafio com S. Enteritidis, determina resposta imune na forma de infiltrado leucocitário por linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+ no epitélio e na lâmina própria do duodeno, jejuno e ceco de aves com até 12 dias de idade.

Palavras chave: probiótico; *Lactobacillus*; *Salmonella*; imunoistoquímica, frango de corte.

NOUJAIM, J. C. Detection of T lymphocytes in gut of broiler chicken treated with *Lactobacillus* spp. and challenged with *Salmonella* Enteritidis; Botucatu, 2002, 64p, Masters dissertation – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista..

ABSTRACT

The bacteria of the *Lactobacillus* sort have been very studied currently had to its important paper in the process of competitive exclusion where they contribute in the reduction of pathogenically genus, in special infections for *Salmonella* spp. it saw oral in the first days of life. These bacteria with probiotically characteristics provide beneficial effect to the general health of the host, through the stimulation and anti tumor modulation of the immune reply and properties, had probably the action on the cellular immune system. The objective of this work was to verify if *Lactobacillus acidophilus*, *L. reuteri*, *L. salivarius* and microbiota cecal of broiler chicken have been imunostimulated activities through its inoculation in birds of commercial ancestry with one day of life, defied or not for *Salmonella* Enteritidis, determining immune reply in the form of infiltrated leucocytes for cells T in the epithelium and intestinal proper blade. The gotten results demonstrate that the cultures of *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. salivarius* and microbiota cecal defy or not with *S. Enteritidis*, they determine immune reply on the part of the host in the infiltrated form of leucocytes for lymphocytes CD3+, CD4+ and CD8+.

Key words: probiotics, *Lactobacillus*; *Salmonella*; Immunohistochemistry, broiler.

1. INTRODUÇÃO

Nos sistemas modernos de produção avícola a utilização de antibióticos, como promotores de crescimento, é uma prática amplamente adotada. Antibióticos são também utilizados com o objetivo de manter a saúde das aves e conter a disseminação de doenças, como a salmonelose aviária. Porém, a utilização de antibióticos e quimioterápicos no controle de *Salmonella* é prática pouco confiável uma vez que, além de alterar a microbiota normal das aves, não eliminam totalmente a excreção fecal de *Salmonella* contribuindo para a manutenção desta bactéria nos plantéis avícolas. Além disso, o uso indiscriminado por longos períodos de tempo tem causado inquietação pública a respeito dos impactos dessas drogas sobre o meio ambiente.

Há, então, uma forte pressão, tanto nacional como internacional, para a abolição do uso dessas drogas incorporadas à ração das aves. Assim, o uso de produtos alternativos, como os probióticos e produtos de exclusão competitiva, estão ganhando importância cada vez maior no cenário avícola atual.

O objetivo deste trabalho foi verificar por meio de imunoistoquímica se a inoculação oral de culturas de *Lactobacillus acidophilus*, *L. reuteri*, *L. salivarius* e a microbiota cecal de aves estimula a resposta imune celular no intestino de pintos de linhagem comercial, desafiadas ou não por *Salmonella* Enteritidis, na forma de infiltrado leucocitário por células T CD3+, CD4+ e CD8+.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Importância e Saúde Pública

Produtos probióticos e prebióticos, embora não apresentem todas as ações benéficas dos antibióticos, não determinam resíduos nos produtos de origem animal, e não desenvolvem resistência às drogas utilizadas em seres humanos, por serem produtos essencialmente naturais, o que lhes coloca em posição de destaque em todos os segmentos da cadeia de produção e consumo de proteína animal (ANDREATTI FILHO et al., 2000).

O princípio de exclusão competitiva proporciona alguma proteção às aves contra a entrada de patógenos nos primeiros dias após o nascimento, uma vez que nesta idade as aves não possuem a microbiota intestinal plena, bem como o sistema imune ainda não se encontra completamente desenvolvido. Em condições normais, as aves jovens recebem a microbiota principalmente da mãe, e em galinhas e peruas, a transferência de microrganismos é muito eficiente quando os recém nascidos são criados próximos aos adultos. Devido ao sistema moderno de produção intensiva atualmente desenvolvido pela indústria avícola, o contato entre adultos e recém nascidos é impossibilitado, e a consequência é o retardo no desenvolvimento da microbiota intestinal protetora (FULLER, 1989; DAY, 1992).

A salmonelose é o termo que designa um grande grupo de doenças aviárias, agudas ou crônicas, causadas por um ou mais membros do gênero *Salmonella* (GAST, 1997). Atualmente, os sorotipos não têm sido mais escritos em itálico e sim da forma proposta por Popoff et al. (1996), onde o gênero *Salmonella* apresenta duas espécies: *Samonella enterica* com seis subespécies e *Salmonella bongori*. Assim, a designação de *Salmonella enteritidis* passa a ser *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis, ou de forma simplificada *Salmonella* Enteritidis.

Uma forma de transmissão muito importante de *Salmonella* entre as aves é a vertical ou transovariana, onde os pintos já nascem infectados, ou a bactéria tem contato com as aves através da casca do ovo no momento do nascimento. As aves assim infectadas eliminam a bactéria via fezes transmitindo-a horizontalmente aos pintos sadios que, logo após a eclosão, são altamente suscetíveis à infecção por *Salmonella*. A infecção de aves jovens

pode acarretar alta mortalidade ou colonização intestinal assintomática (GAST, 1997). Alguns sorotipos são mais restritos ao trato intestinal, enquanto outros são capazes de invadir a corrente circulatória, podendo desencadear septicemia (COOPER, 1994; BERCHIERI Jr & BARROW, 1995).

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

A infecção por *Salmonella* via oral se inicia através da colonização do trato gastrointestinal, o que é favorecido pela presença de sítios de ligação livres na mucosa intestinal de aves jovens. Após a colonização intestinal, a bactéria pode chegar via corrente sanguínea ao baço e fígado, onde se multiplica nas células retículo-endoteliais, levando à bacteremia e mortalidade. Nas aves onde há apenas a colonização intestinal, pode ocorrer a excreção de *Salmonella* até 28 semanas de idade (BARROW, 1999, 2000).

Além do aspecto econômico envolvido no controle da *Salmonella*, devido à mortalidade e refugagem das aves, esta bactéria tem também grande importância em saúde pública e o sorotipo de maior significância atualmente é o Enteritidis (POPPE, 1994), intrinsecamente relacionado com infecção alimentar por ovos e seus derivados (SMITH, 1989).

Nos EUA, surtos de infecção alimentar com amostras resistentes a varios antibióticos, como a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfas e tetraciclina, foram associados ao consumo de ovos contaminados, sendo o sorotipo mais importante o Enteritidis (CODY et al., 1999; VILLAR et al., 1999). Na Dinamarca, o relato de surto de infecção alimentar com *Salmonella* spp., foi caracterizado pela reduzida eficácia das fluorquinolonas no tratamento dos pacientes, além das cinco drogas citadas anteriormente (MOLBAK et al., 1999).

Carne e vísceras de aves domésticas também são fontes de infecção para seres humanos por meio da contaminação da carcaça pelo conteúdo intestinal durante o processamento (RUSSUL et al., 1996; ABOUZEED et al., 2000; BELI et al., 2000).

No Brasil também já foram relatados surtos de salmonelose humana originados do consumo de produtos avícolas contaminados em vários estados brasileiros como São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Distrito Federal, Espírito Santo, Pernambuco e Piauí (FALCÃO et al., 1975; ARAUJO et al., 1995; FUZIHARA et al., 1995; LÍRIO et al., 1995; MARTINS-VIEIRA et al., 1995; NUNES et al., 1995; PERES et al., 1995; PISANI et al., 1995).

2.2. Exclusão Competitiva e *Lactobacillus* spp.

Lilly & Stillwell (1965) foram os primeiros a utilizar o termo probiótico e, em 1973, o trabalho de Nurmi & Rantala representou o marco inicial das pesquisas envolvendo o conceito de exclusão competitiva. Neste trabalho, os autores verificaram que a administração via oral de cultura de bactérias intestinais produziu proteção contra a colonização cecal por *Salmonella* Infantis, semelhante à exibida por aves adultas.

O fornecimento da cultura de bactérias intestinais provenientes de aves adultas saudáveis para pintos de um dia induz a formação precoce de microbiota intestinal protetora, que inibe o crescimento de bactérias patogênicas pela redução do pH intestinal por meio da produção de ácidos graxos voláteis de cadeia curta, como ácido acético, propiônico e butírico; pela produção de peróxido de hidrogênio, o qual inibe o crescimento de certas bactérias anaeróbias; e pela produção de bacteriocinas com ação antibacteriana, podendo inativar ou matar outras espécies bacterianas (MICHAEL & WEI, 1997). As bactérias da microbiota intestinal normal, além de ocupar os sítios de ligação reduzindo a adesão de bactérias patogênicas ao epitélio intestinal, podem também atuar diretamente sobre as bactérias patogênicas, inibindo-as, já que bactérias probióticas podem produzir substâncias antimicrobianas como peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, ácido piroglutâmico, reuterina, e outras bacteriocinas (EDENS et al., 1997).

De acordo com Travi (2002), a ação dos probióticos no organismo se refere principalmente à inibição que estes exercem na colonização do intestino por bactérias patogênicas. Os mecanismos pelos quais os probióticos reduzem as bactérias patogênicas seriam a produção de substâncias bactericidas,

competição por nutrientes, alteração do metabolismo microbiano, e estimulação do sistema imunológico, a partir da capacidade de adesão à mucosa intestinal.

Segundo Sanders (1998) e Tannock (1999), as culturas probióticas são benéficas à saúde por serem capazes de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos através da exclusão competitiva e antagonismo, e por apresentarem característica imunomodulatória, imunoestimulante, atividades antimutagênicas, além de incrementarem e auxiliarem na digestão de lactose, e metabolizarem colesterol, diminuindo a absorção e reduzindo o risco de problemas cardiovasculares, bem como por manterem a integridade das mucosas, diminuindo, assim, a incidência e/ou duração de diarreias.

Nos primeiros anos do século XX, o cientista Elie Metchnikoff ressaltava a importância da ingestão continuada de *Lactobacillus* para a promoção da saúde e, nesta época, ele identificou o *Lactobacillus bulbaricus*, desenvolvendo um fermento que passou a ser largamente adicionado a produtos lácteos nos anos que se seguiram (METCHNIKOFF, 1907).

A microbiota intestinal é composta por várias espécies bacterianas, tendo grande destaque o gênero *Lactobacillus*, cujas espécies mais comuns como *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. animalis* e *L. acidophilus*, têm demonstrado grande importância à saúde intestinal das aves (GUSILIS et al., 1998; ZACCONI et al., 1999; PASCUAL et al., 1999; RAMESH et al., 2000). A administração de *L. acidophilus* a pintos de um dia proporcionou melhores índices zootécnicos e econômicos como conversão alimentar e ganho de peso, bem como beneficiou a digestibilidade de gordura (lipídios) e a retenção de nitrogênio (TORTUERO, 1973). Além da melhora nos fatores zoeconômicos, a administração de *Lactobacillus* se mostrou eficaz na proteção contra *Salmonella* spp., visto que aves tratadas com *L. acidophilus* durante duas semanas foram resistentes a desafios por *S. Gallinarum*, patógeno altamente específico para galinhas (RAMESH et al., 2000). *L. salivarius* também proporcionou proteção contra desafio por *S. Kedougou*, além de melhores índices zoeconômicos. Quando esta mesma espécie de *Lactobacillus* foi administrada diretamente no ingluvío, juntamente com cultura de *S. Enteritidis*, foi observado que o patógeno deixou de ser detectado nas aves 21 dias após o tratamento (ZACCONI et al., 1999; PASCUAL et al., 1999). *L. animalis* produziu

substâncias antimicrobianas com capacidade de inibir, *in vitro*, o crescimento de *S. Gallinarum* (GUSILIS et al., 1998).

Gusils et al. (1999) observaram adesão de *L. animalis* e *L. fermentum* nas células intestinais, concluindo que *L. fermentum* reduziu a colonização de *S. Pullorum*, enquanto *L. animalis* inibiu a adesão de *S. Pullorum*, *S. Enteritidis*, e *S. Gallinarum*. O gênero *Lactobacillus* faz parte da família *Lactobacteriaceae* e da tribo *Lactobacillae* (ORLA-JENSEN, 1921), apresentam colônias pequenas, apigmentadas, arredondadas, com bordas bem delimitadas, e aspecto cremoso. Produzem lactato e acetato que reduzem o pH do meio, exercendo efeito antibacteriano, excretam metabólitos que inibem bactérias patogênicas gram-negativas e gram-positivas, produzem vitaminas do complexo B, ativam o sistema imune contra células malignas e restauram a microbiota intestinal após antibioticoterapia (GIBSON & TOBERFROID, 1995).

A ação inibitória dos *Lactobacillus* ocorre na mucosa do trato gastrointestinal. Para que algumas espécies de *Lactobacillus* exerçam sua atividade probiótica é necessária a adesão destes aos enterócitos, evitando sua eliminação através do peristaltismo e permitindo a sobrevivência no ecossistema gastrointestinal. A adesão dos *Lactobacillus* à mucosa intestinal está relacionada à habilidade de hemaglutinar eritrócitos, ligação à manose e a glicolípídeos isolados presentes na mucosa intestinal, além do provável envolvimento de proteínas ou componentes protéicos como mediadores para a adesão (EDENS et al., 1997). Os *Lactobacillus* apresentam certa especificidade quanto ao segmento intestinal, pois espécies de *Lactobacillus* isoladas de duodeno e cecos tiveram pouco sucesso na adesão a células do íleo. Variações de temperatura entre quatro e 42°C não alteraram a capacidade de adesão às células do íleo, o que não ocorreu com variações de pH, pois valores de pH superiores a oito reduziram a capacidade de adesão dos *Lactobacillus* aos enterócitos (JIN et al., 1996).

2.3. Imunidade celular

O sistema digestivo deve permitir seletivamente a entrada de nutrientes, mas ao mesmo tempo deve limitar a entrada de agentes que possam ser nocivos. Simultaneamente, deve permitir exposição controlada de tais

substâncias e agentes para que o sistema imune produza as respostas de adaptação e de proteção correspondentes. As barreiras mucosas exercem uma série de mecanismos fisiológicos e imunológicos que procuram prevenir a exposição exagerada do sistema imune aos antígenos que possam estar presentes no intestino. A resposta imune é, por si mesma, muito complexa, principalmente no aparelho digestivo, devido à grande quantidade de elementos e fatores envolvidos.

Segundo Yamamoto & Kiyono (1999), o sistema imune da mucosa intestinal é uma eficiente barreira entre microrganismos patogênicos, ou comensais, e o hospedeiro.

De acordo com McDonald (1999), a imunidade celular da mucosa intestinal é constituída por células T, células B (responsáveis pela produção de anticorpos), células natural killer (NK), e células fagocíticas, como granulócitos e macrófagos. As células T ou linfócitos timo-dependentes ou ainda linfócitos CD3+, são constituídas de dois sub tipos de células: CD8+ ou células T citotóxicas, e CD4+ ou células T auxiliaadoras (T helper - Th), divididas em Th1 (responsável pela imunidade mediada por células) e Th2 (responsável pela imunidade mediada por anticorpos).

A presença de um antígeno no lúmen intestinal estimula resposta coletiva do tecido linfóide nos três maiores compartimentos do sistema imune da mucosa, ou seja, nas placas de Peyer (PP) que estão distribuídas ao longo de todo o intestino delgado, na lâmina própria (LP), e nos linfócitos intraepiteliais (LIE) distribuídos ao longo de todo o epitélio na face luminal do tecido mucoso (BRANDTZAEG, 1995). Porém, para estimular tal resposta, o antígeno é transportado através de célula especializada, denominada célula M, e associada ao epitélio do folículo das PP, até as células apresentadoras de antígenos (CAA) que irão apresentá-lo às células T e B, fazendo com que estas tornem-se ativadas, deixem as PP, e migrem, via vasos linfáticos e circulação periférica, para a mucosa proximal e distal onde irão emergir na LP (EARLE, et al., 1994), e onde as células B irão secretar IgA que será transportada através do epitélio até o lúmen do intestino, protegendo a superfície mucosa de toxinas e de outros agentes antigênicos (KRAEHENBUHL & NEUTRA, 1992), enquanto os linfócitos CD4+ e CD8+ irão se ativar quando entrarem em contato com um antígeno apropriado. Os linfócitos CD4+ irão auxiliar na diferenciação das

células B presentes no plasma, e os linfócitos CD8⁺ irão se deslocar ao longo do epitélio e se juntar à população de LIE presentes na membrana basal e constituída, basicamente, de células T e linfócitos timo-independentes (MOWATT & VINEY, 1997).

O tratamento com *Lactobacillus* spp. tem demonstrado possuir efeitos imunoestimulantes sobre a mucosa intestinal (JIN et al., 1997; CHAI et al., 2001; SIMON et al., 2001). Em humanos, a administração de *L. johnsoni* Lj1 aumentou a fagocitose *in vitro* de *Escherichia coli* (SCHIFFRIN, 1999). Em ratos que tiveram enterocolite induzida, a administração de *L. plantarum* aumentou os níveis intestinais de IgA e linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ na lâmina própria intestinal, além de reduzir a resposta inflamatória na mucosa (MAO et al., 1996).

Em aves, a presença de *Lactobacillus* spp. no intestino estimula a síntese de IgA pelo sistema imune através da liberação de peptídeos de cadeias curtas, aumentando, assim, a resistência a doenças (PULVERER, et al., 1990). Além disso, os *Lactobacillus* são capazes de modificarem suas propriedades imunoregulatórias (POUWELS, et al., 1996), alterando o perfil da indução de citocinas, com conseqüente influência sobre o resultado da resposta imune (MAASSEN, et al., 1998).

Dentro das características simbióticas e imunoregulatórias, os *Lactobacillus* desempenham um papel de vetores de antígenos, principalmente pela via oral, funcionando como suplemento imunogênico e, dessa forma, estimulando resposta imune intestinal que não representa ameaça ao hospedeiro, quando comparado com outro vetor biológico como, por exemplo, as salmonellas (GERRITSE, et al., 1990; POUWELS, et al., 1996). Dessa forma, a presença de *Lactobacillus* é fundamental para regular a composição da microbiota intestinal, desenvolver a imunidade do intestino e, também, promover a saúde das aves (MUIR, et al., 2000).

Os probióticos também estão relacionados a efeitos benéficos na terapia contra tumores, exercendo efeitos antimutagênicos e modulando a resposta imune, incluindo as células T, provavelmente devido à ação de citocinas sobre células CD4⁺ (ARISTILA et al., 1994; PELTO et al., 1998; SCHIFFRIN et al., 1997).

O sistema imune celular é fundamental na proteção contra infecções intestinais. Aves desafiadas com *Eimeria maxima*, um protozoário muito

agressivo à mucosa intestinal, apresentaram aumento na população de linfócitos T CD4+ e CD8+ no epitélio e na lâmina própria intestinal (BESSAY et al., 1996). Segundo Choi et al. (1999), a análise imunoistológica do tecido intestinal de ave infectada com *Eimeria acervulina* demonstrou grande quantidade de LIE no local, sugerindo que tais células estão envolvidas no processo de resistência a essa doença, e que a imunidade celular é a principal resposta do hospedeiro frente a um desafio por *Eimeria*.

De acordo com Bernt & Methner (2000), o desafio com *S. Enteritidis* induziu aumento no número de linfócitos T CD4+, CD8+, TcR2+ e TcR1+ na lâmina própria cecal de aves, quatro dias após a inoculação.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Verificar se a utilização de bactérias probióticas estimulam o sistema imune celular no intestino de aves jovens desafiadas ou não com *Salmonella* Enteritidis.

3.2. Específico

Quantificar a resposta imune em diferentes períodos de vida, por meio da detecção de células T no duodeno, jejuno e ceco das aves, identificando-as em CD4+ e CD8+.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local

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

As reações de imunoistoquímica foram feitas no Laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ - UNESP.

4.2. Aves utilizadas

Foram utilizados 320 pintos de corte de um dia de idade de linhagem comercial e não sexados. As aves foram alojadas em gaiolas de metal, mantidas sob aquecimento por 12 dias, recebendo água e ração comercial *ad libitum*, sem adição de antibióticos. Foram utilizadas apenas aves livres de *Salmonella*, comprovadas por meio de amostragem submetida a testes de isolamento e identificação de *Salmonella*, utilizando-se metodologia descrita por Williams (1984); Ewing (1986); Nagajara et al. (1991).

4.3. Delineamento experimental

As 320 aves utilizadas foram divididas em quatro grupos contendo 80 pintos cada e submetidas aos tratamentos com *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. acidophilus* e MC. Cada grupo foi subdividido em quatro subgrupos com 20 aves cada e classificados em subgrupo que não recebeu tratamento (controle negativo), subgrupo tratado com *L. spp* ou MC, subgrupo tratado com *L. spp* ou MC e desafiado com *S. Enteritidis* e subgrupo tratado com *S. Enteritidis* (controle positivo).

Nos períodos de dois, quatro, oito e 12 dias de vida, cinco aves de cada subgrupo foram sacrificadas por deslocamento cervical, e fragmentos de duodeno, jejuno e cecos foram removidos assepticamente e fixados em Bouin a 10% por 24 horas.

4.4. Preparo das culturas da microbiota cecal e *Lactobacillus*

A microbiota cecal foi obtida de três matrizes pesadas de 35 semanas de idade de linhagem comercial, sacrificadas por deslocamento cervical e necropsiadas assepticamente para retirada dos cecos, que foram cultivados em 10mL de caldo tioglicolato em jarra anaeróbia contendo o sistema Anaerobac®, por 24 horas a 40°C. Concomitantemente, este material também foi testado para verificar a presença de *Salmonella* spp. (WILLIAMS, 1984; EWING, 1986; NAGAJARA et al., 1991). As amostras positivas para *Salmonella* spp. foram descartadas. Após a incubação das placas, realizou-se a determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC) das bactérias intestinais e, para tanto, foram feitas diluições decimais seriadas em solução tampão de salina fosfatada (PBS) com pH 7,2. Destas diluições decimais, 0,1mL foi inoculado em placas de Petri contendo ágar tioglicolato e cultivadas em anaerobiose, por 24 horas a 40°C.

Inoculou-se 0,5mL da microbiota cecal diretamente no esôfago e inglúvio dos pintos de um dia de idade, utilizando-se pipeta graduada de 10mL.

Nos tratamentos com *Lactobacillus* utilizou-se as seguintes espécies: *L. acidophilus*, *L. reuteri* ou *L. salivarius*, isoladas de inglúvio e cecos de matrizes comerciais com 35 semanas de idade, identificadas bioquimicamente e armazenadas em caldo nutriente contendo 10% de glicerol, e congelados em nitrogênio líquido.

A identificação bioquímica foi realizada por meio do teste de fermentação de carboidratos, no qual as amostras de *Lactobacillus* foram semeadas em 3mL de caldo DeMan-Rugosa-Sharpe (MRS) isento de extrato de carne e glicose, adicionados de 0,002% de púrpura de bromocresol como indicador e individualmente, 0,01% dos seguintes carboidratos: arabinose, frutose, galactose, glicose, manitol, manose, maltose, sacarose, salicina e sorbitol. Os tubos foram incubados a 37°C por 48 horas (DAVIS, 1955; KANDLER & WEISS, 1986).

Cada criotubo contendo 1,5mL da cultura de *Lactobacillus* spp. foi descongelado, ressuspenso em caldo MRS, e incubado em anaerobiose durante 24 horas a 40°C antes da determinação das UFC do inóculo, que foi feita por meio de diluição decimal seriada do caldo MRS em PBS e plaqueamento de 0,1mL destas diluições em placas de Petri contendo ágar

MRS, incubado em anaerobiose por 48 horas a 40°C. A administração das culturas às aves foi realizada utilizando-se pipeta graduada de 10 mL, por meio do depósito de 0,5mL diretamente no esôfago e inglúvio das aves com um dia de vida.

4.5. Preparo do inóculo de *Salmonella* Enteritidis

Para o desafio, foi utilizada cepa de *S. Enteritidis* mutante, resistente ao ácido nalidíxico e à rifampicina, isolada de fígado de aves comerciais. Esta resistência foi desenvolvida através de cultivo sucessivo em ágar verde brilhante (BGA), contendo 100µg/mL de ácido nalidíxico e rifampicina (WEINACK et al., 1982). O inóculo foi obtido através do cultivo em caldo infusão de cérebro coração (BHI) e incubado a 40°C por 12 horas. O inóculo desafio foi quantificado através do número de UFC por ave, como descrito anteriormente. Para determinação do número de UFC, estas diluições foram plaqueadas em BGA acrescido dos antibióticos na quantidade de 100µg/mL. Após um período de incubação de 24 horas a 40°C foi feita a leitura com a determinação das UFC.

No terceiro dia de vida, cada ave recebeu 0,5mL da cultura desafio, através de depósito direto no esôfago e inglúvio com auxílio de pipeta graduada. A Tabela 1 mostra a quantidade de microrganismos presentes nos inóculos.

TABELA 1. Quantidade de bactérias administrada nos tratamentos fornecidos às aves com as culturas de *Lactobacillus* spp. ou microbiota cecal e desafiadas com *S. Enteritidis*.

Desafio com <i>S. Enteritidis</i>	Tratamentos			
	<i>L.reuteri</i>	<i>L. salivarius</i>	<i>L. acidophilus</i>	MC
1,0 x 10 ^{6*}	5,5 x 10 ⁷			
6,7 x 10 ⁵		2,8 x 10 ⁷		
1,0 x 10 ⁶			7,8 x 10 ⁶	
1,4 x 10 ⁶				7,0 x 10 ⁶

* Unidade formadora de colônia (UFC)/ave

4.6. Imunoistoquímica

As reações de imunoistoquímica foram feitas de acordo com protocolo utilizado no Laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP - Campus de Botucatu, descrita por HSU et al. (1981), para marcação em cortes conservados em parafina.

Uma vez fixados em Bouin a 10% por 24 horas, os fragmentos intestinais foram transferidos para uma solução de álcool 70%, incluídos em parafina, cortados na espessura de 3µm e colocados em lâminas histológicas previamente tratadas com organosilano (A3648 - Sigma Chemical CO.). Após esses procedimentos, as lâminas foram submetidas às reações de imunoistoquímica com anticorpos específicos para a marcação de linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+ (Tabela 2).

TABELA 2. Anticorpos utilizados para marcação de linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+.

Marcador/Anticorpo	Célula
CD3 (Polyclonal Rabbit Anti-human CD3, Dakocytomation BGA 0452).	Pan T
CD4 (Mouse Anti-Chicken CD4, UNLB, Southern Biotechnology Associates, Inc.).	Linfócito T auxiliador
CD8 (Clone: C8/144B - Dakocytomation CD8, T-cell BGM 7103).	Linfócito T citotóxico

As lâminas contendo os cortes com os segmentos intestinais das aves foram depositadas em cubas, com capacidade para alojar 19 lâminas cada uma, e submetidas a desparafinização com xilol a 60°C (em estufa) por 30 minutos, e xilol à temperatura ambiente por mais 20 minutos. Após, as lâminas passaram pelo procedimento de hidratação dos cortes por meio da passagem dessas em álcool 95%, sendo três incubações com álcool absoluto por cinco minutos cada uma, incubação em álcool 95% e 85% também por cinco minutos cada, incubação em hidróxido de amônia a 10% por 10 minutos e, finalmente, dez lavagens com água destilada. Em seguida, as lâminas foram transferidas para cubas horizontais para serem submetidas à recuperação antigênica pelo calor com a utilização de banho maria a 96°C com solução de EDTA (ácido etilenodiaminotetra acético sal dissódico), 10mM, pH 8,0, durante 30 minutos.

Ao término dessa etapa, as lâminas foram lavadas dez vezes com água destilada e incubadas duas vezes, durante cinco minutos cada, com solução tampão Tris¹, pH 7,5.

Após a recuperação antigênica, as lâminas foram incubadas com BSA (albumina sérica bovina) a 5% durante 60 minutos para a diminuição das marcações inespecíficas. Em seguida, a solução de BSA foi aspirada e, na superfície dos cortes, foi depositado 50µl da solução do anticorpo primário (CD3: 1:100; CD4: 1:25; CD8: 1:100) diluído com a solução de BSA a 5%, e incubadas por 18 horas a 4°C. Após a incubação, as lâminas foram lavadas dez vezes com água destilada antes de serem submetidas à etapa de incubação para bloqueio da peroxidase endógena, com água oxigenada 10 volumes. Essa incubação foi feita duas vezes durante 15 minutos cada uma. No final, as lâminas foram novamente lavadas dez vezes com água destilada e, mais uma vez, submetidas ao banho com Tris-solução tampão, por cinco minutos, antes de serem incubadas com anticorpo biotinilado e solução avidina-biotina-peroxidase do kit LSAB², por 30 minutos cada reação, em câmara úmida, à temperatura ambiente para as lâminas previamente incubadas com os anticorpos primários marcadores de linfócitos CD3+ e CD8+. Para as lâminas previamente submetidas à incubação com anticorpo primário marcador de linfócitos CD4+, foi utilizada a incubação com os reagentes do kit CSA³, por 15 minutos cada reação, seguindo as instruções do fabricante. Tanto após a utilização do kit LSAB, como após o uso do kit CSA, as lâminas foram, novamente, submetidas ao banho com Tris-solução tampão por duas vezes durante cinco minutos cada.

Ao término dessas etapas as lâminas foram submetidas à revelação com substrato cromogênico, para visualização da reação, por meio da utilização do DAB (3,3' diaminobenzidina) na concentração de 1mg/mL, durante cinco minutos, para as lâminas tratadas com o Kit LSAB e, durante 30 segundos, para as tratadas com o Kit CSA. Em seguida, foram submetidas à contracoloração com Hematoxilina de Mayer por 45 segundos, lavadas em água corrente por dez minutos, passadas em álcool 85% e 95%, incubadas em

¹ D5637 - Sigma Chemical CO.

² K0690-DAKO®

³ DAKO® Catalyzed Signal Amplification, específico para anticorpos anti-mouse

álcool absoluto por três vezes durante cinco minutos cada, incubadas duas vezes em xilol também durante cinco minutos e, finalmente, montadas utilizando-se resina sintética (Permount) e lâminulas.

Após as reações de imunoistoquímica foram realizadas as contagens das células marcadas em microscópio ótico (JENAMED 2 – Carlzeiss Jena) utilizando-se a objetiva de 40x. Os linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+ foram contados em dez campos aleatórios em cada um dos cortes de cada segmento (duodeno, jejuno e ceco) presentes nas lâminas histológicas.

4.7. Análise estatística

Foi utilizada a análise de variância de um delineamento inteiramente ao acaso (ZAR, 1996), com os tratamentos no esquema fatorial formados pelas combinações dos níveis dos seguintes fatores:

Fator 1 - Tratamentos nos níveis: microbiota cecal, *L. acidophilus*, *L. reuteri* e *L. salivarius*.

Fator 2 - Desafio nos níveis: aves tratadas e desafiadas, aves tratadas, aves desafiadas (controle positivo) e aves não tratadas e não desafiadas (controle negativo).

Fator 3 - Momentos nos níveis: dois, quatro, oito e 12 dias de idade das aves.

Foram utilizadas cinco repetições para cada tratamento, os quais foram comparados com relação às variáveis: contagem de linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+, ao nível de 5% de significância.

5. RESULTADOS

As médias dos números de linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+, obtidas em dez campos aleatórios, no duodeno, jejuno e cecos de cinco aves tratadas com *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. acidophilus* e microbiota cecal, desafiadas ou não com *S. Enteritidis*, estão expressas nas Tabelas 3, 4, 5 e 6.

TABELA 3. Média do número de linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+ no duodeno, jejuno e cecos de aves tratadas com *L. reuteri* e desafiadas ou não com *S. Enteritidis*, nas diferentes idades.

Tratamento	Idade (dias)	CD3+			CD4+			CD8+		
		Duod.	Jejuno	Ceco	Duod.	Jejuno	Ceco	Duod.	Jejuno	Ceco
<i>L. reuteri</i>	2	13,8*	11,0	9,4	7,6	9,0	6,2	19,6	18,8	7,7
	4	14,0	13,4	13,9	7,9	8,1	7,2	14,9	13,5	10,8
	8	15,2	8,4	14,4	6,6	6,4	4,0	17,0	15,5	13,4
	12	13,6	17,1	12,4	6,2	6,5	2,5	22,7	23,2	20,2
<i>S. Enteritidis</i>	2	14,8	15,0	11,1	9,9	7,4	6,6	27,5	28,8	19,5
	4	15,6	11,8	10,4	6,9	6,6	7,2	27,4	25,6	23,1
	8	12,4	6,9	7,5	7,2	3,7	4,3	27,3	23,4	21,2
	12	18,2	13,2	10,4	6,7	5,8	5,0	19,1	17,2	17,4
<i>L.reuteri</i> + <i>S. Enteritidis</i>	2	9,4	12,3	11,4	9,4	9,0	6,8	22,3	19,7	14,0
	4	16,2	19,5	18,7	6,7	6,2	5,2	16,1	18,9	15,5
	8	18,0	18,7	14,6	4,6	6,4	4,9	23,1	22,7	17,2
	12	20,5	19,1	18,0	4,9	5,7	4,0	24,0	21,5	18,6
Controle negativo	2	2,1	1,7	3,8	3,7	3,2	3,4	11,1	9,4	8,1
	4	3,7	3,7	3,8	3,0	3,4	2,8	5,9	8,7	6,3
	8	4,9	5,4	2,8	2,0	2,4	2,2	8,2	6,9	5,2
	12	7,7	9,8	4,3	4,5	3,6	2,3	10,0	8,8	10,7

* Média obtida de cinco aves da quantidade de linfócitos em dez campos por segmento intestinal.

TABELA 4. Média do número de linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+ no duodeno, jejuno e cecos de aves tratadas com *L. salivarius* e desafiadas ou não com *S. Enteritidis*, nas diferentes idades.

Tratamento	Idade (dias)	CD3+			CD4+			CD8+		
		Duod.	Jejuno	Ceco	Duod.	Jejuno	Ceco	Duod.	Jejuno	Ceco
<i>L. salivarius</i>	2	23,8*	17,6	14,5	7,4	5,9	5,4	20,9	10,0	7,0
	4	19,1	13,4	10,8	7,0	5,7	5,0	20,0	16,2	20,9
	8	18,7	22,3	16,4	4,5	5,1	4,6	24,2	21,5	25,8
	12	18,0	15,3	13,4	9,2	5,8	6,0	16,0	12,9	18,0
<i>S. Enteritidis</i>	2	14,8	15,0	11,1	9,9	7,4	6,6	27,5	28,8	19,5
	4	15,6	11,8	10,4	6,9	6,6	7,2	27,4	25,6	23,1
	8	12,4	6,9	7,5	7,2	3,7	4,3	27,3	23,4	21,2
	12	18,2	13,2	10,4	6,7	5,8	5,0	19,1	17,2	17,4
<i>L. salivarius</i> + <i>S. Enteritidis</i>	2	20,9	17,7	12,7	4,8	2,6	1,7	14,4	14,7	14,7
	4	19,5	22,1	12,2	2,9	3,7	2,6	16,3	9,8	15,8
	8	15,6	14,0	13,1	2,7	3,4	1,6	19,9	16,6	17,2
	12	23,5	25,6	11,3	4,9	5,7	4,0	15,6	13,5	16,4
Controle negativo	2	2,1	1,7	3,8	3,7	3,2	3,4	11,1	9,4	8,1
	4	3,7	3,7	3,8	3,0	3,4	2,8	5,9	8,7	6,3
	8	4,9	5,4	2,8	2,0	2,4	2,2	8,2	6,9	5,2
	12	7,7	9,8	4,3	4,5	3,6	2,3	10,0	8,8	10,7

* Média obtida de cinco aves da quantidade de linfócitos em dez campos por segmento intestinal.

TABELA 5. Média do número de linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+ no duodeno, jejuno e cecos de aves tratadas com *L. acidophilus* e desafiadas ou não com *S. Enteritidis*, nas diferentes idades.

Tratamento	Idade (dias)	CD3+			CD4+			CD8+		
		Duod.	Jejuno	Ceco	Duod.	Jejuno	Ceco	Duod.	Jejuno	Ceco
<i>L. acidophilus</i>	2	12,8*	12,5	12,4	7,4	5,9	5,4	19,2	16,3	9,8
	4	26,2	24,2	22,6	7,0	5,7	5,0	18,3	20,0	15,6
	8	43,3	44,1	33,4	4,5	5,1	4,6	21,4	18,5	14,9
	12	53,8	59,6	34,5	9,2	5,8	6,0	24,3	20,8	11,6
<i>S. Enteritidis</i>	2	14,8	15,0	11,1	9,9	7,4	6,6	27,5	28,8	19,5
	4	15,6	11,8	10,4	6,9	6,6	7,2	27,4	25,6	23,1
	8	12,4	6,9	7,5	7,2	3,7	4,3	27,3	23,4	21,2
	12	18,2	13,2	10,4	6,7	5,8	5,0	19,1	17,2	17,4
<i>L. acidophilus</i> + <i>S. Enteritidis</i>	2	27,9	27,9	19,8	4,8	2,6	1,7	15,1	9,7	7,8
	4	28,7	24,1	21,5	2,9	3,7	2,6	13,9	13,1	15,3
	8	39,7	32,5	25,5	2,7	3,4	1,6	15,2	15,2	17,4
	12	50,7	41,2	24,6	4,9	5,7	4,0	15,6	15,6	14,0
Controle negativo	2	2,1	1,7	3,8	3,7	3,2	3,4	11,1	9,4	8,1
	4	3,7	3,7	3,8	3,0	3,4	2,8	5,9	8,7	6,3
	8	4,9	5,4	2,8	2,0	2,4	2,2	8,2	6,9	5,2
	12	7,7	9,8	4,3	4,5	3,6	2,3	10,0	8,8	10,7

* Média obtida de cinco aves da quantidade de linfócitos em dez campos por segmento intestinal.

TABELA 6. Média do número de linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+ no duodeno, jejuno e cecos de aves tratadas com microbiota cecal e desafiadas ou não com *S. Enteritidis*, nas diferentes idades.

Tratamento	Idade (dias)	CD3+			CD4+			CD8+		
		Duod.	Jejuno	Ceco	Duod.	Jejuno	Ceco	Duod.	Jejuno	Ceco
Microbiota cecal	2	19,2*	17,3	16,0	7,6	9,0	6,2	24,8	23,1	17,3
	4	24,1	21,7	17,7	7,9	8,1	7,2	18,8	20,8	19,9
	8	35,6	31,4	22,5	6,6	6,4	4,0	21,4	26,4	18,7
	12	53,2	41,2	27,5	6,2	6,5	2,5	14,2	14,3	13,3
<i>S. Enteritidis</i>	2	14,8	15,0	11,1	9,9	7,4	6,6	27,5	28,8	19,5
	4	15,6	11,8	10,4	6,9	6,6	7,2	27,4	25,6	23,1
	8	12,4	6,9	7,5	7,2	3,7	4,3	27,3	23,4	21,2
	12	18,2	13,2	10,4	6,7	5,8	5,0	19,1	17,2	17,4
Microbiota cecal + <i>S. Enteritidis</i>	2	23,2	21,1	12,9	9,4	9,0	6,8	27,0	23,2	19,1
	4	38,8	27,4	18,8	6,7	6,2	5,2	25,3	27,0	18,0
	8	38,4	40,7	23,0	4,6	6,4	4,9	30,7	26,2	25,0
	12	46,1	39,5	24,6	4,9	5,7	4,0	27,0	26,6	22,9
Controle negativo	2	2,1	1,7	3,8	3,7	3,2	3,4	11,1	9,4	8,1
	4	3,7	3,7	3,8	3,0	3,4	2,8	5,9	8,7	6,3
	8	4,9	5,4	2,8	2,0	2,4	2,2	8,2	6,9	5,2
	12	7,7	9,8	4,3	4,5	3,6	2,3	10,0	8,8	10,7

* Média obtida de cinco aves da quantidade de linfócitos em dez campos por segmento intestinal.

A imunomarcção positiva para linfócitos CD3+ está ilustrada nas Figuras 1 e 2, sendo que na primeira esta ocorre na membrana basal do duodeno de ave com 12 dias de idade e tratadas com microbiota cecal (MC), enquanto na segunda ocorre no jejuno de ave com oito dias de idade e tratada com *L. salivarius*. As Figuras 3 e 4 mostram a imunomarcção positiva para linfócitos CD4+, sendo que na primeira esta ocorre no ceco de ave com dois dias de idade e tratada com *L. reuteri*, enquanto na segunda ocorre no duodeno de ave com quatro dias de idade e tratada com *L. acidophilus*. A imunomarcção positiva para linfócitos CD8+ está ilustrada nas Figuras 5 e 6. A Figura 5 retrata a marcação no duodeno de ave com oito dias de idade e tratada com *L. salivarius*, enquanto a Figura 6 ilustra o jejuno de ave com quatro dias de idade, tratada com *L. acidophilus* e desafiada com *S. Enteritidis*.

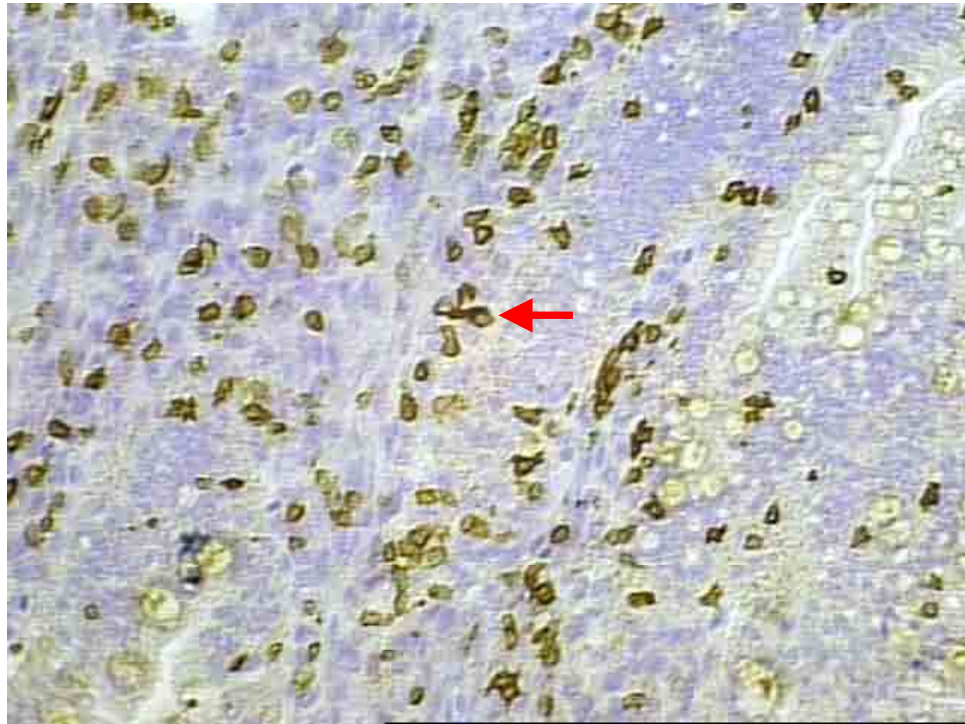


FIGURA 1. Imunomarcção de linfócitos CD3+ (seta) na membrana basal do duodeno de ave com 12 dias de idade e tratada com microbiota cecal (kit LSAB, DAB por cinco minutos, hematoxilina de Mayer, 40x).

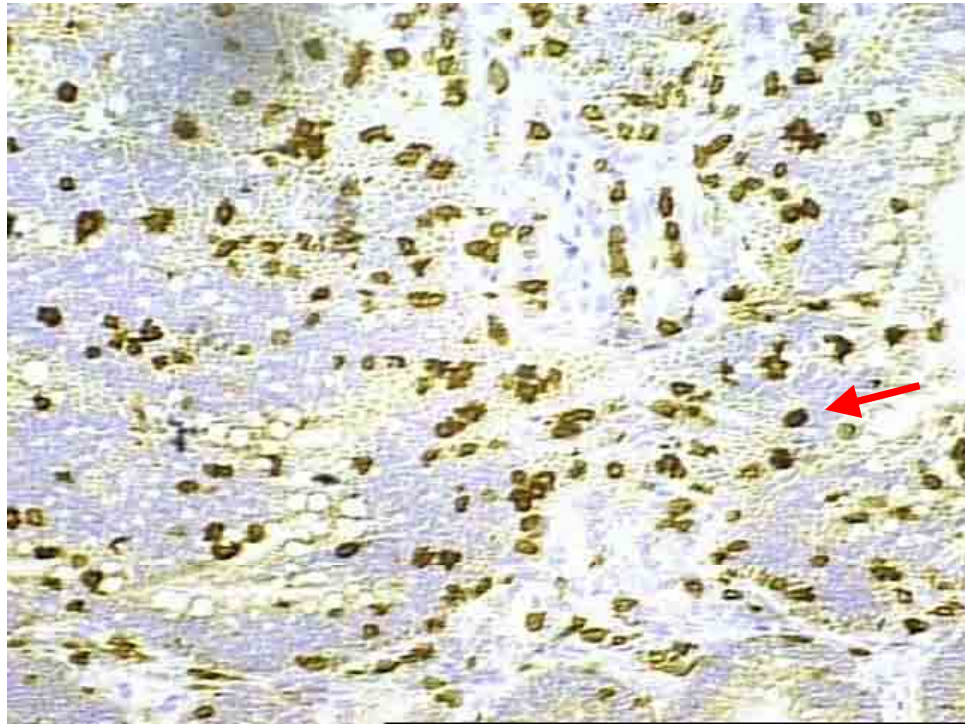


FIGURA 2. Imunomarcacão de linfócitos CD3+ (seta) na membrana basal do jejuno de ave com oito dias de idade e tratada com *L. salivarius* (kit LSAB, DAB por cinco minutos, hematoxilina de Mayer, 40x).



FIGURA 3. Imunomarcacão de linfócitos CD4+ (seta) na membrana basal do ceco de ave com dois dias de idade e tratada com *L. reuteri* (kit CSA, DAB por 30 segundos, hematoxilina de Mayer, 40x).



FIGURA 4. Imunomarcacão de linfócitos CD4+ (seta) na membrana basal do duodeno de ave com quatro dias de idade e tratada com *L. acidophilus* (kit CSA, DAB por 30 segundos, hematoxilina de Mayer, 40x).

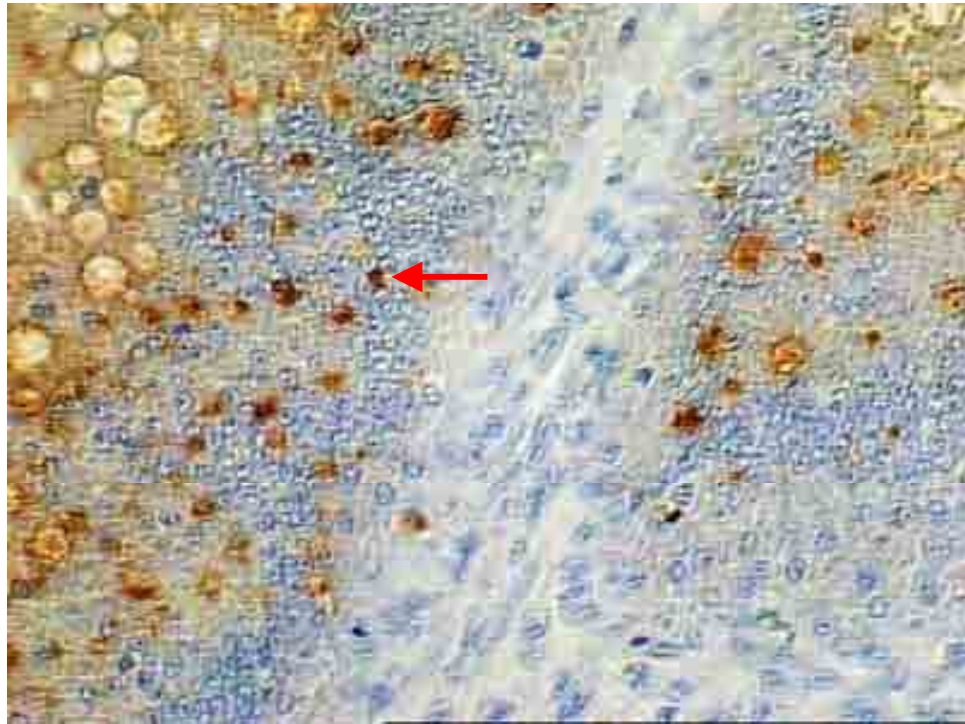


FIGURA 5. Imunomarcção de linfócitos CD8+ (seta) na membrana basal do duodeno de ave com oito dias de idade e tratada com *L. salivarius* (kit LSAB, DAB por cinco minutos, hematoxilina de Mayer, 40x).

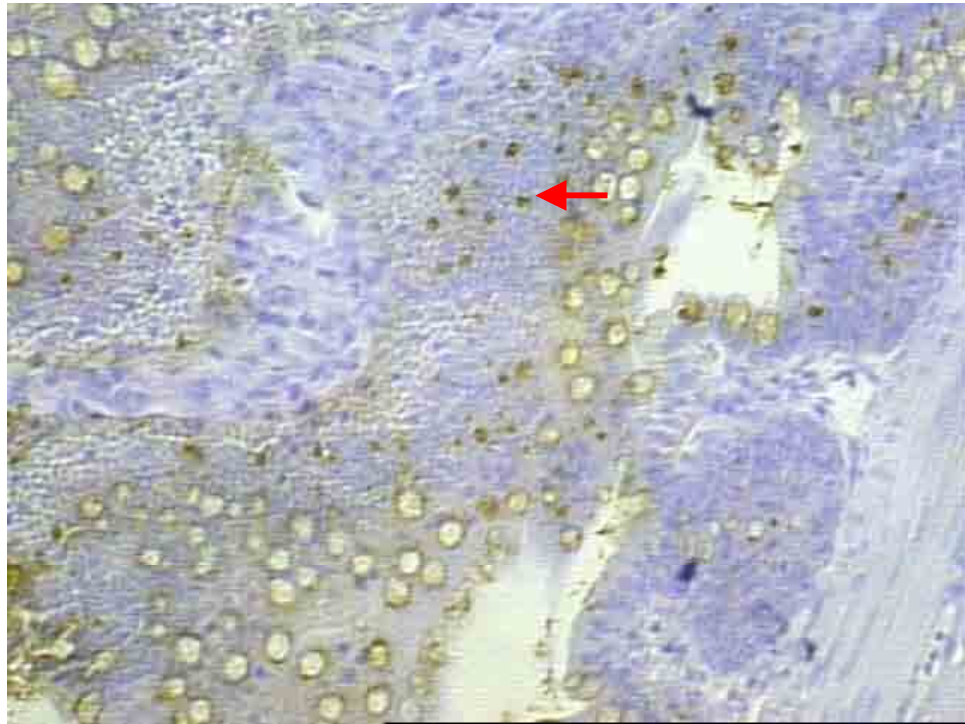


FIGURA 6. Imunomarcacão de linfócitos CD8+ (seta) na membrana basal do jejuno de ave com quatro dias de idade, tratada com *L. acidophilus* e desafiada com *S. Enteritidis* (kit LSAB, DAB por cinco minutos, hematoxilina de Mayer, 40x).

As médias da quantidade de linfócitos CD3+ no intestino de aves, obtidas após tratamentos com *Lactobacillus* spp. ou microbiota cecal, e desafiadas ou não com *S. Enteritidis* relacionadas com diferentes idades das aves, estão demonstradas na Tabela 7.

TABELA 7. Média do número de linfócitos CD3+ no intestino de aves tratadas com *Lactobacillus* spp. ou microbiota cecal e desafiadas com *S. Enteritidis* em relação à idade (C.V.= 30,1%).

Tratamento	Idade (dias)			
	2	4	8	12
Controle negativo	3,1 Aa	3,7 Aa	4,6 Aa	8,1 Ba
Controle positivo (<i>S. Enteritidis</i>)	14,6 Abc	13,5 Ab	11,0 Bb	14,7 Ab
<i>L. reuteri</i>	12,2 Ab	13,8 Ab	14,8 Ac	14,4 Ab
<i>L. salivarius</i>	21,5 Aef	18,1 Ac	22,4 Bd	15,6 Cb
<i>L. acidophillus</i>	12,6 Ab	24,3 Bd	42,8 Cg	49,3 Dg
Microbiota cecal	17,5 Adg	22,5 Bd	29,8 Ce	46,2 Dg
<i>L. reuteri</i> + <i>S. Enteritidis</i>	15,0 Ac	18,1 ABC	21,4 Bd	19,2 Bc
<i>L. salivarius</i> + <i>S. Enteritidis</i>	18,2 Ad	19,1 ACC	14,2 Bc	22,5 Cd
<i>L. acidophillus</i> + <i>S. Enteritidis</i>	25,2 Ac	24,8 Ad	32,6 Bef	41,0 Cf
Micrbiota cecal+ <i>S. Enteritidis</i>	19,1 Ade	28,3 Bf	34,1 Cf	36,7 Ce

Letras maiúsculas comparam médias de idade para cada tratamento (linhas).

Letras minúsculas comparam médias de tratamento para cada idade (colunas).

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

Observa-se na Tabela 7 que nos quatro momentos analisados para todos os tratamentos, houve diferença ($p<0,05$) entre o grupo controle negativo e os grupos tratados com *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. acidophillus* ou microbiota cecal, e desafiado ou não com *S. Enteritidis*, pois, quando as aves não são estimuladas por *Lactobacillus* spp. ou *S. Enteritidis*, não produzem resposta imune celular no intestino, comprovando-se que culturas de *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. acidophillus*, microbiota cecal e *S. Enteritidis*, determinam resposta imune por parte do hospedeiro na forma de infiltrado leucocitário por linfócitos CD3+ na mucosa e lâmina própria intestinal de aves jovens.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos com *S. Enteritidis*, *L. reuteri*, *L. acidophilus* e *L. reuteri* e *L. acidophilus*, desafiados com *S. Enteritidis* em aves com dois dias, e entre os tratamentos com *S. Enteritidis* e *L. reuteri* em aves com quatro e 12 dias de idade, evidenciando-se assim que a resposta imune na forma de infiltrado leucocitário por linfócitos CD3+ pode

ser estimulada tanto por bactérias probióticas (*Lactobacillus* spp.) como por bactérias patogênicas (*S. Enteritidis*).

Os grupos tratados com *L. acidophilus* ou microbiota cecal apresentaram diferença significativa entre as diferentes idades das aves, com médias crescentes da quantidade de linfócitos CD3+, concomitantemente com o desenvolvimento das aves. As médias observadas nestes mesmos tratamentos foram maiores que as médias da quantidade de linfócitos no tratamento com *S. Enteritidis*. Além disso, outro resultado observado foi o fato do tratamento controle negativo somente apresentar diferença significativa entre os três primeiros momentos (dois, quatro e oito dias) e o último dia de idade das aves (12dias), indicando que o intestino das aves, mesmo sem os tratamentos realizados, apresenta média do número de linfócitos CD3+ crescente com o aumento da idade das aves.

A Tabela 8 apresenta os resultados das médias de linfócitos CD3+ obtidos a partir do tratamento com *Lactobacillus* spp, microbiota cecal e desafios com *S. Enteritidis*, em relação aos diferentes segmentos analisados.

TABELA 8. Média do número de linfócitos CD3+ obtidas a partir dos tratamentos com *Lactobacillus* spp. ou microbiota cecal e desafiadas com *S. Enteritidis*, em relação aos segmentos intestinais (C.V.=30.1%).

Tratamento	Segmentos		
	Duodeno	Jejuno	Ceco
Controle negativo	4,7 Aa	5,3 Aa	4,7 Aa
Controle positivo (<i>S. Enteritidis</i>)	15,3 Ab	12,8 Bb	12,3 Bb
<i>L. reuteri</i>	14,2 Ab	14,0 Ab	13,2 Ab
<i>L. salivarius</i>	19,9 Ac	19,1 Ac	19,2 Ad
<i>L. acidophilus</i>	34,0 Ad	35,1 Ae	27,7 Bf
Microbiota cecal	33,0 Ad	27,9 Bd	26,1 Bf
<i>L. reuteri</i> + <i>S. Enteritidis</i>	18,5 Ac	19,3 Ac	17,5 Acd
<i>L. salivarius</i> + <i>S. Enteritidis</i>	19,9 Ac	19,8 Ac	15,8 Bc
<i>L. acidophilus</i> + <i>S. Enteritidis</i>	36,8 Ae	31,4 Be	24,5 Ce
Micrbiota cecal+ <i>S. Enteritidis</i>	36,6 Ae	32,2 Be	19,8 Cd

Letras maiúsculas comparam médias de idade para cada tratamento (linhas).

Letras minúsculas comparam médias de tratamento para cada idade (colunas).

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

Na Tabela 8 observa-se que houve diferença ($p<0,05$) entre o controle negativo e os tratamentos realizados, indicando, mais uma vez, que a presença de bactérias, sejam saprófitas ou patogênicas, determina resposta imune na forma de infiltrado leucocitário por linfócitos CD3+ na mucosa e lâmina própria do duodeno, jejuno e ceco de aves jovens.

Analisando-se cada um dos tratamentos nos diferentes segmentos, observa-se que não houve diferença ($p>0,05$) entre o controle negativo, tratamentos com *L. reuteri*, *L. salivarius* e *L. reuteri* desafiado com *S. Enteritidis*, nos três segmentos intestinais analisados. Além disso, é possível observar também que nos grupos tratados com *L. acidophilus* ou microbiota cecal, ambos desafiados com *S. Enteritidis*, houve diferença significativa entre a quantidade de linfócitos presentes nos três segmentos estudados, e a maior média no duodeno, seguido, respectivamente, pela quantidade de linfócitos no jejuno e ceco.

A Tabela 9 ilustra as médias da quantidade de linfócitos CD4+ obtidas no intestino a partir dos tratamentos com *Lactobacillus* spp. ou microbiota cecal, e desafiadas com *S. Enteritidis*, em relação às diferentes idades das aves.

TABELA 9. Média do número de linfócitos CD4+ no intestino de aves tratadas com *Lactobacillus* spp. ou microbiota cecal e desafiadas com *S. Enteritidis*, em relação à idade (C.V.= 29,2%).

Tratamento	Idade (dias)			
	2	4	8	12
Controle negativo	3,4 ACa	3,1 Aa	2,4 Ba	3,9 Ca
Controle positivo (<i>S. Enteritidis</i>)	8,0 Ac	6,9 Ab	6,2 Bb	6,6 Bb
<i>L. reuteri</i>	8,1 Ac	7,8 Ac	6,4 Bb	6,8 Ab
<i>L. salivarius</i>	6,7 ABb	7,4 Ac	6,0 Bb	7,0 BAb
<i>L. acidophilus</i>	6,7 Ab	7,4 Ac	5,9 Ab	6,9 Ab
Microbiota cecal	8,1 Ac	7,8 ACc	6,4 Bb	6,8 CDb
<i>L. reuteri</i> + <i>S. Enteritidis</i>	8,9 Ac	6,5 Bb	6,1 Bb	6,1 Bb
<i>L. salivarius</i> + <i>S. Enteritidis</i>	3,6 Aa	3,3 Aa	3,4 Aa	6,1 Bb
<i>L. acidophilus</i> + <i>S. Enteritidis</i>	3,6 Aa	3,3 Aa	3,4 Aa	3,1 Ba
Microbiota cecal+ <i>S. Enteritidis</i>	8,9 Ac	6,5 Bb	6,1 Bb	6,1 Bb

Letras maiúsculas comparam médias de idade para cada tratamento (linhas).

Letras minúsculas comparam médias de tratamento para cada idade (colunas).

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

Na Tabela 9 observa-se que nos três primeiros momentos (dois, quatro e oito dias de idade) não foram observadas diferenças ($p>0,05$) entre o controle negativo e o tratamento com *L. salivarius* e desafio com *S. Enteritidis*. Assim, não é possível afirmar que estes tratamentos promoveram resposta imune pelo hospedeiro na forma de infiltrado leucocitário por linfócitos CD4+ no epitélio e lâmina própria intestinal das aves. Pode-se observar também que as médias de linfócitos CD4+ obtidas com o controle negativo e os tratamentos com *L. salivarius* e *L. acidophilus*, desafiados com *S. Enteritidis*, foram menores que as obtidas nos demais tratamentos.

No entanto, aos 12 dias de idade houve diferença ($p<0,05$) na quantidade de linfócitos CD4+ entre o controle negativo e os grupos tratados com *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. acidophilus* ou microbiota cecal, e desafiadas com *S. Enteritidis*.

Não houve diferença ($p>0,05$) entre as médias de células T CD4+ em cada um dos tratamentos com o aumento da idade das aves. Assim, pode-se afirmar que para diferentes idades analisadas em um mesmo tratamento, não há estímulo da resposta imune intestinal de aves jovens na forma de infiltrado leucocitário por linfócitos CD4+ na mucosa e lâmina própria do intestino do hospedeiro.

As médias da quantidade de linfócitos CD4+ no intestino de aves obtidas a partir dos tratamentos com *Lactobacillus* spp. ou microbiota cecal, e desafiadas com *S. Enteritidis*, em relação aos diferentes segmentos intestinais das aves estão demonstradas na Tabela 10. Houve diferença ($p<0,05$) entre as médias da quantidade de linfócitos CD4+ do controle negativo e dos tratamentos com *Lactobacillus* spp ou microbiota cecal, e desafiadas com *S. Enteritidis*, no duodeno e jejuno das aves.

TABELA 10. Média do número de linfócitos CD4+ obtidas a partir dos tratamentos com *Lactobacillus* spp. ou microbiota cecal e desafiadas com *S. Enteritidis*, em relação aos segmentos intestinais (C.V.=29.2%).

Tratamento	Segmentos		
	Duodeno	Jejuno	Ceco
Controle negativo	3,5 Aa	3,1 Aa	3,0 Aa
Controle positivo (<i>S. Enteritidis</i>)	7,7 Ac	6,8 Bbe	6,3 Bbc
<i>L. reuteri</i>	7,4 ABc	7,9 Af	6,5 Bc
<i>L. salivarius</i>	7,9 Ac	6,6 Bcd	5,8 Bb
<i>L. acidophilus</i>	7,8 Ac	6,1 Bc	5,8 Bb
Microbiota cecal	7,4 ABc	7,9 Af	6,5 Bc
<i>L. reuteri</i> + <i>S. Enteritidis</i>	7,0 Ac	7,1 Ae	6,5 Ac
<i>L. salivarius</i> + <i>S. Enteritidis</i>	4,5 Ab	4,6 Ab	3,3 Ba
<i>L. acidophilus</i> + <i>S. Enteritidis</i>	4,5 Ab	4,6 Ab	3,3 Ba
Micrbiota cecal+ <i>S. Enteritidis</i>	7,0 Ac	7,1 Ae	6,5 Ac

Letras maiúsculas comparam médias de idade para cada tratamento (linhas).

Letras minúsculas comparam médias de tratamento para cada idade (colunas).

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

Constata-se que além da diferença ($p<0,05$) entre as médias da quantidade de linfócitos CD4+, seus valores são maiores nos grupos tratados quando comparados com o controle negativo. Assim, pode-se afirmar novamente que a presença de bactérias no lúmen intestinal determina resposta imune no duodeno e jejuno de aves jovens, na forma de infiltrado leucocitário por linfócitos CD4+. Já em relação ao ceco, não houve diferença ($p>0,05$) entre o controle negativo e os tratamentos com *L. salivarius* e *L. acidophilus*, e desafiados com *S. Enteritidis*.

Analisando-se cada tratamento em relação aos diferentes segmentos, observa-se que não houve diferença ($p>0,05$) entre o controle negativo e o tratamento com microbiota cecal desafiado com *S. Enteritidis*.

As médias da quantidade de linfócitos CD8+ obtidas no intestino a partir dos tratamentos com *Lactobacillus* spp. ou microbiota cecal, e desafiados com *S. Enteritidis*, em relação às diferentes idades das aves, estão demonstradas na Tabela 11.

TABELA 11. Média do número de linfócitos CD8+ no intestino de aves tratadas com *Lactobacillus* spp. ou microbiota cecal e desafiadas com *S. Enteritidis*, em relação à idade (C.V.=26,7%).

Tratamento	Idade (dias)			
	2	4	8	12
Controle negativo	9,5 Aa	7,0 Ba	6,8 Ba	10,6 Aa
Controle positivo (<i>S. Enteritidis</i>)	25,2 Ag	25,4 Ac	24,0 Af	18,0 Bcd
<i>L. reuteri</i>	17,1 Ade	13,9 Ab	15,3 Ab	22,0 Be
<i>L. salivarius</i>	16,8 ACd	20,4 Ad	23,8 Bf	15,6 Cb
<i>L. acidophilus</i>	15,8 Acd	18,0 ABc	19,3 Bcd	19,0 ABd
Microbiota cecal	21,7 Af	19,8 ABd	22,1 Ae	17,4 Bc
<i>L. reuteri</i> + <i>S. Enteritidis</i>	18,7 ABe	16,9 Ac	21,0 Bde	21,4 Be
<i>L. salivarius</i> + <i>S. Enteritidis</i>	14,6 Abc	14,9 ABb	17,9 Bc	16,2 Abc
<i>L. acidophilus</i> + <i>S. Enteritidis</i>	12,4 Ab	14,1 ABc	15,9 Bb	15,1 ABb
Micrbiota cecal+ <i>S. Enteritidis</i>	23,1 Afg	24,9 ABc	27,3 BCf	25,5 ACf

Letras maiúsculas comparam médias de idade para cada tratamento (linhas).

Letras minúsculas comparam médias de tratamento para cada idade (colunas).

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

Analisando-se a quantidade de linfócitos CD8+, observa-se que houve diferença ($p<0,05$) entre o controle negativo e todos os demais grupos, independente do tratamento e/ou desafio. Assim, é possível afirmar que culturas de *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. acidophilus*, microbiota cecal e *S. Enteritidis*, determinam resposta imune por parte das aves na forma de infiltrado leucocitário (linfócitos CD8+) no epitélio e na lâmina própria intestinal de aves jovens.

Ainda em relação à Tabela 11, observa-se que não houve diferença ($p>0,05$) entre as médias das quantidades de linfócitos CD8+ obtidas para o grupo controle negativo entre as idades de dois e 12 dias, indicando que até 12 dias de idade não há determinação de resposta imune na forma de infiltrado leucocitário por linfócitos CD8+, quando as aves não são tratadas e/ou desafiadas.

Na Tabela 12, as médias da quantidade de linfócitos CD8+ no duodeno, jejuno e ceco de aves tratadas com *Lactobacillus* spp. ou microbiota cecal, e desafiados com *S. Enteritidis*, demonstraram que houve diferença ($p<0,05$) entre o controle negativo e os tratamentos realizados, sendo que novamente a

quantidade de linfócitos foi maior nos grupos tratados quando comparada com o controle negativo.

Comparando-se as médias das células nos diferentes segmentos intestinais de um mesmo tratamento, observa-se que não houve diferença ($p < 0,05$) entre o controle negativo e os tratamentos com *L. salivarius* e *L. acidophilus*, desafiados com *S. Enteritidis*.

TABELA 12. Média do número de linfócitos CD8+ obtidas a partir dos tratamentos com *Lactobacillus* spp. ou microbiota cecal e desafiadas com *S. Enteritidis*, em relação aos segmentos intestinais (C.V.=26.7%).

Tratamento	Segmentos		
	Duodeno	Jejuno	Ceco
Controle negativo	8,8 Aa	8,4 Aa	8,2 Aa
Controle positivo (<i>S. Enteritidis</i>)	25,3 Af	23,7 Bf	20,3 Cd
<i>L. reuteri</i>	18,5 Acd	17,7 ABc	14,9 Bbc
<i>L. salivarius</i>	20,3 Ade	17,7 Ac	19,5 Ad
<i>L. acidophilus</i>	20,6 Ade	18,9 Acd	14,3 Bb
Microbiota cecal	20,6 ABde	22,0 Ae	18,1 Bd
<i>L. reuteri</i> + <i>S. Enteritidis</i>	21,4 Ae	20,7 Ade	16,3 Bc
<i>L. salivarius</i> + <i>S. Enteritidis</i>	16,6 Abc	15,1 Ab	16,0 Ac
<i>L. acidophilus</i> + <i>S. Enteritidis</i>	14,9 Ab	14,1 Ab	14,1 Ab
Micrbiota cecal+ <i>S. Enteritidis</i>	27,5 Af	25,8 Af	22,4 Be

Letras maiúsculas comparam médias de idade para cada tratamento (linhas).

Letras minúsculas comparam médias de tratamento para cada idade (colunas).

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

A Tabela 13 e a Figura 7 apresentam as médias das quantidades de linfócitos CD3+ em relação à idade das aves e segmento intestinal.

TABELA 13. Média do número de linfócitos CD3+ em relação à idade das aves e segmento intestinal (C.V.=30.1%).

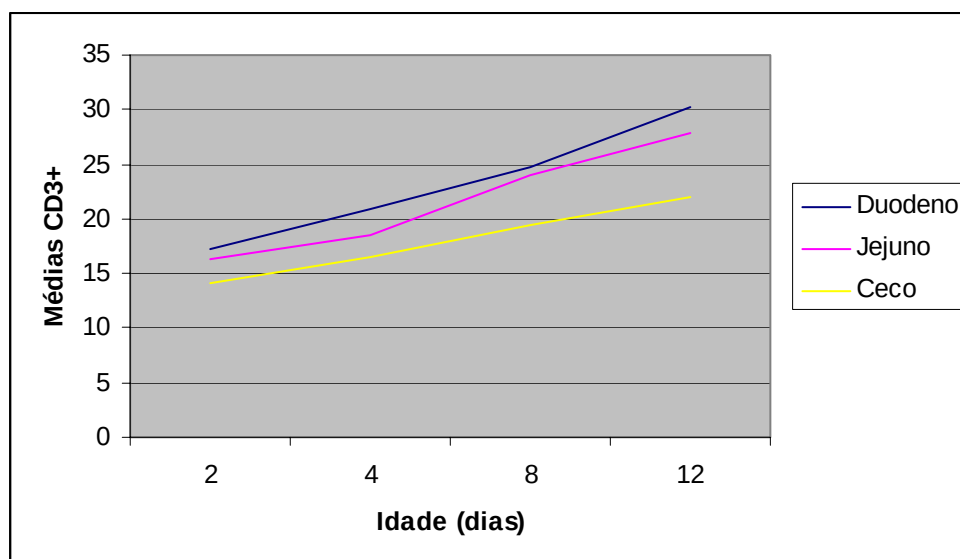
Segmento	Idade (dias)			
	2	4	8	12
Duodeno	17,3 Aa	20,8 Ba	24,8 Ca	30,3 Da
Jejuno	16,3 Aa	18,5 Bb	24,0 Ca	27,9 Db
Ceco	14,1 Ab	16,5 Bb	19,5 Cb	22,0 Dc

Letras maiúsculas comparam médias de idade para cada tratamento (linhas).

Letras minúsculas comparam médias de tratamento para cada idade (colunas).

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

FIGURA 7. Média do número de linfócitos CD3+ em relação à idade das aves e segmento intestinal (C.V.=30.1%).



A Tabela 13 compara a quantidade de linfócitos CD3+ em cada segmento intestinal com as diferentes idades das aves. Observa-se que aos dois e oito dias, as médias apresentadas no duodeno e jejuno não apresentaram diferença ($p>0,05$), o que diferiu, porém, em relação às médias no ceco que foram menores que os valores obtidos nas porções anteriores do intestino. Já nos resultados apresentados aos quatro e 12 dias, observou-se diferença ($p<0,05$) entre os diferentes segmentos intestinais, e as médias da quantidade de linfócitos CD3+, sendo maiores no duodeno e jejuno quando comparadas com o ceco. Além disso, pode-se observar também que nos

quatro momentos analisados as médias da quantidade de linfócitos CD3+ foram maiores no duodeno, seguidas, respectivamente, pelo jejuno e ceco. Quando se compara os diferentes segmentos intestinais em cada momento, observa-se que os valores das médias com 12 dias de idade foram maiores em ordem decrescente do que com oito, quatro e dois dias, podendo-se afirmar que até 12 dias de idade, as médias das quantidades de linfócitos CD3+ aumentaram no epitélio e na lâmina própria do duodeno, jejuno e ceco das aves.

As médias da quantidade de linfócitos CD4+ em relação à idade das aves e os segmentos intestinais, estão expressas na Tabela 14 e na Figura 8.

TABELA 14. Média do número de linfócitos CD4+ em relação à idade das aves e segmento intestinal (C.V.=29.2%).

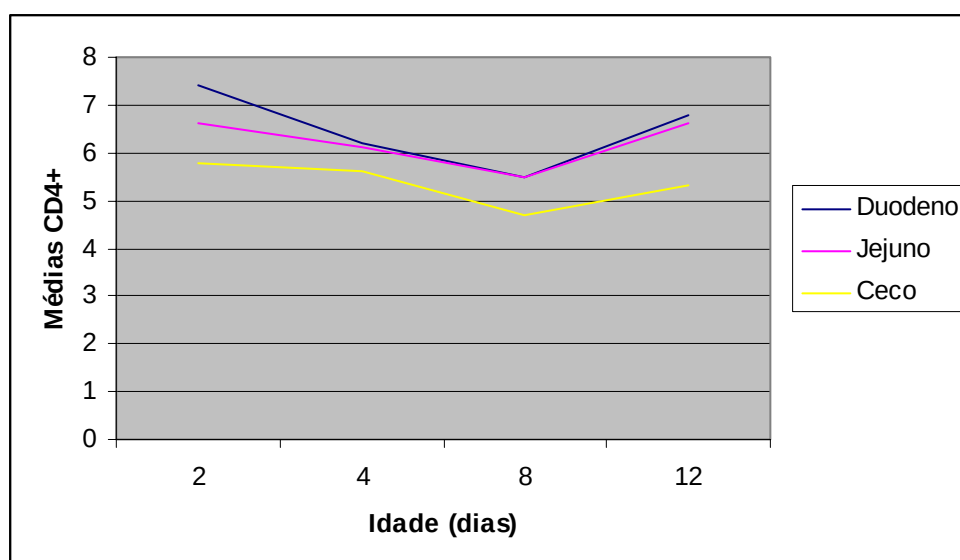
Segmento	Idade (dias)			
	2	4	8	12
Duodeno	7,4 Aa	6,2 Ba	5,5 Ca	6,8 Ba
Jejuno	6,6 Ab	6,1 Ab	5,5 Ba	6,6 Aa
Ceco	5,8 Ac	5,6 Ab	4,7 Bb	5,3 Ab

Letras maiúsculas comparam médias de idade para cada tratamento (linhas).

Letras minúsculas comparam médias de tratamento para cada idade (colunas).

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

FIGURA 8. Média do número de linfócitos CD4+ em relação à idade das aves e segmento intestinal (C.V.=29.2%).



Comparando-se cada um dos segmentos intestinais nas diferentes idades, observa-se que no duodeno houve diferença ($p < 0,05$) entre as médias da quantidade de linfócitos CD4+ em três períodos, enquanto que nos demais segmentos essa diferença ocorreu apenas em dois períodos. Em relação à idade das aves, pode-se observar que com dois dias houve diferença ($p < 0,05$) entre os valores obtidos no duodeno, jejuno e ceco. Além disso, os valores da média da quantidade de linfócitos CD4+ e das médias apresentados no duodeno foram maiores, sequencialmente, que o observado no jejuno e ceco. Assim, pode-se afirmar que a determinação de resposta imune na forma de infiltrado leucocitário por linfócitos CD4+ no duodeno teve valores das médias maiores que nos outros segmentos.

Na Tabela 15 e na Figura 9 há a descrição da quantidade de linfócitos CD8+ em relação à idade das aves, e os segmentos intestinais. Quando a análise da tabela relaciona um mesmo local nos diferentes momentos analisados, os resultados mostram que houve diferença ($p < 0,05$) entre os valores das médias apresentados ao longo das idades das aves. Já quando a análise dos dados é feita através da comparação dos valores das médias obtidos nos diferentes segmentos em relação a um mesmo período, os resultados mostram que também houve diferença ($p < 0,05$) entre os diferentes locais em relação aos períodos analisados.

TABELA 15. Média do número de linfócitos CD8+ em relação a idade das aves e segmento intestinal (C.V.=26.7%).

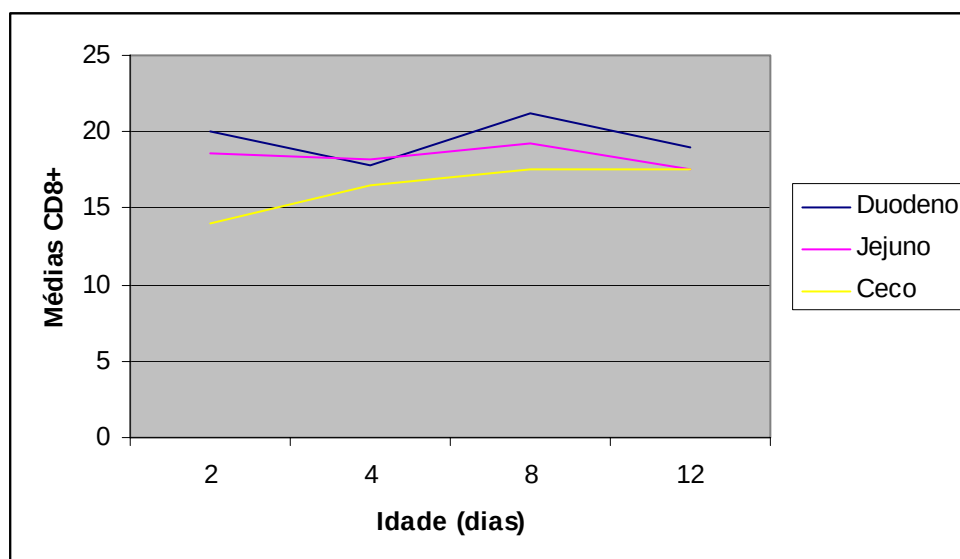
Segmento	Idade (dias)			
	2	4	8	12
Duodeno	20,0 Aa	17,8 Bab	21,2 Aa	19,0 Aa
Jejuno	18,6 Aa	18,2 Aa	19,2 Aa	17,6 Bb
Ceco	14,0 Ab	16,5 Bb	17,6 Bb	17,6 Bb

Letras maiúsculas comparam médias de idade para cada tratamento (linhas).

Letras minúsculas comparam médias de tratamento para cada idade (colunas).

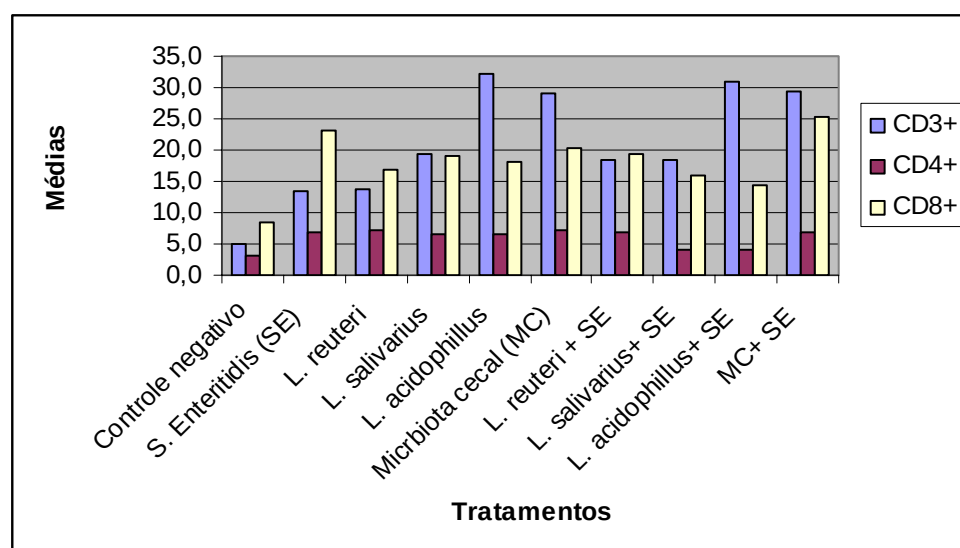
Médias seguidas de pelo menos uma letra igual não diferem significativamente ($p > 0,05$).

FIGURA 9. Média do número de linfócitos CD8+ em relação a idade das aves e segmento intestinal (C.V.=26.7%).



A Figura 10 relaciona as médias de linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+ em aves tratadas com *Lactobacillus* spp. ou microbiota cecal, e desafiadas com *S. Enteritidis*, independente do segmento intestinal analisado e dos diferentes tratamentos.

FIGURA 10. Média do número de linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+ em cada tratamento/desafio, independente do segmento intestinal e da idade das aves.



6. DISCUSSÃO

As bactérias ácido lácticas do gênero *Lactobacillus* fazem parte da microbiota das aves. Essas e outras bactérias encontram-se em todo o trato gastrointestinal, em diferentes quantidades e espécies, que variam em função das diferentes localizações (HILL, 1990; BAQUERO, 1992; BOURLIOUX, 1994).

Os *Lactobacillus* isolados de diversas fontes podem ser importantes na produção de probióticos que, por sua vez, têm o propósito de manter a microbiota intestinal equilibrada, através da exclusão competitiva e por ação antagonica a diversas bactérias patogênicas presentes no intestino das aves (GUSILIS et al., 1999). São muitas as bactérias e leveduras que podem ser utilizadas como probióticos (PIVNICK et al., 1985), cuja seleção é realizada pela avaliação de seus metabólitos, potencial de colonização e capacidade de multiplicação em locais específicos (FRETER et al., 1993). Desta forma propiciam efeitos benéficos à saúde do hospedeiro, inibindo o crescimento de microrganismos patogênicos (TANNOCK, 1999).

Nesse estudo, amostras de *Lactobacillus reuteri*, *L. salivarius*, *L. acidophilus* e microbiota cecal isoladas do ingluvío e cecos, e fornecidas oralmente às aves, desafiadas ou não com *Salmonella* Enteritidis, demonstraram através de imunoistoquímica, capacidade de estimular o sistema imune na forma de infiltrado leucocitário por linfócitos CD3+ e CD8+ no intestino de aves jovens. Assim, os resultados obtidos nesse trabalho estão de acordo com a afirmação de Lillehoj e Chung (1992), na qual o desenvolvimento e a composição das células T intestinais são influenciadas pela exposição aos antígenos ambientais, sugerindo que a presença desses linfócitos no epitélio intestinal é devido ao estímulo antigênico intraluminal.

Segundo Shu & Gill (2002), o uso de algumas espécies de *Lactobacillus* desenvolveu a concepção de que tais microrganismos protegem, tanto animais como humanos, contra infecções gastrointestinais causadas por enteropatógenos. De acordo com resultados obtidos em seus estudos, a suplementação da dieta com *Lactobacillus rhamnosus* HN001 reduziu significativamente a infecção intestinal contra *Escherichia coli* O157:H7 em

camundongos, e demonstrou ser eficiente também contra *Salmonella Typhimurium*, diminuindo a população dessa bactéria no intestino e a mortalidade de camundongos.

Nesse sentido, o desenvolvimento de resposta imune por parte do hospedeiro na forma de infiltrado leucocitário por linfócitos CD3+ e CD8+, no duodeno, jejuno e ceco de aves tratadas com culturas de *Lactobacillus acidophilus*, *L. reuteri*, *L. salivarius* ou microbiota cecal e desafiadas ou não com *S. Enteritidis*, foi comprovado com a realização do presente trabalho.

Resultado semelhante foi obtido por Vervelde et al. (1998), que identificaram, também por imunoistoquímica, grande quantidade de infiltrado leucocitário por linfócitos CD3+ constituído, principalmente, de células CD4+ e CD8+ no epitélio e na lâmina própria do intestino de aves, sete dias após o tratamento realizado com uma mistura entre antígeno recombinante de *Eimeria* e toxina colérica. Tais resultados também estão de acordo com a afirmação de Elwood et al. (1997), na qual em humanos, suínos e roedores as células T estão dispostas tanto no epitélio como na lâmina própria intestinal.

Além da identificação das mesmas estruturas, outra semelhança marcante entre o trabalho de Vervelde et al. (1998) e este estudo foi que, em ambos, a quantidade de linfócitos CD8+ foi superior à quantidade de CD4+, como pode-se observar na Figura 10 no qual é possível também notar que, com exceção do tratamento realizado com *L. acidophilus*, associado ou não com desafio por *S. Enteritidis*, a soma dos linfócitos CD4+ e CD8+ foi sempre maior que o número total de linfócitos CD3+. Segundo Elwood et al. (1997), uma explicação para esse resultado é que a molécula CD4 marcada na reação de imunoistoquímica, pode também estar presente na parede celular dos granulócitos dispostos na lâmina própria intestinal. Outra explicação para esse mesmo resultado pode estar relacionada ao fato de que nesse experimento, diferentemente dos anticorpos usados para marcar CD3+ e CD8+, foi usado marcador específico (CD4+) para aves, fazendo com que essas moléculas, tanto nos linfócitos como nos granulócitos, fossem marcadas devido a sua alta especificidade. De acordo com Elwood et al. (1997), seria necessária a utilização de anticorpos específicos para granulócitos na reação de imunoistoquímica para diferenciar esses dois tipos de células. Somente assim

seria possível saber a real proporção entre a quantidade de linfócitos CD4+ e CD8+ em relação ao número total de linfócitos CD3+.

Choi et al. (1999) descreveram as alterações das subpopulações de células T, dentre elas os linfócitos CD4+, CD8+, TCR1 e TCR2, assim como a transcrição de IFN- γ e TGF- β 4 mRNA no intestino de aves, após inoculação oral de *Eimeria acervulina*. De acordo com Songserm et al. (2002), o influxo de células T ao epitélio intestinal está relacionado com a presença de bactérias no lúmen do intestino. Para esses autores, a imunidade intestinal mediada por células está diretamente relacionada com a eliminação de enteropatógenos, como a *Pasteurella multocida* e *Eimeira*, do intestino das aves. Assim, os resultados obtidos por esses pesquisadores estão de acordo com o presente trabalho, uma vez que foi comprovado o aumento da população de linfócitos T CD3+, quatro dias após a realização dos tratamentos, como se pode observar pela análise da Figura 7.

Ainda de acordo com Songserm et al. (2002), além do estímulo bacteriano, o aumento da idade das aves também é responsável pelo influxo de linfócitos no epitélio intestinal das mesmas. Estudo feito por Lillehoj & Chung (1992) em frangos de corte de linhagem comercial, constatou que a porcentagem de linfócitos CD3+ aumentou 24,4% na primeira semana de idade das aves, 42% na segunda semana, e 62,6% na quarta semana. Tais resultados estão de acordo com o presente trabalho, uma vez que neste também houve aumento na quantidade de linfócitos CD3+ com o aumento da idade das aves.

Em relação à variação do número de linfócitos CD4+ com o aumento da idade das aves, os resultados obtidos neste trabalho também estão de acordo com as afirmações feitas por Lillehoj & Chung (1992), nas quais foram observadas a diminuição da quantidade de linfócitos CD4+ com o passar da idade das aves, como se pode observar pela análise da Figura 8.

Já em relação à quantidade de linfócitos CD8+, os números obtidos por Lillehoj & Chung (1992) divergem do presente estudo uma vez que mostram um gradual e discreto aumento dessas células com o passar da idade das aves.

Vários estudos sugerem os mecanismos pelos quais os probióticos atuam em benefício do hospedeiro, entre eles a competição por sítios de

ligação e por nutrientes disponíveis no intestino, a produção de substâncias antimicrobianas, e a estimulação do sistema imune do hospedeiro (SHU & GILL, 2002). De acordo com Ouwehand et al. (1999) a habilidade de adesão na mucosa intestinal é fundamental para estimular o sistema imune, e segundo O'Halloran et al. (1997) existe correlação direta entre a habilidade de adesão de bactérias probióticas e o aumento dos títulos plasmáticos de anticorpos contra microrganismos. Para Elliot et al. (1998), a adesão de *Lactobacillus* a danos da mucosa gástrica estimula a cicatrização desse tecido.

7. CONCLUSÕES

Foi possível concluir que:

O tratamento com *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. acidophilus* ou microbiota cecal e o desafio com *S. Enteritidis*, determina resposta imune na forma de infiltrado leucocitário por linfócitos CD3+ e CD8+ no intestino de aves jovens nos período de dois a 12 dias de idade, e não determina resposta imune na forma de infiltrado leucocitário por células CD4+ no mesmo período analisado.

O duodeno foi o segmento no qual a resposta imune por células T CD3+, CD4+ e CD8+ foi estimulada com maior intensidade, seguido, respectivamente, pelo jejuno e ceco.

A quantidade de linfócitos CD3+ presentes no duodeno, jejuno e ceco aumenta com a idade das aves, independente do estímulo determinado pelos tratamentos com *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. acidophilus* ou microbiota cecal e desafio com *S. Enteritidis*.

8. BIBLIOGRAFIA *

ABOUZEED, Y. M.; HARIHARAN, H.; POPPE, C.; KIBENG, F.S.B. Characterization of *Salmonella* isolates from beef cattle, broiler chickens and human sources on Prince Edward Island. **Comp. Immunol. Infect Dis. Microbiol.**, v.23, p. 253-266, 2000.

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

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

ARAÚJO, E.; PACHECO, M. A. S .R.; BONI, R. F.; FONSECA, Y. S. K.; GILLI, D. S.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T. Surtos alimentares por *Salmonella* Enteritidis associados ao uso de ovo cru, em Sorocaba – SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18, 1995, Santos, SP. **Anais...**Santos, SP. 1995. p. 54.

ARISTILA T. P.; VAINIO, O.; LASSILA, O. Central role of CD4+ T cells in avian Immune Response. **Poultry Sci.**, v.73, p.1019-1026, 1994.

BAQUERO, F. Microflora normal del hombre. In: PEREA, E. J. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Doyma, 1992. p.31-39.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NRB 6023: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

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

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

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

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

BELI, E.; TELO A.; DURAKU, E. *Salmonella* serotypes isolated from turkey meat in Albania. **Int. J. Food Microbiol.**, v.63, p.165-167, 2000.

BERCHIERI JUNIOR, A. Exclusão competitiva. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2001, Campinas,. **Anais....** Campinas: FACTA, 2001. v.2, p.169-176.

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

BERNT, A.; METHNER, U. Gamma/delta T cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated *Salmonella typhimurium* strains. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.78, p.143-161, 2000.

BESSAY, M.; LE VERN, Y.; KERBOEUF, D.; YVORÉ, P.; QUÉRÉ, P.; Changes in intestinal intra-epithelial and systemic T-cell subpopulations after an *Eimeria* infection in chickens: comparative study between *E. acervulina* and *E. tenella*. **Vet. Res.**, v.27, p.503-514, 1996.

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

BOUSVARUS, A.; WALKER, A. Development and function of the intestinal mucosal barrier. Ontogenic of the immune system. In: McDonall T. CRC Press. 1990. Chapter 1, p.1-21.

BRANDTZAEG, P. Basic mechanisms of mucosal immunity a major adptive system. **Immunologist.**, v.3, p.89-96, 1995.

BRENNER, D. J. et al. **Bergeys Manual of Syst. Bacteriol.** Baltimore: Willians & Wilkins, 1986. v.2, cap.14, p 1208-1234.

CHAI, J.; MINGJUNG, S.; QIAN, Y. Isolation and identification of *Lactobacillus brevis* and its effects on mucosa immunity of chicken. **Chin. J. Vet. Sci.**, v.21, p.485-488, 2001.

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

CHEN, C. H.; GOBEL, T. W. F.; KUBOTA, T.; COOPER, M. D. T cell development in the chicken. **Poultry Sci.**, v.73, p.1012-1018, 1994.

CHOI, K. D., LILLEHOJ, H. S., ZALENGA, D. S. Changes in local IFN- γ and TGF- β 4 mRNA expression and intraepithelial lymphocytes following *Eimeria acervulina* infection. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.71, n.3-4, p.263-275, 1999.

CODY, S. H.; ABBOTT, S. L.; MARFIN, A. A.; SCHULZ, B.; WAGNER, P.; ROBBINS, K.; MOHLE – BOETANI, J. C.; VUGIA, D. J. Two outbreaks of multidrug-resistant *Salmonella* serotype Typhimurium DT 104 infections linked

to raw-milk cheese in Northern California. **J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.281, p 1805-1810, 1999.

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

DAVIS, G. H. The classification of Lactobacilli from the human mouth. **J. Gen. Microbiol.**, v.13, p. 481-493, 1955.

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

EARLE, D. J. et al. Expression and function of the MAdCAM-1 receptor, integrin $\alpha 4\beta 7$, on human leukocytes. **J. Immunol.**, v.153, p.517-528, 1994.

EDENS, F. W.; PARKHURST, C. R.; CASAS, I. A.; DOBROGOSZ, W. J. Principles of ex ovo competitive exclusion and in ovo administration of *Lactobacillus reuteri*. **Poultry Sci.**, v.76, p.179-196. 1997.

ELLIOT, S. N.; BURET, A.; McKNIGHT, W.; MILLER, M. J.; WALLACE, J. L. Bacteria rapidly colonize and modulate healing of gastric ulcers in rats. **Am. J. Physiol.**, v.275, 3 pt 1, p.G225-G232, 1998.

ELMCY, G. M.; SUTANGY, C. M.; McFARLAND, J. V. Biotherapeutic agents a neglected modality for the prevention and treatment at selected intestinal and vaginal infections. **JAMA.**, v.273, p.478-487, 1996.

ELWOOD, C.M.; HAMBLIN, A.S.; BATT, R.M. Quantitative and qualitative immunohistochemistry of T cell subsets and MHC Class II expression in the canine small intestine. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.58, p.195-207, 1997.

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

FALCÃO, D. P.; TRABULSI, L. R.; HICKMAN, F. W. Unusual enterobacteriaceae: lactose-positive *Salmonella typhimurium* which is endemic in São Paulo, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v.2, p.349-363, 1975.

FRETER, R.; STAUFFER, E.; CLEVEN, D.; HOLDEMAN, L.V.; MOORE, E.C. Continuous-flow cultures as in vitro models of the ecology of large intestinal flora. **Infect. Immun.**, v.39, p.666-675, 1993.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, v.66, p.365-378, 1989.

FUZHARA, T. O.; NUNES, S. M.; DALCOL, R. Surtos de toxoinfecção por *Salmonella* Enteritidis associados ao uso de ovo cru em Sorocaba, SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18, 1995, Santos, SP. **Anais...**Santos,SP. 1995. p.54.

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

GERRITSE, K.; POSNO, M.; SCHELLEKENS, M. M.; BOERSMA, W. J. A.; CLAASSEN, E. Oral administration of TNP-lactobacillus conjugates in mice: a model for evaluation of mucosal and systemic immune responses and memory formation elicited by transformed Lactobacilli. **Res. Microbiol.**, v.141, p.955-962, 1990.

GIBSON, G.R.; TOBERFROID, M. B. Dietary modulation of concept of prebiotics. **J. Nutr.**, v.125, p.1401-1412, 1995.

GILL, H. S.; SHU, Q.; RUTHERFORD, K.; CROSS, M. J. Protection against translocation *Samonella typhimurium* infection in mice by feeding the immunoenhancing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20TM). **Med. Microbiol. Immunol.**, v.190, p.97-104, 2002.

GUSILIS, C.; PEREZ CHAIA, A.; APELLA, M. C.; AMOROSO, M. J.; OLIVER, G. Antibacterial activity of *Lactobacillus animalis* isolated from chicken against *Salmonella gallinarum*. **Microbiol. Aliment. Nutr.**, v.16, p.265-273, 1998.

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

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

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

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's: manual of determinative bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994, p.186-187.

HSU, H. M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidine-biotine-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 29, p.577-580, 1981.

JIN, L.; HO, Y.W.; ABDULLAH, N. et al. Influence of dried *Bacillus subtilis* and *Lactobacilli* culture on intestinal microflora and performance in broilers. **Asian Austr. J. Anim. Sci.**, v.9, p.397-403, 1996

JIN, L.; HO, Y.W.; ABDULLAH, N. et al. Probiotics in poultry: modes of action. **World's Poult. Sci. J.**, v.53, p.351-368, 1997.

JIN, L.; HO, Y.W.; ABDULLAH, N. et al. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. **Poult. Sci.**, v.77, p.1259-1265, 1998.

KANDLER, O.; WEISS, R. Section 14, Nonsporing Gram-positive Roods. In: SNETH, P.H.A.; MAINE, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G (Eds). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.**, Baltimore: Willian and Wilkis, 1986. v.2, p.1208-1234.

KRAEHENBUHL, J. P.; NEUTRA, M. R. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surface. **Physiol. Rev.**, v.72, p.853-879, 1992.

LEE, G. M.; JACKSON, G. D. F.; COOPER G. N. Infection and immune responses in chickens exposed to *Salmonella typhimurium*. **Avian Dis.**, v.27, p. 577-583, 1982.

LILLEHOJ, H.S.; CHUNG, K.S. Postnatal development of T-lymphocyte subpopulations in intestinal intraepithelium and lamina propria in chickens. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.31, p.347-360, 1992.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v.147, p.747-748, 1965.

LÍRIO, V. S.; ASTONE, S.; PIMENTEL, E. P.; CAMARGO, D.; STEFONI, S.; MIYAZAWA, T. C. Sorotipos de *Salmonella* isolados de alimentos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18, 1995, Santo, SP. **Anais...**Santos,SP. 1995. p.32.

MAASSEN, C. B. M.; van HOLTEN, J. C. A. M.; BALK, F.; HEIJINE den BAK-GLASHOUWER, M. J.; LEE, R.; LAMAN, J. D.; BOERSMA, W. J. A.; CLAASSEN, E. Orally administered *Lactobacillus* strains differentially affect the direction and efficacy of the immune response. **Vet. Q.**, v.20, p.S81-S83, 1998.

MARTINS-VIEIRA, M. B. C.; SILVA, M. C. C.; DIAS, R. S. Surtos de toxoinfecção alimentar ocorridos em Minas Gerais no período de 1992 a 1994. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18, 1995, Santos, SP. **Anais...**Santos, SP. 1995. p.57.

MASSA, S.; SARRA, P. G.; CANGANELLA, F.; TROVATELLI, L. Protection of young chicks against *Salmonella kedougou* by administration of intestinal microflora. **Int. J. Food Microbiol.**, v.40, p.123-126, 1998.

MAO, Y; NOBAEK, S.; KASRAVI, B.; ADAWI, D.; STENRAM, U.; MOLIN, G.; JEPPSSON, B. The effects of *Lactobacillus* strains and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats. **Gastroenterology**, v.111, n.2, p.334-344, 1996.

McDONALD, V. Gut intraepithelial lymphocytes and immunity to *Coccidia*. **Parasitol. Today**, v.15, n.12, p.483-487, 1999.

METCHNIKOFF, E. **Prolongation of life**. New York: Putnam and Sans, 1907.

MIECZYSLAW, R. Ocurrance of *Salmonella spp.* in consumption eggs in Polland. **Int. J. Food Microbiol.**, v.64, p.189-91, 2000.

MICHAEL, S. & WEI, S. Mack Dr.: *Escherichia coli* straim 2348/69 in vitro adhrian is reduced in the presence of a *Lactobacillus* species. **Gastroenterology, Philadelphia**, v.112, p.1042, 1997.

MILES, R. D. Manipulation of the microflora of the gastrointestinal tract: natural ways to prevent colonization by pathogens. In: LYONS, T. P. (eds). **Biotechnology in the feed industry**: proceedings of Allthech's nineth annual symposion Nicholasvile: Allthech Technical, 1993. p. 133-50.

MOLBAK, K.; BAGGESEN, D. L.; AARESTRUP, F. M.; EBBESEN, J. M.; ENGBERG, J.; FRYDENDAHL, K.; GERNER-SMIDT, P.; PETERSEN, A. M.; WEGENER, H. C. An outbreak of multidrugs-resistant, quinolone-resistant

Salmonella enterica serotype Typhimurium DT 104. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.341, p.1420-1425, 1999.

MOWATT, A. Mcl.; VINEY, J. L. The anatomical basis of intestinal immunity. **Immunol. Rev.**, v.156, p.145-166, 1997.

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

NAGAJARA, K. V.; POMEROY, B. S.; WILLIAMS, J. E. Paratyphoid Infections. In: CALNEK, B. W. et al. (eds). **Diseases of poultry**. 9 ed, Ames: State University Press, p.99-130. 1991.

NUNES, M. R. C. M.; CHRISTOFELETTI, A. R. N.; CAMPELO, V.; SILVA, E.O.D.; CONCEIÇÃO, M. ° B.; CARVALHO, E. L. F.; FARIAS, L. M.; MANIZUCA, E. M. Ocorrência de *Salmonella* em crianças com diarreia aguda no município de Teresina – PI., no período de 1993 a 1995. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18, 1995, Santos, SP. **Anais...**Santos, SP. 1995. p.103.

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

O'HALLORAN, S., FEENEY, M., MORRISSEY, D., MURPHY, L., THORNTON, G., SHANAHAN, F., O'SULLIVAN, G. C., COLLINS, J. K., **Adhesion of potential probiotic bacteria to human epithelial cell lines. PBS 35. Functional foods: designer foods for the future.** Ireland: Cork. 1997.

ORLA-JENSEN, S. La Classification das Bacteries Lactiques. **Lait**, v.4, p.468-477, 1921.

OUWEHAND, A. C., KIRJAVAINEN, P. V., GRÖNLUND, M. M., ISOLAURI, E., SALMINEN, S. J. Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. **Int. Dairy J.**, v.9, p.623-630, 1999.

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

PASCUAL, M.; HUGAS, M.; IGNACIO BADIOLA, J.; MARIA MONFORT, J.; GARRIGA, M. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella* Enteritidis colonization in chickens. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, p.4981-4986, 1999.

PELTO, L.; ISOLAURI, E.; LILIUS, E.M.; NUUTILA, J.; SALMINEN, S. Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have no immunostimulatory effect in healthy subjects. **Clin. Exp. Allergy**, v.28, n.12, p.1474-1479, 1998.

PERES, J. T. M.; CASTANHEIRA, I. A. Z.; IRINO, K.; GELLI, D. S.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A. T.; LIMA, S. I.; MARQUES, D. Surtos de enfermidade transmitida por alimentos na região de São José do Rio Preto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18., 1995, Santos, SP. **Anais...**Santos, SP. 1995. p.103.

PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw. Hill do Brasil, 1981, p.1072.

PISANI, B.; ROCHA, M. M. M.; SIMÕES, M.; PRANDI, M. A. G.; BOORWOART, P. A. G.; IRINO, K.; NEVES, B. C.; BEVILACQUA, A. R. P. A. *Salmonella* Enteritidis: elucidação de surtos ocorridos na região de Campinas, de setembro de 1994 a junho de 1995. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18., 1995, Santos, SP. **Anais...** Santos, SP, 1995, p. 80.

PIVNICK, H.; BARNUM, D.; STAVRIC, S.; GLEESON, T.; BLANCHFIELD, B. Investigations on the use of competitive exclusion to control *Salmonella* in poultry. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SALMONELLA, 1985, Philadelphia. **Proceeding...** Philadelphia: American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania, 1985. p.80-87.

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

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

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

PULVERER, G., KO, H. L., ROSZKOWSKI, W., BEUTH, J., YASSIN, A., JELJASZEWICZ, J. Digestive tract microflora liberates low molecular weight peptides with immunotriggering activity. **Int. J. Med. Microbiol.**, v.272, p.318-327, 1990.

RAMESH, B. K.; SATYNARAYANA, M. L.; GOWDA, R. N. S., VIJAYASARATHI, S. K.; SUGUNA RAO. Effect of *Lactobacillus acidophilus* on gut pH and viable bacterial count in experimental fowl typhoid in broilers. **Indian Vet. J.**, v.77, p.544-546, 2000.

REQUE, E. F.; ASHOK, P.; FRANCO, S. G.; SOCCOL, C.R. Isolation, identification and physiological study of *Lactobacillus fermentum* LPB for use as probiotic in chickens. **Braz. J. Microbiol.**, v.31, p.303-307, 2000.

RUSSUL, G.; KHAIR, J.; RADU, S.; CHEAH, C.T.; YASSIN, R.M.D. Prevalence of *Salmonella* in broilers at retail outlets, processing plants and farms in Malaysia. **Int. J. Food. Microbiol.**, v.33, p.183-94, 1996.

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

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

SCHIFFRIN, E.J., BRASSART, D.; SERUIN, A.L. et al. Immune Modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria from strain selection. **Am J. Clin. Nutr.**, v.66, p. 515-520, 1997

SCHIFFRIN, E.J.: Los Probióticos en la alimentación infantil. Reunión sobre probióticos. Madrid, 1999.

SHU, Q., GILL, H. S. Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20TM) against *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. **Immunol. Med. Microbiol.**, v.34, p.59-64, 2002.

SIMON, O.; JADAMUS, A.; VAHJEN, W. Probiotic feed additives - effectiveness and expected modes of action. **J. Anim. Feed Sci.**, v.10, p.51-67, 2001.

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

SONGSEEM, T. H.; ENGEL, B.; ROOZELAAR, D.J.; KOK, G.L.; PIJPERS, A.; POL, J. M. A.; HUURNE, A. A .H. M. Cellular immune response in the small intestine of two broiler chicken lines orally inoculated with malabsorption syndrome homogenates. **Vet. Immunol Immunopathol.**, v.85, p.51-62, 2002.

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

TANNOCK, G.W. A fresh look at the intestinal microflora. In: TANNOCK. G.W. (Ed.). **Probiotics a critical review**. Wymondham: Horizon Scientific Press, 1999. p.5-14.

TELO, a.; BIJO, B.; SULAJ, K.; BELI, E. Occurrence of *Salmonella* spp. in imported eggs into Albania. *Intern. Jour. F. Microbiol.*, v.49, p.169-71, 1999.

TOMASI, T. B. An overview of Mucosal System. IN: Ogra P.L. et al. Handbook of mucosal Immunology. San Diego: Academic Press, Inc., p.3-7, 1994.

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

TORTUERO, F. Influence of implantation of *Lactobacillus acidophilus* in chicks on the growth, feed conversion, malabsorption of fats syndrome and intestinal flora. **Poultry. Sci.**, v.52, p.197-203, 1973.

TRAVI ALIMENTOS. Probióticos. Porto Alegre, 2002. Disponível em: <http://www.travialimentos.com.br/probioticos.html>. Acesso em: 20/ julho/ 2004.

VERVELDE, L.; JANSE, E. M.; VERMEULEN, A. N.; JEURISSEN, S. H. M. Induction of local and systemic immune response using cholera toxin as vehicle to deliver antigen in the lamina propria of the chicken intestine. **Vet. Immunol Immunopathol.**, v.62, p.261-272, 1998.

VILLAR, R. G.; MACEK, M. D.; SIMONS, S.; HAYES, P. S.; GOLDOFT, M. J.; LEWIS, J.H.; ROWAN, L. L.; HURSH, D.; PATNODE, M.; MEAD, P. S. Investigation of multidrug-resistant *Salmonella* serotype Typhimurium DT104 infections linked to raw-milk cheese in Washington State. **J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.281, p.1811-1816, 1999.

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

WILLIAMS, J. E. Avian Salmonellosis. In: HOFSTAD, M. S. et al., (eds). **Diseases of Poultry**. 8.ed. Ames: State University Press, 1984.p.270-278

YAMAMOTO, M.; KIYONO, H. Immunoregulatory functions of mucosal $\gamma\delta$ T cells. **Microbes Infect.**, v.1, p.241-246, 1999.

ZACCONI, C.; SCOLARI, G.; SARRA, P. G. Effect of administration of *Lactobacillus salivarius* and lactic microflora in chick digestive tract. **An. Microbiol. Enzimol.**, v.49, p.117-123, 1999.

ZAR, J. H. Biostatistical Analysis. New Jersey: Prentice-Hall, 1996. 718p.