

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**MODULAÇÃO DA MICROBIOTA E INTESTINAL DE PERUS DE
CORTE DESAFIADOS COM *Salmonella* HEIDELBERG E SUBMETIDOS
A DIFERENTES PROGRAMAS DE CONTROLE**

TARCÍSIO MACEDO SILVA

Botucatu-SP

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PERUS DE CORTE
DESAFIADOS COM *Salmonella* HEIDELBERG E SUBMETIDOS A
DIFERENTES PROGRAMAS DE CONTROLE

TARCÍSIO MACEDO SILVA

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

Orientador: Prof. Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho

Coorientadora: Dr^a. Elisane Lenita Milbradt

Botucatu-SP

2017

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

Silva, Tarcísio Macedo.

Modulação da microbiota intestinal de perus de corte desafiados com *Salmonella* Heidelberg e submetidos a diferentes programas de controle / Tarcísio Macedo Silva.
- Botucatu, 2017

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

Orientador: Raphael Lucio Andreatti Filho

Coorientador: Elisane Lenita Milbradt

Capes: 50503014

1. Ácidos orgânicos. 2. Probióticos. 3. *Salmonella*.
4. Microbiota. 5. Peru (Ave). 6. Morfometria.

Palavras-chave: Ácido orgânico; Microbiota intestinal; Peru; Probiótico; *Salmonella*; Produto de exclusão competitiva.

Tarcisio Macedo Silva

**MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PERUS DE CORTE
DESAFIADOS COM *Salmonella* HEIDELBERG E SUBMETIDOS A
DIFERENTES PROGRAMAS DE CONTROLE**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho
Presidente e Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu – SP

Prof. Dr. Adriano Sakai Okamoto
Membro
Departamento de de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu – SP

Prof. Dra. Terezinha Knölb
Membro
Departamento de Patologia (VPT)
FMVZ/USP - São Paulo - SP.

14 de outubro de 2017.

Dedico

*Aos meus pais Terezinha e Rufino que
são o alicerce de todas as minhas
conquistas, mesmo não me apoiando
nas minhas decisões, alguns
ensinamentos levo para a vida.*

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo e suporte para financiamento do projeto de pesquisa (Processos: 2015/16428-5; 2015/18350-3).

Ao Professor e Orientador Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho, pela orientação e pela oportunidade concedida para realização do curso e por contribuir com o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À Dra Elisane Lenita Milbradt, pela co-orientação, pelos ensinamentos, paciência, apoio e amizade. Te levarei para minha vida.

À Priscila Aparecida Boff, agradeço a você pelo incentivo e pela essencial ajuda durante o desenvolver do curso. A vida nos proporcionou caminhos diferentes, hoje e sempre a minha eterna gratidão.

Ao Prof Dr. Vasco Azevedo e ao Dr. Bruno Campos pelo apoio na importação do material genético do microrganismo estudado.

Aos professores do serviço de Patologia e Ornitopatologia da faculdade de Medicina Veterinária FMVZ-UNESP-Botucatu, Adriano Sakai Okamoto, Júlio Lopes Sequeira, Noeme Souza Rocha, Rennée Laufer Amorim e Alessandre Hataka, por toda a colaboração, pela disposição em sempre ajudar no que fosse possível, conselheiros em decisões importantes da vida,

À Dra Barbara Cristina Fernandes e ao Diogo Joaquim pela imprescindível ajuda na condução dos experimentos.

Aos meus amigos, Igor Vellano, Maria Claudia Cordioli, Isamery Machado, Priscila Kobayashi, Carlos Eduardo, Diogo Zanoni, Caio Gimenez, Talia Missen, Ana Cláudia Albuquerque e professor Daniel pelo apoio, pela companhia, pelos conselhos e pelas caronas, grandes amigos, minha eterna gratidão.

Aos companheiros Felipe Onofre, Carlos Augusto Alves, Edgleison e Ciro Possi pela convivência e irmandade durante os anos do mestrado.

À minha namorada Voniclesse Melo pelo apoio na fase final dessa caminhada.

Aos meus grandes amigos Cikele Oliveira e Édipo Dantas pelo apoio em momentos difíceis dessa caminhada.

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

Aos funcionários Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia FMVZ-UNESP-Botucatu, Carlos Godoy, Amaury Raul, Caudinei Rodrigues e dona Deise por toda colaboração e companheirismo.

À empresa Brasil Foods pela doação das aves experimentais.

À Família Boff, eterna gratidão e respeito pelo alicerce e por me incentivar a seguir em frente na minha realização profissional.

A toda minha família pelo amor incondicional.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2	Página
Tabela 1. Colonização do ingluvírio e ceco por <i>Salmonella</i> Heidelberg em perus de corte desafiados no terceiro e no décimo dia de vida.....	54
Tabela 2. Incidência (isolamento) de <i>Salmonella</i> Heidelberg no ingluvírio e no ceco de perus de corte desafiados no terceiro e no décimo dia de vida com 0,5 mL de 10^7 UFC de SH/mL, e 0,5 mL de 10^5 UFC de SH/mL respectivamente.....	55
Tabela 3. Incidência da excreção fecal de <i>Salmonella</i> Heidelberg durante o período experimental (0-35 dias) em perus de corte desafiados no terceiro e no décimo dia de vida com 0,5 mL de 10^7 UFC de SH/mL, e 0,5 mL de 10^5 UFC de SH/mL respectivamente.....	56
Tabela 4. Efeito de diferentes aditivos na morfologia intestinal de perus de corte desafiados no terceiro e no décimo dia de vida com <i>Salmonella</i> Heidelberg.....	57
Tabela 5. Quantidade relativa de <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> no conteúdo cecal de perus de corte desafiados no terceiro e no décimo dia de vida com <i>Salmonella</i> Heidelberg e submetidos ao tratamento com diferentes aditivos.....	58

SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
Introdução	2
Revisão de Literatura	4
Microbiota intestinal de aves	4
Salmoneloses aviárias e saúde pública	6
Dieta e a microbiota intestinal de aves.....	9
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> e microbiota intestinal.....	11
Exclusão Competitiva	12
Probióticos	14
Ácidos Orgânicos	15
Objetivos	18
Referências Bibliográficas.....	19
Proposta de Estudo.....	35
CAPITULO 2	
MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PERUS DE CORTE DESAFIADOS COM <i>Salmonella</i> HEIDELBERG E SUBMETIDOS A DIFERENTES PROGRAMAS DE CONTROLE	36
RESUMO	38
Introdução	39
Material e Métodos	40
Declaração de Ética no uso de animais	41
Amostras bacterianas e condições de cultivo	41
Aves, instalações e manejo	42
Dieta	43

Aditivos.....	43
Delineamento Experimental	44
Quantificação de <i>Salmonella</i> Heidelberg	44
Análise de suabe cloacal para determinação da incidência de <i>Salmonella</i> Heidelberg	44
Análise histológica dos vilos e profundidade de cripta	45
Quantificação relativa do <i>F. prausnitzii</i>	45
Tempo-Real qPCR.....	46
Análise Estatística	46
Resultados.....	47
Discussão	48
Conclusão.....	53
Referências Bibliográficas.....	60
ANEXO	

RESUMO - SILVA, T.M. **Modulação da microbiota intestinal de perus de corte desafiados com *Salmonella* Heidelberg e submetidos a diferentes programas de controle.** Botucatu, 2017. Dissertação 89p (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

O presente estudo avaliou uso de ácidos orgânicos (AOs), probiótico e produto de exclusão competitiva (EC) administrados continuamente, via ração, no controle de *Salmonella* Heidelberg (SH) e a ação sobre a microbiota e morfometria intestinal. Cento e setenta perus de corte fêmeas foram distribuídas, aleatoriamente, em cinco tratamentos com quatro repetições de oito aves cada. No terceiro e no décimo dia de vida, os animais foram submetidos ao desafio oral de SH. No sétimo, 19^o e 35^o de vida as aves foram eutanasiadas (n=10 por tratamento) e colhido amostras de segmentos do inglúvio, duodeno, jejuno, íleo e ceco para quantificação de SH, quantificação relativa do microrganismo *Faecalibacterium prausnitzii* e análise morfométrica. No decorrer do período experimental foram realizadas colheitas de suabes cloacais para pesquisa de SH. A administração do probiótico e produto de EC foi capaz de reduzir a incidência e a colonização de SH no inglúvio. Nos cecos os tratamentos reduziram a colonização de SH somente aos 19 dias de idade. Somente a dieta suplementada com AOs influenciou positivamente na quantidade de *F. prausnitzii* no ceco (19 e 35 dias) e não houve correlação entre a quantidade relativa desse microrganismo e o número de UFCs de SH. A excreção fecal de SH, foi influenciada pelos tratamentos a partir dos 26 dias de vida das aves, aos 34 dias todos os tratamentos reduziram a excreção fecal. A morfometria intestinal foi influenciada pelos tratamentos somente aos sete dias de vida, onde os animais que receberam AOs apresentaram maiores alturas de vilosidades de jejuno quando comparado com o grupo controle positivo. A administração dos aditivos via ração demonstrou eficácia no controle e na persistência da infecção por SH. No entanto, o uso de AOs foi mais eficaz para modular a microbiota cecal, provando que a composição da dieta pode modular populações de bactérias benéficas, mas tais microrganismos podem não estar correlacionadas com a redução da colonização cecal por SH.

Palavras chave: ácido orgânico, microbiota intestinal, peru, probiótico, produto de exclusão competitiva, *Salmonella*.

ABSTRACT - SILVA, T.M. Modulation of intestinal microbiota of commercial turkeys challenged with *Salmonella* Heidelberg and submitted to different control programs. Botucatu, 2017. Dissertation 89p (Master) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

The present study evaluated the use of organic acids (AOs), probiotic and competitive exclusion (CE) product administered continuously in the feed on the control *Salmonella* Heidelberg (SH) and action microbiota and morphometry intestinal. One hundred and seventy poult females were randomly distributed in five treatments with four replicates of eight birds each. In the 3rd and 10th day of life, the animals were submitted to the challenge with SH. In the 7th, 19th and 35th of life the birds were euthanized (n = 10) and samples of the crop, duodenum, jejunum, ileum and caeca were removed to quantification of SH, quantification relative of the *Faecalibacterium prausnitzii* and morphometric analysis. During the experimental period were performed cloacal swabs for SH research. The administration of probiotic and CE product was able to reduce the incidence and colonization of SH in the crop. In the caecum the treatments reduced SH only 19 days of age. Only the diet supplemented with AOs influenced positively on amount of *F. prausnitzii* in the cecum (19 and 35 days) and there was no correlation between the amount on the microorganism and the number of UFCs of SH. Fecal excretion of SH, was influenced by the treatments from 26 days of life, at 34 days all treatments reduced faecal excretion. The intestinal morphometry was influenced by the treatments only to seven days of age, where the animals that received AOs had higher jejunal villus heights of villi when compared with the positive control. The feed additives administration demonstrated effectiveness in controlling and in the persistence of the infection by SH. However, the use of AOs was most effective to modulate the cecal microbiota, proving that the composition of the diet can modulate populations of beneficial bacteria, but such microorganisms may not be correlated with the reduction of the SH.

Key words: competitive exclusion product, intestinal microbiota, organic acid, probiotic, turkey, *Salmonella*.

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

INTRODUÇÃO

Em constante evolução e expansão, a avicultura industrial é um importante segmento do agronegócio brasileiro. Decorrente a expressiva produtividade desse setor, o Brasil ocupa lugar de destaque no cenário mundial em termos de produção de proteína animal. Nesse contexto, a criação comercial de perus vem crescendo em ritmo considerável. Em 2016, foram produzidas 367.994 mil toneladas de carne da espécie, apontando um crescimento de 12,54% em relação a 2015. Do total produzido, 38% foram destinados à exportação, sendo a União Europeia (UE) o principal importador de cortes e industrializados, oriundos da criação (ABPA, 2017). O crescimento dessa atividade é fruto de grandes avanços e melhorias tecnológicas em toda cadeia produtiva (DECKER e GOMES, 2016), mas assume-se que a saúde animal constitua o fator de maior importância na criação comercial de perus (DANZEISEN et al., 2013).

O trato gastrointestinal (TGI) das aves abriga uma comunidade microbiana complexa e suas interações possuem uma relação simbiótica crítica com a saúde da espécie (DANZEISEN et al., 2013; WEI et al., 2013), podendo modular o estado nutricional, fisiológico, imunológico, o desenvolvimento do animal e a proteção contra patógenos (BRISBIN et al., 2008; ZHAO et al., 2012; PAN e YU, 2014). Cada vez mais, a importância do TGI e da microbiota intestinal para a melhoria da eficiência produtiva desses animais tem sido reconhecida, sendo alvo de interesse para a saúde e nutrição animal, segurança do alimento e saúde pública (OAKLEY et al., 2014).

Entre os fatores determinantes para a produção avícola moderna, estão as condições de criação, dietas rigorosamente controladas, vacinas, drogas anticoccidianas, fungicidas e antimicrobianos promotores de crescimento (APC) e terapêuticos (SCUPHAM et al., 2008). Esses mesmos fatores que tornam esse segmento economicamente viável, trazem consigo novos desafios. Um dos desafios amplamente questionável, implica no uso de antimicrobianos em concentrações subterapêuticas, objetivando melhorias na saúde e bem-estar animal, bem como a promoção de resultados significativos no desempenho e na melhoria dos índices zootécnicos, maximizando a produção por meio da modulação da microbiota

intestinal ou supressão da resposta imune inata do hospedeiro (MOORE et al., 1946; NIEWOLD, 2007).

Evidências apontam que a microbiota intestinal aviária pode servir como reservatório de genes de resistência aos antimicrobianos, bem como disseminar essa resistência à agentes patogênicos zoonóticos, como *Salmonella* spp. (DIBNER e RICHARDS, 2005; SILVA et al., 2016; CARD et al., 2017). Devido à emergência de bactérias resistentes aos antibióticos, as quais podem representar riscos para a saúde pública, preocupações sobre o uso de APC, na alimentação animal, têm aumentado (AARESTRUP et al., 2008). Essa polêmica questão da resistência bacteriana em humanos, fenômeno, em partes (LAXMINARAYAN et al., 2015), atribuído ao uso de APC, levou a UE, em 2006, e alguns países asiáticos a restringirem o uso desses na alimentação animal (EUROPEAN COMMISSION, 2003; LILLEHOJ e LEE, 2012). Em razão disso, países exportadores de produtos de origem animal, para a UE, baniram o uso de APC na alimentação (EUROPEAN COMMISSION, 2003a).

Baseando-se nos novos conceitos de segurança do alimento, cresce a urgência por alternativas ao uso dos APC, as quais sejam capazes de estimular o desenvolvimento de microrganismos benéficos, controlar e eliminar agentes patogênicos, garantindo benefícios para a saúde animal. Outras aplicações incluem o máximo desempenho animal e redução da exposição humana aos agentes patogênicos transmitidos pelos alimentos sem comprometer a qualidade do produto final. Desta forma, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas.

Uma das estratégias consiste na utilização de aditivos alternativos aos APC na alimentação animal. Dentre outros aditivos utilizados na nutrição de perus, cita-se o uso de probióticos, produtos de exclusão competitiva (EC) e ácidos orgânicos (AOs), os quais consistem em abordagens previamente reportadas com potencial para controlar *Salmonella* spp. (MENCONI et al., 2011; MILBRADT et al., 2014a; FORKUS et al., 2017). No entanto, a compreensão prática da microbiota intestinal e suas respectivas interações microbianas para a implementação de estratégias alimentares efetivas, objetivando melhorar a saúde intestinal de perus comerciais frente às condições de dieta, idade, ambiente, antimicrobianos e desafios de doenças ainda se faz necessária.

REVISÃO DE LITERATURA

Microbiota intestinal de aves

As diferentes secções que compõem o TGI de aves exercem funções na digestão alimentar, absorção de nutrientes, saúde intestinal e na saúde e bem-estar animal (GONG et al., 2007). Por sua vez, tais segmentos são colonizados por uma vasta e complexa microbiota (DANZEISEN et al., 2013; WEI et al., 2013; OAKLEY et al., 2014; PAN e YU, 2014; WEI et al., 2016), predominantemente composta por bactérias (GABRIEL et al., 2006), podendo, inclusive, abrigar microrganismos patogênicos (AMIT-ROMACH et al., 2004).

Em condições normais, a microbiota intestinal fornece benefícios ao hospedeiro, além de conferir proteção contra patógenos. Ela é responsável por modular o desenvolvimento epitelial intestinal e também pela funcionalidade metabólica direta ou indireta de outros sistemas orgânicos (GAGGIÀ et al., 2010; PAN e YU, 2014).

Diversos fatores determinam a homeostase e a composição microbiana presente no TGI, dentre outros, citam-se: agentes infecciosos (bactérias, vírus, parasitas), toxinas, idade, ambiente, características anatômicas e morfológicas do TGI, pH, tempo de trânsito intestinal e as características químicas e físicas da dieta. Esses fatores explicam as variações encontradas na composição microbiana intestinal e no desempenho de aves submetidas a diferentes condições de criação (REHMAN et al., 2007; YEGANI e KORVER, 2008).

Assim como em outros vertebrados, a colonização microbiana no TGI de aves varia entre 10^8 e 10^{11} células/g de digesta presente no intestino delgado e nos cecos, respectivamente. Essa densidade permanece relativamente estável durante os primeiros 30 dias de vida (BARNES, 1972b; APAJALAHTI et al., 2004), tornando-se mais diversificada e uniforme com o aumento da idade do animal (LU et al., 2003; PEDROSO et al., 2016). Segundo Stanley et al. (2013), essa colonização parece ter início imediatamente após a eclosão, porém outros autores lançam a hipótese de que a colonização inicia-se com a formação do embrião, por transmissão vertical, pela ingestão do líquido amniótico e internalização do saco da gema (PEDROSO e LEE, 2015).

Em aves, o inglúvio e os cecos constituem os principais locais de atividade bacteriana, e, em menor grau, o intestino delgado (GABRIEL et al., 2006). De modo geral, ocorre um aumento na diversidade e na complexidade bacteriana do TGI superior para secções mais distais (GONG et al., 2007; REHMAN et al., 2007). No intestino delgado, tem-se a presença de bactérias Gram-positivas anaeróbicas facultativas, enquanto que, nos cecos, há o predomínio de bactérias estritamente anaeróbicas (BARNES et al., 1972a). Tradicionalmente, essa composição foi estudada baseando-se em técnicas de cultivo clássicas (BARNES, 1979). Diante das limitações dessas metodologias, bem como das condições estritas de crescimento, parte considerável dos microrganismos permaneceu desconhecida e inexplorada. Com os avanços no campo da metagenômica, análises baseadas no 16S rRNA gene, utilizando tecnologias de sequenciamento de alto rendimento e última geração tem-se fornecido novos estudos, mais detalhados, da microbiota intestinal e das respectivas interações microbianas ocorridas no TGI (MOHD SHAUFI et al., 2015; DEUSCH et al., 2015).

Wei et al. (2013) elaboraram um consenso sobre a comunidade microbiana intestinal de frangos e perus saudáveis. Em perus, a análise do 16S rRNA gene (duodeno, jejuno e íleo) revela a existência de 69 gêneros bacterianos, os quais pertencem principalmente aos filos *Bacterioidetes* (28,8%) e *Firmicutes* (60,4%). Entre os gêneros mais predominantes, encontram-se: *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium* e *Ruminococcus*. Na microbiota cecal também é predominante a presença dos filos *Bacterioidetes* (55%) e *Firmicutes* (37%), sendo identificados 50 gêneros pertencentes a ambos os filos. No filo *Bacterioidetes*, mais de 80% das sequências gênicas avaliadas corresponderam a bactérias do gênero *Bacteroides* seguidas pelos gêneros *Prevotella*, *Paraprevotella*, *Capnocytophaga*, *Elizabethkingia*, *Flavobacterium* e *Ornithobacterium*. No filo *Firmicutes*, os gêneros *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Megamonas* e *Faecalibacterium* representaram maior parte das sequências gênicas. Em menor escala, observam-se bactérias dos gêneros *Blautia*, *Butyrivibrio*, *Butyricoccus*, *Alkaliphillus*, *Eubacterium* e *Pectinatus*. Enfatiza-se para as distinções presentes no microbioma intestinal e cecal de perus e frangos de corte, ambos compartilham baixa similaridade em nível filogenético (16 – 19% de similaridade em nível de espécie) (WEI et al., 2013; Wei et al., 2016).

Embora o mapeamento genético forneça informações cruciais sobre a estrutura da microbiota intestinal e cecal de perus, abordagens sobre a funcionalidade dessa comunidade, ou mesmo de membros individuais na espécie em questão, ainda estão limitadas. Sabe-se que em perus comerciais a idade é um fator de influência na diversidade bacteriana intestinal, além disso ocorrem diferenças no perfil microbiano de lotes pesados e leves, onde mudanças na composição da microbiota intestinal de perus visto como saudáveis podem acarretar em menor desempenho (DANZEISEN et al., 2013), também, é discutível o papel da dieta como um fator de impacto sobre a microbiota (PAN e YU, 2014).

A presença gênica reportada na microbiota intestinal e cecal, por sua vez, associa-se a bactérias específicas, as quais estão associadas com a capacidade de ativação do sistema imune intestinal, nutrição e com o aumento da resistência do hospedeiro à colonização por enteropatógenos, incluindo patógenos veiculados por alimentos, como *Salmonella* (OAKLEY et al., 2014).

Em geral, o gênero *Lactobacillus* é descrito como bactérias probióticas relacionadas com a produção de vitaminas essenciais e por contribuírem com o metabolismo e a recirculação de ácidos biliares (LUO et al., 2013), atuando também na imunomodulação e no controle de *Salmonella* (BAPTISTA et al., 2014; DONATO et al., 2015; PENHA FILHO et al., 2015). *Bacteroides* exercem efeitos benéficos sobre o hospedeiro, sendo um gênero com alta atividade hidrolítica na degradação de carboidratos indigeríveis, amido e celulose (LAN et al., 2005). Bactérias do gênero *Ruminococcus* encontram-se envolvidas na degradação de polissacarídeos (SERGEANT et al., 2014), espécies de *Clostridium* incluindo o gênero *Faecalibacterium* podem induzir a expansão de células T reguladoras, ou estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias (ATARASHI et al., 2011), sugere-se que *Faecalibacterium* tenha significativa atuação na produção de ácido butírico no lúmen cecal de frangos (EECKHAUT et al., 2011).

Salmoneloses aviárias e saúde pública

Salmonella consiste em um patógeno bacteriano de origem alimentar responsável por quadros gastroentéricos e infecções sistêmicas em humanos e animais (MAJOWICZ et al., 2010; GUNN, 2011).

No gênero *Salmonella* são descritos mais de 2.650 sorovares pertencentes a duas espécies *Salmonella enterica* e *S. bongori* (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). Os sorovares Gallinarum (SG), Pullorum (SP), Enteritidis (SE) e Typhimurium (ST) pertencentes à espécie *Salmonella enterica* e destacam-se por serem objetos de monitoramento pelo Programa Nacional de Saúde Animal (BERCHIERI JUNIOR e FREITAS NETO, 2009; BRASIL, 2009). Alimentos de origem avícola (ovos, carne e outros derivados) estão relacionados a maioria dos surtos de salmoneloses, em seres humanos (JACKSON et al., 2013; PIRES et al., 2014).

Na UE e nos EUA, os principais sorovares isolados, em criações comerciais de perus, são: Heidelberg, Saintpaul, Kottbus, Typhimurium, Newport, Reading, Bredeney, Enteritidis, Derby, Senftenberg e Agona (EFSA, 2008; HAFEZ, 2013). Entre os 20 sorovares relacionados a casos de salmonelose em humanos, cinco são frequentemente isolados de perus, sendo eles: Enteritidis, Heidelberg, Montevideo, Munchen e Agona (CDC, 2016).

Sabe-se que o consumo de carne de aves e ovos encontra-se em franca expansão, por serem considerados fontes proteicas de qualidade e de baixo custo. Nessa perspectiva, o aumento no consumo desses produtos e seus derivados aumenta o risco de exposição à *Salmonella* (FOLEY et al., 2011). Em países como EUA, onde existe rígido controle na área de saúde pública, estima-se que a *Salmonella enterica* seja responsável por 1.028 milhões de casos, 19 mil internações em hospitais e cerca de 400 mortes por ano (SCALLAN et al., 2011).

Nos últimos anos, têm ocorrido significativas alterações na ecologia e dinâmica das populações de *Salmonella enterica* relacionadas a aves comerciais e nos casos de infecções humanas ocasionadas por sorovares de origem avícola. No início do século XX, os sorovares Pullorum e Gallinarum estavam disseminados nos rebanhos avícolas dos EUA (SHIVAPRASAD e BARROW, 2013), chegando ao plantel brasileiro por meio de importação de material genético contaminado. Esses sorovares eram responsáveis por infecções denominadas de pulorose (SP) e tifo aviário (SG), as quais causavam alta mortalidade e, dessa forma, grandes prejuízos ao setor avícola. Por esse motivo foram alvos de programas de erradicação instituídos por órgãos governamentais (Programa Nacional de Sanidade Avícola,

Regulamento 2160/2003 e 584/2008/UE) e empresas privadas (medidas rigorosas de biossegurança; vacinação; boas práticas de produção/fabricação) (BRASIL, 1994; EUROPEAN COMMISSION, 2003b; EUROPEAN COMMISSION, 2008; BERCHIERI JÚNIOR e FREITAS NETO, 2009). Acredita-se que quando um sorovar é erradicado, outros sorovares possam emergir, ocupando seu nicho ecológico. Sendo assim, uma das consequências da erradicação da SG foi a emergência da *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SE), o que acarretou em problemas para o setor e de saúde pública, devido ao aumento dos surtos, em humanos, associados ao consumo de produtos avícolas contaminados por SE (BÄUMLER et al., 2000; FOLEY et al., 2011).

Gradualmente, ao longo dos últimos anos o controle de SE e ST tem mostrado progresso, mas os desafios ainda persistem e alterações na prevalência e na dinâmica dos sorovares envolvidos em surtos de infecções associado a carne e derivados de perus continuam ocorrendo (KINROSS et al., 2014).

Nos EUA, no ano de 2014 a *Salmonella* Heidelberg (SH) figurou como o segundo sorovar mais comumente isolado em surtos de infecções ocorridas em perus (USAHA, 2015). Em 2013, o sorovar Heidelberg foi o sexto mais isolado em casos de infecções humanas, nos EUA (CDC, 2016). A ingestão de carne contaminada e derivados de frangos, perus e ovos são as principais fontes de contaminação por SH nos surtos envolvendo a bactéria (CHITTICK et al., 2006; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2010).

No Brasil, tem sido relatado o isolamento de SH em aves e derivados avícolas desde o ano de 1962 (HOFER et al., 1997). Pulido-Landínez et al. (2013) conduziram uma pesquisa, na região sul do Brasil, a qual objetivou avaliar a diversidade de sorovares isolados em frangos de corte e no ambiente de produção, o Heidelberg foi o principal sorovar associado a contaminação na produção. Outros resultados comprovam prevalência do sorovar Heidelberg na avicultura de corte em alguns estados brasileiros. Pandini et al. (2014) realizando uma pesquisa de *Salmonella* em granjas localizadas no estado do Paraná, constataram a prevalência do sorovar Heidelberg, representando 12,3% entre os isolados. Segundo Voss-Rech et al. (2015), nos estados do Paraná, Mato Grosso do Sul e Santa Catarina, o sorovar Heidelberg foi o terceiro mais frequentemente isolado, 7,31% do total de 82

isolados oriundos de três diferentes empresas. O perfil de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos apresentado pelos isolados, em ambos os estudos, corroboram com o conhecimento sobre a condição de resistência antimicrobiana do sorovar.

O resultado da infecção por microrganismos do gênero *Salmonella* varia de acordo com o sorovar envolvido, idade, exposição e, em menor grau, com genótipo da ave (SMITH e BEAL, 2008). Em geral, o inglúvio e os cecos constituem os principais locais de colonização por *Salmonella* em aves (IMPEY et al., 1984; DURANT et al., 1999). Infecções por sorovares paratíficos resultam em colonização intestinal, bacteremia e disseminação sistêmica, sem sinais clínicos evidentes (GAST, 2013).

Comparando com outros sorovares do gênero que causam quadros de infecções gastroentéricas, em seres humanos, inclusive com SE, a SH tende a ser mais invasiva e mais patogênica, pois pode causar alterações sistêmicas, como sepse e miocardite (WILMSHURST e SUTCLIFFE, 1995; GAST, 2013).

Nos casos de infecções que ocorrem em frangos e perus jovens, bactérias do gênero *Salmonella* podem colonizar o TGI, sendo isoladas com alta frequência e excretadas por várias semanas. Embora ocorra um declínio na eliminação, quando a ave atinge a maturidade, esses microrganismos podem persistir na mucosa intestinal por meses (SMITH e BEAL, 2008; GAST, 2013). A persistência da infecção por *Salmonella* pode levar ao desequilíbrio da microbiota intestinal, além de causar danos à saúde e ao desempenho da ave (SADEYEN et al., 2006).

Dieta e a microbiota intestinal de aves

Na dieta estão presentes uma gama de nutrientes essenciais para a manutenção do TGI saudável, o que é fundamental para a adequada digestão, absorção, metabolismo de nutrientes e para a regulação da resposta imune do hospedeiro (YEGANI e KORVER, 2008). A composição e a digestibilidade da dieta constituem fatores que podem influenciar a microbiota intestinal das aves, uma vez que os compostos presentes servem como substratos para o crescimento de microrganismos intestinais (APAJALAHTI e VIENOLA, 2016).

Níveis de nutrientes (gorduras, proteínas e carboidratos), aditivos, tamanho e tipo de alimento e a técnica de processamento, são alguns dos fatores capazes de determinar o equilíbrio microbiano intestinal e reduzir a colonização por patógenos entéricos (APAJALAHTI et al., 2004; YEGANI e KORVER, 2008). Desse modo, alterações na dieta têm efeitos sobre a microbiota intestinal, influenciando a habilidade do animal em digerir e absorver nutrientes essenciais para o crescimento e desempenho animal (COWIESON et al., 2006).

Durante muitos anos os APC têm sido rotineiramente utilizados como aditivos na alimentação animal, seja para prevenir doenças ou como melhoradores de crescimento, garantindo a máxima eficiência alimentar e apresentando impactos significativos no desempenho animal e na modulação da microbiota intestinal (HUYGHEBAERT et al., 2011; DANZEISEN et al., 2015; APAJALAHTI e VIENOLA, 2016).

Diversos estudos têm avaliado o impacto do uso de APC sobre a microbiota intestinal. É sugerido que o efeito promotor de crescimento ocorra devido à alterações benéficas na microbiota do hospedeiro, por meio da redução no número de bactérias e redução na competição por nutrientes no intestino delgado. Pode ocorrer também pela inibição da produção e excreção de mediadores inflamatórios para o controle de patógenos ou pela seleção de bactérias capazes de extrair maior energia da dieta (DIBNER e RICHARDS, 2005; NIEWOLD, 2007).

Ainda que a interação entre o uso de antimicrobianos e a microbiota intestinal esteja relacionada a benefícios para a saúde, desempenho animal, meio ambiente e com a rentabilidade da avicultura intensiva, o uso subterapêutico frequente de APC tem sido muito questionado por preocupações relacionadas a saúde humana, face ao aumento da prevalência e disseminação de resistência entre bactérias patogênicas, o que vem comprometendo potencialmente a eficácia terapêutica em seres humanos (AARESTRUP et al., 2008; HUYGHEBAERT et al., 2011; LILLEHOJ e LEE, 2012; HAO et al., 2014).

Devido a influência da dieta na composição microbiana intestinal, o manejo da microbiota, por meio de alterações na dieta, desempenha um papel importante na saúde e no desempenho do hospedeiro (CHOCT, 2009; APAJALAHTI e VIENOLA, 2016). Em princípio, a ampliação de estratégias nutricionais

sustentáveis aplicadas na dieta, incluindo uma seleção adequada de matérias-primas para a produção da ração e o uso de aditivos, podem servir como moduladores de microbiota eficientes, capazes de inibir o crescimento de bactérias patogênicas e assim melhorar a saúde intestinal (RINTILÄ e APAJALAHTI, 2013).

***Faecalibacterium prausnitzii* e microbiota intestinal**

Faecalibacterium prausnitzii pertence ao gênero *Faecalibacterium*, o qual inicialmente foi denominado como *Fusobacterium prausnitzii*, esse microrganismo é um bacilo Gram negativo, imóvel, extremamente sensível ao oxigênio, o que dificulta seu cultivo, mesmo em anaerobiose. Os produtos finais da fermentação do microrganismo *F. prausnitzii*, a partir da glicose, consistem em ácido butírico, acético, fórmico e D-lactato (DUNCAN et al., 2002).

Semelhante a outras bactérias, presentes na microbiota intestinal, sensíveis ao oxigênio, até o presente momento, ainda pouco se sabe acerca da biologia, microbiologia e do efeito benéfico de *F. prausnitzii* para aves. Ressalta-se, seu importante papel na manutenção das funções vitais da microbiota intestinal humana e na prevenção de doenças intestinais (MIQUEL et al., 2014). Trabalhos relacionados a função desse microrganismo com foco na produção e sanidade avícola ainda são escassos, sendo sugerida significativa atuação na produção de ácido butírico, no lúmen cecal de frangos (LUND et al., 2010; EECKHAUT et al., 2011).

Em frangos de corte, foi demonstrado que a suplementação com microrganismos do gênero *Lactobacillus* pode modular o equilíbrio intestinal, proporcionando alterações nas concentrações de ácidos graxos voláteis (AGVs) e redução do pH ao longo do TGI (MEIMANDIPOUR et al., 2011). Sugere-se que a administração *Lactobacillus* exerça uma cooperação simbiótica para o aumento da população bacteriana de *F. prausnitzii* na microbiota cecal (GÉRARD et al., 2008). Resultados obtidos por Meimandipour et al. (2010a), por meio da simulação do ambiente cecal, *in vitro*, demonstraram que a suplementação com um probiótico à base de *Lactobacillus* aumentou a concentração de bactérias do mesmo gênero e também a população de *Bifidobacterium* spp. e *F. prausnitzii*, consequentemente, houve aumento na concentração de ácido butírico e inibição do crescimento de

Salmonella. Nesse sentido, o uso de probiótico à base de bactérias lácticas, principalmente do gênero *Lactobacillus*, seria de grande valia, uma vez que essas apresentam efeitos butirogênicos, sugerindo a proliferação bactérias butirogênicas via *cross feeding* (MEIMANDIPOUR et al., 2010b).

Acredita-se que a proliferação de bactérias butirogênicas, como *F. prausnitzii*, seja uma das formas de controle da *Salmonella* spp., mas avaliações mais aprofundadas sobre interferência dos aditivos alternativos aos APC na microbiota cecal, mais especificamente sobre as populações do microrganismo *F. prausnitzii* devem ser realizadas.

Exclusão Competitiva

Exclusão competitiva refere-se ao fenômeno pelo qual a microbiota intestinal normal se estabelece e confere proteção ao hospedeiro para resistir a colonização por patógenos (FULLER, 1989). O conceito de EC, inicialmente foi proposto por Nurmi e Rantala, em 1973. Esses pesquisadores observaram que, a administração oral de microbiota intestinal, derivada de aves adultas, para aves recém eclodidas poderia acelerar a colonização intestinal por microrganismos benéficos, impedindo a colonização por *Salmonella* (NURMI e RANTALA, 1973). Desde então, o princípio de EC vem sendo adaptado e aplicado em produtos de EC, como medida profilática com potencial para prevenir e controlar infecções por *Salmonella* spp. e outros patógenos, na avicultura comercial (KERR et al., 2013).

Produtos de EC são produzidos diretamente a partir do ceco de aves adultas, isentas de patógenos, ou por meio do cultivo microbiológico de conteúdos cecais (PEDROSO e LEE, 2015). Suas composições, comumente, variam conforme a abordagem de preparo. Dentre outros aspectos, o efeito protetor desses produtos depende da administração de culturas viáveis, cultivadas tanto sob condições aeróbiose ou anaeróbiose, podendo as mesmas serem de composição definida (poucas espécies bacterianas) ou indefinida (várias espécies), ambas eficazes na redução significativa de *Salmonella* (PASCUAL et al., 1999; ANDREATTI FILHO et al., 2003; REVOLLEDO et al., 2006).

As interações microbianas e o mecanismo exato de proteção promovido pela microbiota competitiva, em partes, ainda são desconhecidos. Acredita-se que, inicialmente, a proteção seja resultado da redução na competição pelos sítios de ligação entéricos, competição por nutrientes, produção de compostos antimicrobianos como AGVs e de efeitos indiretos como a estimulação da imunidade do hospedeiro (GABRIEL et al., 2006; LA RAGIONE e MEAD, 2013). Segundo Revollo et al. (2006), é sugerido que os AGVs produzidos pela microbiota saudável, após a administração de EC, sejam responsáveis por estimular a imunidade da mucosa intestinal, porém, poucos estudos foram conduzidos para esclarecer esse mecanismo de ação.

Além dos benefícios, produtos de EC são amplamente reconhecidos por serem produtos naturais, alternativos aos APC. Em termos de biossegurança, particularmente o tratamento com EC em criações de frangos e perus é preconizado antes da eclosão (*in ovo*), ou nas primeiras horas de vida, podendo também serem veiculados aos animais por meio de aplicação por *spray*, através da ração ou pelo tratamento via água de bebida (SCHNEITZ, 2005).

Muitos estudos demonstram a eficácia da ação de produtos de EC sobre a microbiota de perus comerciais, em condições de laboratório, ensaios de campo e em condições comerciais, ocorrendo variações na eficácia da EC contra *Salmonella* (LLOYD et al., 1977; HOFACRE et al., 2000; BIELKE et al., 2003; MILBRADT et al., 2014).

Segundo Lloyd et al. (1977) a inoculação de microbiota intestinal, em perus, aumenta a resistência à colonização por ST. Hofacre et al. (2000) investigando a ação do conteúdo cecal fresco proveniente de perus adultos, reportam que este demonstra efeito protetor significativo na proteção de perus de um dia de idade, contra desafio de *Salmonella*.

Bielke et al. (2003) selecionaram microbiota cecal de frangos adultos, e avaliaram a importância do estabelecimento intestinal precoce por microbiota benéfica na prevenção da colonização por SE em perus jovens. A maior proteção ocorreu com a administração em baixas concentrações de microbiota competitiva. Segundo Milbradt et al. (2014a), a dieta suplementada com produto de EC, composto por microbiota específica de perus, pode influenciar positivamente a

quantidade de bactérias ácido-láticas presentes no ingluvío e nos cecos de perus comerciais de corte, além de elevar a concentração de ácido butírico e reduzir a quantidade de membros da família Enterobacteriaceae e a colonização por SE nos cecos.

Em alguns países a utilização da EC como parte integrante de um programa biosseguridade demonstrou ser um método eficaz para o controle de *Salmonella* (MEAD et al., 2010).

Probióticos

Por definição, probióticos são culturas de microrganismos vivos benéficos que, quando suplementados na alimentação, são capazes de conferir efeitos benéficos para o hospedeiro e melhorar o equilíbrio microbiano intestinal (FULLER, 1989). Probióticos implicam em efeitos sobre a saúde e a produtividade. Dentre outras implicações, os mesmos são sugeridos para aumentar a resistência à colonização por agentes patogênicos, reduzir a incidência de doenças, promover a maturação e manutenção da integridade intestinal, modular o sistema imunológico, melhorar o metabolismo e a atividade de enzimas digestivas, o crescimento animal, a conversão e a eficiência alimentar (KABIR, 2009; HUYGHEBAERT et al., 2011).

Na avicultura, probióticos são rotineiramente utilizados como aditivos alimentares, objetivando modular a microbiota intestinal em benefício do hospedeiro (CHAMBERS e GONG, 2011). Uma variedade de bactérias probióticas, tais como *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* spp. são empregadas em preparações para aves, demonstrando capacidade para exercer efeitos sobre a saúde e a performance, auxiliando na proteção e controle de patógenos (KABIR, 2009; ARI et al., 2016).

Alguns dos mecanismos pelos quais os probióticos conferem a proteção e o controle de patógenos referem-se à estimulação de resposta imune intestinal, sistema de exclusão competitiva e produção de metabólitos antimicrobianos, tais como: AGVs, peróxido de hidrogênio e de carbono, substâncias antimicrobianas de

baixo peso molecular, bacteriocinas e inibidores de adesão/produção de mucinas (SERVIN, 2004; LEE et al, 2010). A estabilização da barreira epitelial, adesão ao epitélio e habilidades de agregação também são fatores determinantes à atividade probiótica (CISEK e BINEK, 2014).

Geralmente, probióticos são aplicados na nutrição de aves com base no conceito do fenômeno de EC (GAGGIÀ et al., 2010). O efeito da EC com diferentes bactérias probióticas sobre a microbiota intestinal tem sido extensivamente estudado em frangos, desempenhando um importante papel na prevenção da colonização e na redução de *Salmonella* spp. e outros patógenos intestinais na espécie. Até o momento, pouco se sabe sobre a influência de bactérias probióticas sobre a microbiota de perus. Grande parte dos estudos existentes nessa espécie foram conduzidos com formulações provenientes da microbiota intestinal de frangos (VICENTE et al., 2007; MENCONI et al., 2011; WOLFENDEN et al., 2011). Além disso, devido a diferenças existentes entre ambas as espécies, variações na eficácia de alguns produtos e a existência de dados inconsistentes, os resultados de estudos conduzidos em frangos não devem ser aplicados em perus (CALLAWAY et al., 2008; OTUTUMI et al., 2012).

Ácidos Orgânicos

Assim como os produtos de EC e probióticos, AOs têm sido propostos para atuar na homeostase da microbiota intestinal, com efeitos benéficos, além de potencial para controlar patógenos intestinais e atividade semelhante à dos APC (DIBNER e RICHARDS, 2005). Como um grupo químico, AOs compreendem a quaisquer ácidos que contenham uma carboxila em sua estrutura geral, incluindo AGVs e aminoácidos (KHAN e IQBAL, 2016).

Em geral, AOs relacionados com atividade antimicrobiana associam-se principalmente a ácidos graxos de cadeia curta (C_1 a C_7) (DIBNER e BUTTIN, 2002) e média (C_8 a C_{14}) (SKRIVANOVA et al., 2006; KOLLANOOR-JOHN Y et al., 2012). Os mesmos são amplamente encontrados na natureza como constituintes normais de plantas ou tecidos animais. Alguns ácidos graxos de cadeia curta como acético, propiônico e butírico são produzidos pela microbiota intestinal, por meio

da fermentação microbiana dos polissacarídeos não amiláceos (MEIMANDIPOUR et al., 2011).

AOs são utilizados como aditivos acidificantes de água de bebida ou da alimentação (DIBNER e BUTTIN, 2002), ambas as formas, objetivam diminuir o pH do alimento/água e do TGI. Uma vez presente no intestino, na forma não dissociada (lipossolúvel), esses são transportados através da membrana celular e dissociam-se no interior mais alcalino, acidificando o citoplasma bacteriano. Assim, suprimem a atividade de enzimas e inibem o crescimento de microrganismos patogênicos (VAN IMMERSEEL et al., 2006; DHAMA et al., 2014).

Além das alterações no pH do citoplasma bacteriano, é também descrito que determinadas concentrações de AOs tenham potencial para regular a capacidade de virulência inibindo a expressão de genes invasão de patógenos entéricos, como *Salmonella* (SUN e O'RIORDAN, 2013). Em conjunto com efeito antimicrobiano, o uso de AOs apresentam efeitos positivos sobre a proliferação de vilosidades e criptas intestinais (KHAN e IQBAL, 2016), particularmente, o ácido butírico é bem conhecido por sua atividade antimicrobiana e pela sua ação sobre o desenvolvimento do epitélio intestinal (LEESON et al., 2005).

É proposto que a suplementação com AOs de cadeia curta exerça efeito antimicrobiano no inglúvio e ausência de efeitos nas porções inferiores do TGI (THOMPSON e HINTON, 1997), já os AOs de cadeia média são inicialmente ativos a partir do duodeno, onde podem exercer atividade antimicrobiana, principalmente contra bactérias Gram positivas (VAN DER AAR et al., 2016). Atualmente, existem várias combinações de AOs disponíveis comercialmente no mercado, dentre outros fatores que influenciam a ótima ação antimicrobiana dessas formulações, destaca-se a forma química (esterificada ou não, ácido, sal, revestida ou não) (PATTEN e WALDROUP, 1988; THOMPSON e HINTON (1997), principalmente para os AOs de cadeia curta são empregadas diferentes técnicas, tal como o processo revestimento e/ou a micro-encapsulação, os quais auxiliam no transporte desses compostos até o TGI inferior, evitando a liberação no TGI superior, assim permitem, que a microbiota intestinal possa ser modificada (VAN IMMERSEEL et al., 2005; BEDFORD E GONG, 2017).

Na avicultura, dentre outros AGVs de cadeia média, o ácido caprílico (AC) tem apresentando resultados satisfatórios, quando utilizado no controle da *Salmonella* spp., em frangos e poedeiras. De acordo com Kollanoor-Johny et al. (2012), a suplementação com AC, na dieta de frangos, foi eficaz na regulação e na expressão de genes de virulência e na invasão intestinal por SE. Upadhyaya et al. (2015) relataram que o uso profilático de AC, na alimentação de poedeiras, reduziu a colonização por SE, nos órgãos internos, bem como a contaminação da gema e casca do ovo. Segundo Pickler et al. (2012), a eficácia dos AOs frente a *Salmonella* varia de acordo com a via de administração do produto e o sorovar envolvido. A ação ótima dos AOs é limitada conforme o local de absorção, sendo que o processo de microencapsulação limita a absorção nas porções superiores do TGI, assegurando o transporte desses até as porções mais distais, reduzindo a colonização de patógenos, nesses sítios (VAN IMMERSEEL et al., 2005).

Milbradt et al. (2014a) avaliaram o uso continuado de um *blend* comercial de AOs de cadeia curta e média (ácido acético, fórmico e ácidos graxos vegetais - 2g/kg de alimento) adicionados a ração de perus de corte desafiados com SE. Segundo os autores, o tratamento com AOs foi capaz de reduzir o número de bactérias da família Enterobacteriaceae, no inglúvio e nos cecos, aumentar a concentração de ácido butírico e reduzir o número de unidades formadoras de colônias de SE, nos cecos.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de AOs, probiótico e produto de EC em uma população microbiana intestinal e na morfometria intestinal de perus de corte desafiados com SH.

Objetivos específicos

Avaliar o uso dos aditivos, acima mencionados, no controle da infecção por SH, bem como sobre a persistência da excreção da mesma nas fezes;

Avaliar o efeito dos aditivos no desenvolvimento do epitélio intestinal;

Avaliar o efeito dos aditivos na quantidade relativa da bactéria *F. prausnitzii* no conteúdo cecal e a sua correlação com o controle da infecção por SH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M.; WEGENER, H.C.; COLLIGNON, P. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v.6, n.5, p.733-750, 2008.

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

ANDREATTI FILHO, R.L.; SAMPAIO, H.M.; BARROS, M.R.; GRATÃO, P.R.; CATANEO, A. Use of cecal microflora cultured under aerobic or anaerobic conditions in the control of experimental infection of chicks with *Salmonella* Enteritidis. **Veterinary Microbiology**, v.92, n.3, p.237-244, 2003.

ARI, M.M.; IJI, P.A.; BHUIYAN, M.M. Promoting the proliferation of beneficial microbial populations in chickens. **World's Poultry Science Journal**, v.72, n.4, p.785-792, 2016.

APAJALAHTI, J.; KETTUNEN, A.; GRAHAM, H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. **World's Poultry Science Journal**, v.60, n.2, p.223-232, 2004.

APAJALAHTI, J.; VIENOLA, K. Interaction between chicken intestinal microbiota and protein digestion. **Animal Feed Science and Technology**, v.221, p.23–330, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL – ABPA – **Relatório Anual 2017**, 68p, São Paulo.

ATARASHI, K.; TANOUE, T.; SHIMA, T.; IMAOKA, A.; KUWAHARA, T.; MOMOSE, Y.; CHENG, G.; YAMASAKI, S.; SAITO, T.; OHBA, Y.; TANIGUCHI, T.; TAKEDA, K.; HORI, S.; IVANOV, I.I.; UMESAKI, Y.; ITOH, K.; HONDA, K. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. **Science**, v.331, n.6015, p.337-341, 2011.

BAPTISTA, A.A.S.; DONATO, T.C.; GARCIA, K.C.O.D.; GONÇALVES, G.A.M.; COPPOLA, M.P.; OKAMOTO, A.S.; SEQUEIRA, J.L.; ANDREATTI FILHO, R.L. Immune response of broiler chickens immunized orally with the

recombinant proteins flagellin and the subunit B of cholera toxin associated with *Lactobacillus* spp. **Poultry science**, v.93, n.1, p.39-45, 2014.

BARNES, E.M. The avian intestinal flora with particular reference to the possible ecological significance of the cecal anaerobic bacteria. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.25, n.12, p.1475–1479, 1972a.

BARNES, E.M.; MEAD, G.C.; BARNUM, D.A.; HARRY, E.G. The intestinal flora of the chicken in the period 2 to 6 weeks of age, with particular reference to the anaerobic bacteria. **British Poultry Science**, v.13, n.3, p.311-326, 1972b.

BARNES, E.M. The intestinal microflora of poultry and game birds during life and after storage. **Journal of Applied Bacteriology**, v.46, n.3, p.407-419, 1979.

BEDFORD, A.; GONG, J. Implications of butyrate and its derivatives for gut health and animal production. **Animal Nutrition**, 2017.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E.P.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; FAGNANI ZUANAZE, M.A. (Ed). **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas: FACTA, 2009. cap. 4.1, p.434-454.

BIELKE, L. R.; ELWOOD, A. L.; DONOGHUE, D. J.; DONOGHUE, A. M.; NEWBERRY, L. A.; NEIGHBOR, N. K.; HARGIS, B. M. Approach for selection of individual enteric bacteria for competitive exclusion in turkey poults. **Poultry Science**, v.82, n.9, p.1378-1382, 2003.

BÄUMLER, A.J.; HARGIS, B.M.; TSOLIS, R.M. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. **Science**, v.287 n.5450, p.50-52, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria da Defesa Agropecuária. **Portaria SDA n. 194, de 19 de setembro de 1994**. Institui o programa nacional de sanidade avícola no âmbito da SDA e cria o comitê consultivo do programa de sanidade avícola. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, DF, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Saúde Animal. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual de legislação: programas nacionais de saúde animal do Brasil**. Brasília, 2009. 440p.

BRISBIN, J.T.; GONG, J.; SHARIF, S. Interactions between comensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken. **Animal Health Research Reviews**, v.9, n.1, p.101–110, 2008.

CALLAWAY, T.R.; EDRINGTON, T.S.; ANDERSON, R.C.; HARVEY, R.B.; GENOVESE, K.J.; KENNEDY, C.N.; NISBET, D.J. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. **Animal Health Research Reviews**, v.9, n.2, p.217-225, 2008.

CARD, R.M.; CAWTHRAW, S.A.; NUNEZ-GARCIA, J.; ELLIS, R.J.; KAY, G.; PALLAN, M.J.; WOODWARD, M.J.; ANJUM, M.F. An *in vitro* chicken gut model demonstrates transfer of a multidrug resistance plasmid from *Salmonella* to commensal *Escherichia coli*. **m.Bio**, v.8, n.4, e00777-17, 2017.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2016. National Enteric Disease Surveillance: *Salmonella* Annual Report, 2013: Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, 89p. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/salmonella-annual-report-2013-508c.pdf>> Acesso em: 28 fev. 2017.

CHAMBERS, J.R.; GONG, J. The intestinal microbiota and its modulation for *Salmonella* control in chickens. **Food Research International**, v.44, n.10, p.3149-3159, 2011.

CHITTICK, P.; SULKA, A.; TAUXE, R.V.; FRY, A.M. A summary of national reports of foodborne outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections in the United States: clues for disease prevention. **Journal of Food Protection**, v.69, n.5, p.1150-1153, 2006.

CHOCT, M. Feed non-starch polysaccharides: Chemical structures and nutritional significance. **Feed Milling International**, v.191, p.13-26, 1997.

CHOCT, M. Managing gut health through nutrition. **British Poultry Science**. v.50, n.1, p.9–15, 2009.

CISEK, A.A.; BINEK, M. Chicken intestinal microbiota function with a special emphasis on the role of probiotic bacteria. **Polish journal of veterinary sciences**, v.17, n.2, p.385-394, 2014.

DANZEISEN, J.L.; CALVERT, A.J.; NOLL, S.L.; MCCOMB, B.; SHERWOOD, J.S.; LOGUE, C.M.; JOHNSON, T.J. Succession of the turkey gastrointestinal bacterial microbiome related to weight gain. **PeerJ**, v.2013, n.1, 2013.

DANZEISEN, J.L.; CLAYTON, J.B.; HUANG, H.; KNIGHTS, D.; McCOMB, B.; HAYER, S.S.; JOHNSON, T.J. Temporal relationships exist between cecum, ileum, and litter bacterial microbiomes in a commercial Turkey flock, and subtherapeutic penicillin treatment impacts ileum bacterial community establishment. **Frontiers in Veterinary Science**, v.2, n.56, 2015.

DECKER, S.R.F.; GOMES, M.C. Análise do desempenho e participação da agricultura familiar na avicultura de corte na região sul do Rio Grande do Sul/Brasil. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v.6, n.1, p.15-25, 2016.

DEUSCH, S.; TILOCCA, B.; CAMARINHA-SILVA, A.; SEIFERT, J. News in livestock research — use of Omics -technologies to study the microbiota in the gastrointestinal tract of farm animals. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v.13, p.55–63, 2015.

DHAMA, K.; TIWARI, R.; KHAN, R.U.; CHAKRABORTY, S.; GOPI, M.; KARTHIK, K.; SAMINATHAN, M.; DESINGU, P. A.; SUNKARA, L.T. Growth promoters and novel feed additives improving poultry production and health, bioactive principles and beneficial applications: The trends and advances-A Review. **International Journal of Pharmacology**, v.10, n.3, p.129-159, 2014.

DIBNER, J.J.; BUTTIN, P. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. **Journal Applied Poultry Research**, v.11, n.4, p.453–463, 2002.

DIBNER, J.J.; RICHARDS, J.D. Antibiotic Growth Promoters in Agriculture: History and Mode of Action. **Poultry Science**, v.84, n.4, p.634-643, 2005.

DONATO, T.C.; BAPTISTA, A.A.S.; GARCIA, K.C.O.D.; SMANIOTTO, B.D.; OKAMOTO, A.S.; SEQUEIRA, J.L.; ANDREATTI FILHO, R.L. Effects of 5-hydroxytryptophan and m-hydroxybenzylhydrazine associated to *Lactobacillus* spp. on the humoral response of broilers challenged with *Salmonella* Enteritidis. **Poultry Science**, v.94, n.9, 2081-2087, 2015.

DUNCAN, S. H.; HOLD, G.L.; HARMSSEN, H.J.M.; STEWART, C.S.; FLINT, H.J. Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, n.6, p.2141-2146, 2002.

DURANT, J.A.; CORRIER, D.E.; BYRD, J.A.; STANKER, L.H.; RICKE S.C. Feed deprivation affects crop environment and modulates *Salmonella enteritidis* colonization and invasion of Leghorn hens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.1919–1923, 1999.

EECKHAUT, V.; VAN IMMERSEEL, F.; CROUBELS, S.; De BAERE, S.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; LOUIS, P.; VANDAMME, P. Butyrate production in phylogenetically diverse *Firmicutes* isolated from the chicken caecum. **Microbial Biotechnology**, v.4, n.4, p.503–512, 2011.

EFSA (European Food Safety Authority). Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in turkey flocks, in the EU, 2006-2007. Part A: *Salmonella* prevalence estimates. **The EFSA Journal**, v.134, p.1-91, 2008.

EUROPEAN COMMISSION. Regulation (EC) N° 1831/2003 Of the European parliament and of the council of 22 September 2003. On additives for use in animal nutrition. **Official Journal of the European Union**. European Parliament and The Council of The European Union, Bruxelles, 22 sep. 2003a.

EUROPEAN COMMISSION. Regulation (EC) N° 2160/2003 Of the European parliament and of the Council of 17 November 2003. On the control of salmonella and other specified food-borne zoonotic agents. **Official Journal of the European Union**. European Parliament and The Council of The European Union, Bruxelles, 17 nov. 2003b.

EUROPEAN COMMISSION. Regulation (EC) N.° 584/2008 Of the Commission of the European communities of 20 June 2008. Implementing Regulation (EC) N ° 2160/2003 of the European Parliament and of the Council as regards a Community target for the reduction of the prevalence of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella*

typhimurium in turkeys. **Official Journal of the European Union**. European Parliament and The Council of The European Union, Bruxelles, 20 jun. 2008.

FDA, Food and Drug Administration. National Antimicrobial Resistance Monitoring System-enteric bacteria (NARMS): 2007 executive report. U.S. Department of Health and Human Services, Rockville, MD, 2010.

FOLEY, S.L.; NAYAK, R.; HANNING, I.B.; JOHNSON, T.J.; HAN, J.; RICKE, S.C. Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.13, p.4273-4279, 2011.

FORKUS, B.; RITTER, S.; VLYSIDIS, M.; GELDART, K.; KAZNESSIS, Y.N. Antimicrobial probiotics reduce *Salmonella enterica* in turkey gastrointestinal tracts. **Scientific Reports**, v.7, n.40695, 2017.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. A review. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, n.5, p.365-378, 1989.

GABRIEL, I.; LESSIRE, M.; MALLET, S.; GUILLOT, J.F. Microflora of the digestive tract: Critical factors and consequences for poultry. **World's Poultry Science Journal**, v.62, n.3, p.499–511, 2006.

GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, p.S15–S28, 2010.

GAST, R.K. Salmonella infections. In: SWAYNE, D. E.; GLISSON, J.R.; McDOUGALD, L.R.; NOLAN, L.K.; SUAREZ, D.L.; NAIR, V. (Eds). **Diseases of poultry**. 13. ed. Ames Iowa: Wiley-Blackwell, 2013. cap. 16, p.677- 736.

GÉRARD, P.; BRÉZILLON, C.; QUÉRÉ, F.; SALMON, A.; RABOT, S. Characterization of cecal microbiota and response to an orally administered *lactobacillus* probiotic strain in the broiler chicken. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.14, n1-3, p.115-122, 2008.

GONG, J.; SI, W.; FORSTER, R. J.; HUANG, R.; YUL, H.; YIN, Y, YANG, C.; HAN, Y. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial

community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. **FEMS Microbiol Ecology**, v.59, n.1, p.147–157, 2007.

GUNN, J.S. *Salmonella* host–pathogen interactions: a special topic. **Frontiers in Microbiology**, v.2, n.191, 2011.

HAFEZ, H.M. *Salmonella* infections in turkeys. In: Barrow, P.A.; Methner, U. (Eds). ***Salmonella in domestic animals***. 2.ed. Wallingsford: CABI Publishing, 2013. cap. 10, p.193-220.

HAO, H.; CHENG, G.; IQBAL, Z.; AI, X.; HUSSAIN, H.I.; HUANG, L.; DAI, M.; WANG, Y.; LIU, Z.; YUAN, H. Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. **Frontiers in Microbiology**, v.5, n.288, 2014.

HOFACRE, C.L.; PRIMM, N.D.; VANCE, K.; VANCE, K.; GOODWIN, M.A.; BROWN, J. Comparison of a lyophilized chicken-origin competitive exclusion culture, a lyophilized probiotic, and fresh turkey cecal material against *Salmonella* colonization. **Journal of Applied Poultry Research**, v.9, n.2, p.195–203, 2000.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S.J.; REIS, E.M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.2, p.55-62, 1997.

HUYGHEBAERT, G.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. **The Veterinary Journal**, v.187, n.2, p.182-188, 2011.

IMPEY, C.S.; MEAD, G.C.; GEORGE, S.M. Evaluation of treatment with defined and undefined mixture of gut microorganisms for preventing *Salmonella* colonization in chicks and turkey poults. **Food Microbiology**, v.1, n.2, p.143-147, 1984.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; DE PINNA, E.; NAIR, S.; FIELDS, P, WEILL, F.X. . Supplement 2008-2010 (No. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v.165, n.7, p.526-530, 2014.

JACKSON, B.R.; GRIFFIN, P.M.; COLE, D.; WALSH, K.A.; CHAI, S.J. Outbreak-associated *Salmonella enterica* serotypes and food commodities, United States, 1998-2008. **Emerging Infectious Diseases**, v.19, n.8, p.1239–1244, 2013.

KABIR, S.M. The role of probiotics in the poultry industry. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, n.8, p.3531-3546, 2009.

KERR, A. K.; FARRAR, A.M.; WADDELL, L.A.; WILKINS, W.; WILHELM, B.J.; BUCHER, O.; WILLS, R.W.; BAILEY, R.H.; VARGA, C.; McEWEN S.A.; RAJIĆ, A. A systematic review-meta-analysis and meta-regression on the effect of selected competitive exclusion products on *Salmonella* spp. prevalence and concentration in broiler chickens. **Preventive Veterinary Medicine**, v.111, n.1, p.112-125, 2013.

KHAN, S.H.; IQBAL, J. Recent advances in the role of organic acids in poultry nutrition. **Journal of Applied Animal Research**, v.44, n.1, p.359-369, 2016.

KINROSS, P.; van ALPHEN, L.; MARTINEZ URTAZA, J.; STRUELENS, M.; TAKKINEN, J.; COULOMBIER, D.; MÄKELÄ, P.; BERTRAND, S.; MATTHEUS, W.; SCHMID, D.; KANITZ, E.; RÜCKER, V.; KRISZTALOVICS, K.; PÁSZTI, J.; SZÖGYÉNYI, Z.; LANCZ, Z.; RABSCH, W.; PFEFFERKORN, B.; HILLER, P.; MOOIJMAN, K.; GOSSNER, C. Multidisciplinary investigation of a multicountry outbreak of *Salmonella* Stanley infections associated with turkey meat in the European Union, August 2011 to January 2013. **EuroSurveillance**, v.19, n.19, p.1-9, 2014.

KOLLANOOR-JOHN, A.; MATTSON, T.; ANANDA BASKARAN, S.; AMARLARADJOU, M.A.R.; HOAGLAND, T.A.; DARRE, M.J.; KHAN, M.I.; SCHREIBER, D.T.; DONOGHUE, A.M.; DONOGHUE, D.J.; VENKITANARAYANAN, K. Caprylic acid reduces *Salmonella* Enteritidis populations in various segments of digestive tract and internal organs of 3- and 6-week-old broiler chickens, therapeutically^{1,2}. **Poultry Science**, v.91, n.9, p.1686–1694, 2012.

LAN, P.T.N.; SAKAMOTO, M.; SAKATA, S.; BENNO, Y. *Bacteroides barnesiae* sp. nov., *Bacteroides salanitronis* sp. nov. and *Bacteroides gallinarum* sp. nov.,

isolated from chicken caecum. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, n.12, p.2853-2859, 2006.

LA RAGIONE, E.; MEAD, G. Competitive exclusion. In: BARROW, P.A.; METHNER, U. (Eds). ***Salmonella in domestic animals***. 2.ed. Wallingford: CABI Publishing, 2013. cap. 21, p.426-454.

LAXMINARAYAN, R.; MATSOSO, P.; PANT, S.; BROWER, C.; RØTTINGEN, J.A.; KLUGMAN, K.; DAVIES, S. Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. **The Lancet**, v.387, n.10014, p.168-175, 2015.

LEE, K.; LILLEHOJ, H.S.; SIRAGUSA, G.R. Direct-fed microbials and their impact on the intestinal microflora and immune system of chickens. **The Journal of Poultry Science**, v.47, n.2, p.106-104, 2010.

LEESON, S.; NAMKUNG, H.; ANTONGIOVANNI, M.; LEE, E.H. Effect of butyric acid on the performance and carcass yield of broiler chickens. **Poultry Science**, v.84, n.9, p.1418–1422, 2005.

LILLEHOJ, H.S.; LEE, W.K. Immune modulation of innate immunity as alternatives-to-antibiotics strategies to mitigate the use of drugs in poultry production. **Poultry Science**, v.91, n.6, p.1286-1291, 2012.

LLOYD, A.B.; CUMMING, R.B.; KENT, R.D. Prevention of *Salmonella typhimurium* infection in poultry by pretreatment of chickens and poults with intestinal extracts. **Australian Veterinary Journal**, v.53, n.2, p.82–87, 1977.

LU, J.; IDRIS, B.; HARMON, B.; HOFACRE, C.; MAURER, J.J.; LEE, M.D. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.11, p.6816-6824, 2003.

LUND, M.; BJERRUM, L.; PEDERSEN, K. Quantification of *Faecalibacterium prausnitzii*-and *Subdoligranulum* variabile-like bacteria in the cecum of chickens by real-time PCR. **Poultry Science**, v.89, n.6, p.1217-1224, 2010.

LUO, Y.H.; PENG, H.W.; WRIGHT, A.D.G.; BAI, S.P.; DING, X.M.; ZENG, Q.F.; LI, H.; ZHENG, P.; SU, Z.Y.; CUI, R.Y.; ZHANG, K.Y. Broilers fed dietary vitamins harbor higher diversity of cecal bacteria and higher ratio of *Clostridium*,

Faecalibacterium, and *Lactobacillus* than broilers with no dietary vitamins revealed by 16S rRNA gene clone libraries. **Poultry Science**, v.92, n.9, p.2358–2366, 2013.

MAJOWICZ, S.; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F.J.; KIRK, M.; O'BRIEN, S.J.; JONES, T.F.; FAZIL, A.; HOEKSTRA, R.M. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clinical Infectious Diseases** v.50, n.6, p.882–889, 2010.

MEAD, G.; LAMMERDING, A.M.; COX, N.; DOYLE, M. P.; HUMBERT, F.; KULIKOVSKIY, A.; PANIN, A.; do NASCIMENTO, V.P. WIERUP, M. Scientific and technical factors affecting the setting of *Salmonella* criteria for raw poultry: a global perspective. **Journal of Food Protection**, v.73, n.8, p.1566-1590, 2010.

MEIMANDIPOUR, A.; SHUHAIMI, M.; SOLEIMANI, A.F.; AZHAR, K.; HAIR-BEJO, M.; KABEIR, B.M.; JAVANMARD, A.; MUHAMMAD ANAS, O.; YAZID, A.M. Selected microbial groups and short-chain fatty acids profile in a simulated chicken cecum supplemented with two strains of *Lactobacillus*. **Poultry Science**, v.89, n.3, p.470–476, 2010a.

MEIMANDIPOUR, A.; HAIR-BEJO, M.; SHUHAIMI, M.; AZHAR, K.; SOLEIMANI, A.F.; RASTI, B.; YAZID, A.M. Gastrointestinal tract morphological alteration by unpleasant physical treatment and modulating role of *Lactobacillus* in broilers. **British Poultry Science**, v. 51, n.1, p.52-59, 2010b.

MEIMANDIPOUR, A.; SOLEIMANI, A.F.; HOUSHMAND, M.; KASIM, A.; HAIR-BEJO, M.; SHUHAIMI, M.; YAZID, A. M. Effects of rough handling on short chain fatty acid production and gastrointestinal pH in broilers and modulatory role of *Lactobacilli*. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.74, p.17030-17037, 2011.

MENCONI, A.; WOLFENDEN, A.D.; SHIVARAMAIAH, S.; TERRAES, J.C.; URBANO, T.; KUTTEL, J.; KREMER, C.; HARGIS, B.M.; TELLEZ, G. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture for the treatment of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in neonatal broiler chickens and turkey poults. **Poultry Science**, v.90, n.3, p.561-565, 2011.

MILBRADT, E.L.; OKAMOTO, A.S.; GARCIA, E.A.; SANFELICE, C.; CENTENARO, L.P.; ANDREATTI FILHO, R.L. Use of organic acids and competitive exclusion product as an alternative to antibiotic as a growth promoter in the raising of commercial turkeys. **Poultry Science**, v.93, p.1855–1861, 2014.

MILBRADT, E.L.; ZAMAE, J.R.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P.; MAZZA, P.; PADOVANI, C.R.; CARVALHO, V.R.; SANFELICE, C.; RODRIGUES, D.M, OKAMOTO, A.S.; ANDREATTI FILHO, R.L. Control of *Salmonella* Enteritidis in turkeys using organic acids and competitive exclusion product. **Journal Applied Microbiology**, v.117, n.2, p554–563, 2014a.

MIQUEL, S.; MARTIN, R.; BRIDONNEAU, C.; ROBERT, V.; SOKOL, H.; BERMÚDEZ-HUMARÁN, L.G.; THOMAS, M.; LANGELLA, P. Ecology and metabolism of the beneficial intestinal commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii*. **Gut Microbes**, v.5, n.2, p.146-151, 2014.

MOORE, P.R.; EVENSON, A.; LUCKEY, T.D.; McCOY, E.; ELVEHJEM, C.A.; HART, E.B. Use of sulfasuxidine, streptothricin and streptomycin in nutritional studies with the chick. **Journal of Biological Chemistry**, v.165, p.437-441, 1946.

MOHD SHAUFI, M.A.M.; SIEO, C.C.; CHONG, C.W., GAN, H.M.; HO, Y.W. Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. **Gut Pathogens**, v.7, n.4, 2015.

NIEWOLD, T. A. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. **Poultry Science**, v.86, p.605–609, 2007.

NURMI, E.; RANTALA, M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. **Nature**, v.241, n.5386, p.210-1, 1973.

OAKLEY, B.B.; LILLEHOJ, H.S.; KOGUT, M.H.; KIM, W.K.; MAURER, J.J.; PEDROSO, A.; LEE, M.D.; COLLET, S.R.; JOHNSON, T.J.; COX, N.A. The chicken gastrointestinal microbiome. **FEMS Microbiology Letters**, v. 360, n. 2, p.100-112, 2014.

OTUTUMI, L.C.; GÓIS, M.B.; DE MORAES GARCIA, E.R.; LODDI, M.M. Variations on the efficacy of probiotics in poultry. In: RIGOBELLO, E.C, (Ed). **Probiotics in animals**. Rijeka: InTech, 2012. Cap. 9, p. 203–230.

PANDINI, J. A.; da SILVA PINTO, F.G.; MULLER, J.M.; WEBER, L.D.; de MOURA, A.C. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.82, p.1-6, 2014.

PAN, D.; YU, Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. **Gut Microbes**. v.5, n.1, p.108–119, 2014.

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

PATTEN, J.D.; WALDROUP, P.W. Use of organic acids in broiler diets. **Poultry Science**, v.67, p.1178–1182, 1988.

PEDROSO, A.A.; BATAL, A B.; LEE, M.D. Effect of in ovo administration of an adult-derived microbiota on establishment of the intestinal microbiome in chickens. **American Journal of Veterinary Research**, v.77, n.5, p.514-526, 2016.

PEDROSO, A.A.; LEE, M.D. The composition and role of the microbiota in chickens. In: Niewold, T. (Ed.) **Intestinal Health**. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2015. cap.2, p. 21-50.

PENHA FILHO, R.A.C.; DÍAZ, S.J.A.; FERNANDO, F.S.; CHANG, Y.F.; ANDREATTI FILHO, R. L.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Immunomodulatory activity and control of *Salmonella* Enteritidis colonization in the intestinal tract of chickens by *Lactobacillus* based probiotic. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.167, n.1, 64-69, 2015.

PICKLER, L.; HAYASHI, R.M.; LOURENÇO, M.C.; MIGLINO, L.B.; CARON, L.F.; BEIRÃO, B.C.B; SILVA, A.V.F.; SANTIN, E. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.1, p.27-36, 2012.

PIRES, S.M.; VIEIRA, A.R.T.; HALD, T.; COLE, D. Source attribution of human salmonellosis: an overview of methods and estimates. **Foodborne pathogens and Disease**, v.11, n.9, p.667-676, 2014.

PULIDO-LANDÍNEZ, M.; SÁNCHEZ-INGUNZA, R.; GUARD, J.; do NASCIMENTO, V.P. Assignment of serotype to *Salmonella enterica* isolates obtained from poultry and their environment in southern Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v.57, n.4, p.288-294, 2013.

REHMAN, H.U.; VANHJEN W.; AWAD, W.A.; ZENTEK J. Indigenous bacteria and bacterial metabolic products in the gastrointestinal tract of broiler chickens. **Archives of animal nutrition**, v.61, n.5, p.319-335, 2007.

REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P.; MEAD, G.C. Prospects in *Salmonella* control: competitive exclusion, probiotics, and enhancement of avian intestinal immunity. **The Journal of Applied Poultry Research**, v.15, n.2, p.341-351, 2006.

RINTTILÄ, T.; APAJALAHTI, J. Intestinal microbiota and metabolites - implications for broiler chicken health and performance. **Journal of Applied Poultry Research** v.22, n.3, p.647-658, 2013.

SADEYEN, J.R.; TROTTEREAU, J.; PROTAIS, J.; BEAUMONT, C.; SELLIER, N.; SALVAT, G.; VELGE, P.; LALMANACH, A. C. *Salmonella* carrier-state in hens: study of host resistance by a gene expression approach. **Microbes and Infection**, v.8, n.5, p.1308-1314, 2006.

SCHNEITZ, C. Competitive exclusion in poultry: 30 years of research. **Food Control**, v.16, n.8, p.657–667, 2005.

SCUPHAM, A.J.; PATTON, T.G.; BENT, E.; BAYLES, D.O. Comparison of the cecal microbiota of domestic and wild turkeys. **Microbial Ecology**, v.56, n.2, p.322-331, 2008.

SERGEANT, M.J.; CONSTANTINIDOU, C.; COGAN, T.A.; BEDFORD, M.R.; PENN, C.W.; PALLAN, M. J. Extensive microbial and functional diversity within the chicken cecal microbiome. **PLoS ONE**, v.9, n.3, p.e91941, 2014.

SERVIN, A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, v.28, n.4, p.405–440, 2004.

SHIVAPRASAD, H.L.; BARROW, P. Pullorum disease and fowl typhoid. In: SWAYNE, D. E.; GLISSON, J.R.; McDOUGALD, L.R.; NOLAN, L.K.;

SUAREZ, D.L.; NAIR, V. (Ed). **Diseases of poultry**. 13. ed. Ames Iowa: Wiley-Blackwell, 2013. cap. 16, p.678- 693.

SILVA, T.M.; MILBRADT, E.L.; ZAMAE, J.C., ANDREATTI FILHO, R.L.; OKAMOTO, A.S. Transferência de resistência antimicrobiana entre enterobactérias patogênicas de importância aviária-Impactos em saúde pública. **Archives of Veterinary Science**, v.21, n.2, p. 9-20, 2016.

SKRIVANOVA, E.; MAROUNEK, M.; BENDA, V.; BREZINA, P. Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Clostridium perfringens* to organic acids and monolaurin. **Veterinarni Medicina**, v.51, n.3, p.81–88, 2006.

SMITH, A.L.; BEAL, R. The avian enteric immune system in health and disease. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K.A. (Ed) **Avian Immunology**. 1.ed. Oxford: Elsevier, 2008. cap. 13, p. 243-270.

STANLEY, D.; GEIER, M.S.; HUGHES, R.J.; DENMAN, S.E.; MOORE, R.J. Highly variable microbiota development in the chicken gastrointestinal tract. **PLoS ONE**, v.8, n.12, p.e84290, 2013.

SUN, Y.; O'RIORDAN, M.X.D. Regulation of bacterial pathogenesis by intestinal short-chain fatty acids. **Advances in Applied Microbiology**, v.85, p.93-118, 2013.

THOMPSON, J.L.; HINTON, M. Antibacterial activity of formic and propionic acids in the diet of hens on *Salmonellas* in the crop. **British. Poultry. Science**, v38, p.59–65, 1997.

UNITED STATES ANIMAL HEALTH ASSOCIATION (USAHA). 2015. Report of the committee on *salmonella*: united states animal health association. Disponível em <<http://www.usaha.org/Portals/6/Reports/2015/report-sal-2015.pdf>> Acesso em: 28 de fev. 2017.

UPADHYAYA, I.; UPADHYAY, A.; YIN, H.B.; NAIR, M.S.; BHATTARAM, V.K.; KARUMATHIL, D.; KOLLANOR-JOHN, A.; KHAN, M.I.; DARRE, M.J CURTIS, P.A.; VENKITANARAYANAN, K. Reducing colonization and eggborne transmission of *Salmonella* Enteritidis in layer chickens by in-feed supplementation of caprylic acid. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.12, n.7, p.591-597, 2015.

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

VAN DER AAR, P. J.; Molist, F.; Van Der Klis, J. The central role of intestinal health on the effect of feed additives on feed intake in swine and poultry. **Animal Feed Science and Technology**, 2016.

VAN IMMERSEEL, F.; RUSSELL, J. B.; FLYTHE, M. D.; GANTOIS, I.; TIMBERMONT, L.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. **Avian Pathology**, v.35, n.3, p. 182–188, 2006.

VICENTE, J.; HIGGINS, S.; BIELKE, L.; TELLEZ, G.; DONOGHUE, D.; DONOGHUE, A.; HARGIS, B. Effect of probiotic culture candidates on *Salmonella* prevalence in commercial turkey houses. **Journal of Applied Poultry Research**, v.16, n.3, p.471–476, 2007.

VOSS-RECH, D.; VAZ, C.S.L.; ALVES, L.; COLDEBELLA, A.; LEÃO, J.A.; RODRIGUES, D.P.; BACK, A. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v.94, n.3, p.433-441, 2015.

WEI, S.; MORRISON, M.; YU, Z. Bacterial census of poultry intestinal microbiome. **Poultry Science**, v.92, n.3, p.671-683, 2013.

WEI, S.; LILBURN, M.; YU, Z. The bacteriomes of ileal mucosa and cecal content of broiler chickens and turkeys as revealed by metagenomic analysis. **International Journal of Microbiology**, v.2016, 2016.

WILMSHURST, P.; SUTCLIFFE, H. Splenic abscess due to *Salmonella* Heidelberg. **Clinical Infectious Diseases**, v.21, n.4, p.1065-1066, 1995.

WOLFENDEN, R.E.; PUMFORD, N.R.; MORGAN, M.J.; SHIVARAMAIAH, S.; WOLFENDEN, A.D.; PIXLEY, C.M.; GREEN, J.; TELLEZ, G.; HARGIS, B.M. Evaluation of selected direct-fed microbial candidates on live performance and *Salmonella* reduction in commercial turkey brooding houses. **Poultry Science** v.90, n11, p.2627–2631, 2011.

ZHAO, L.; WANG, G.; SIEGEL, P.; HE, C.; WANG, H.; ZHAO, W.; ZHAI, Z.; TIAN, F.; ZHAO, J.; ZHANG, H.; SUN, Z.; CHEN, W.; ZHANG, Y.; MENG, H. Quantitative genetic background of the host influences gut microbiomes in chickens. **Scientific reports**, v.3, n.1163, 2012.

YEGANI, M.; KORVER, D.R. Factors affecting intestinal health in poultry. **Poultry Science**, v.87, n.10, p. 2052-2063, 2008.

PROPOSTA DE ESTUDO

A sanidade avícola, embora tenha sofrido profunda evolução, continua sendo dinâmica e desafiadora. Problemas anteriormente amenizados, como a alta incidência de SE nos plantéis de aves de corte, matrizes e abatedouros, deram lugar a outros, como a emergência de um novo sorovar, o Heidelberg, o qual tem demonstrado ser altamente patogênico para humanos. Sendo assim, estudos envolvendo o mesmo fazem-se urgentes, a fim de obter formas de controle e redução da bactéria. Assim como os demais sorovares, SH, coloniza os cecos, portanto a homeostase da microbiota intestinal e cecal é determinante no sucesso ou insucesso da colonização do agente.

Em humanos, *F. prausnitzii* é considerado um microrganismo comensal altamente funcional, devido à importância metabólica que o mesmo exerce. Em animais, não deve ser diferente, mas é necessário o aprofundamento das pesquisas para melhor compreensão da atividade dessa bactéria, bem como da melhor forma de interferir para que não ocorram prejuízos nas concentrações da mesma. Nesse sentido, a biologia molecular tem sido de grande valia, pois atualmente, o uso de ferramentas capazes de identificar e quantificar o DNA e RNA, como a qPCR (Polymerase Chain Reaction) em tempo real, possibilita uma visão ampla da microbiota intestinal, bem como da sua resposta a agentes patogênicos e mudanças na dieta, como a inclusão de aditivos alternativos aos antimicrobianos promotores de crescimento.

Nesse contexto, realizou-se um experimento, o qual é apresentado no capítulo 2, denominado de **Modulação da microbiota intestinal de perus de corte desafiados com *Salmonella* Heidelberg e submetidos a diferentes programas de controle**. Esse manuscrito seguiu-se as diretrizes editoriais preconizadas pela revista *Journal of Applied Microbiology* (ISSN 1364-5072) e teve como objetivo avaliar a resposta da microbiota intestinal e da morfologia intestinal de perus de corte alimentados com dieta acrescida de AOs, probiótico e produto de EC e posteriormente, infectados com SH.

CAPITULO 2

MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE PERUS DE CORTE DESAFIADOS COM *Salmonella* Heidelberg E SUBMETIDOS A DIFERENTES PROGRAMAS DE CONTROLE

Modulação da microbiota intestinal de perus de corte desafiados com *Salmonella* Heidelberg e submetidos a diferentes programas de controle

T.M. Silva¹, E.L. Milbradt¹, M.L.C. Arcuri², A.S. Okamoto¹, B.C. Silva³, J.L. Sequeira¹, C.R. Padovani⁴, V. Azevedo³, R.L. Andreatti Filho¹

Autor correspondente: andreatti@fmvz.unesp.br

Universidade Estadual Paulista- UNESP

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- FMVZ

Hospital Veterinário s/n

Departamento de Clínica Veterinária

Laboratório de Ornitopatologia – Fone/Fax: 055-14-3880-2067

Rua Prof. Doutor Walter Maurício Corrêa, s/n

Bairro: Unesp Campus de Botucatu, Botucatu - São Paulo, Brasil

CEP: 18618-681, Caixa Postal- 560

¹Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

²Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

³Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

⁴Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

RESUMO:

Objetivo: Avaliar o uso de ácidos orgânicos (AOs), Exclusão competitiva (EC) e probióticos administrados continuamente na ração no controle de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Heidelberg (SH) e a ação sobre a microbiota e morfometria intestinal

Métodos e Resultados: Foi avaliada a influência dos tratamentos sobre a população do microrganismo *Faecalibacterium prausnitzii*, morfometria intestinal, colonização de SH no ingluvío e no ceco e persistência da eliminação da bactéria nas fezes. No 3º e no 10º dia de vida, as aves foram desafiadas oralmente, via gavagem com 0,5 mL de 10^7 UFC de SH/mL, e 0,5 mL de 10^5 UFC de SH/mL respectivamente. No 7º, 19º e 35º de vida, foram eutanasiadas 10 aves por grupo experimental, sendo colhido segmentos de ingluvío, duodeno, jejuno, íleo e ceco. O probiótico e o produto de EC administrados continuamente na ração reduz a incidência e a colonização de SH no ingluvío. Nos cecos os tratamentos reduziram a colonização de SH somente aos 19 dias. A dieta suplementada com AOs influenciou positivamente na quantidade de *F. prausnitzii* no ceco e não houve correlação entre a quantidade relativa desse microrganismo com o controle da infecção por SH. A excreção fecal de SH, foi influenciada pelos tratamentos a partir dos 26 dias de vida das aves, aos 34 dias todos os grupos reduziram a excreção fecal. Aos sete dias, os animais que receberam AOs apresentaram maior altura das vilosidades no jejuno comparando com o grupo controle positivo.

Conclusão: A suplementação contínua dos aditivos via ração apresentou eficácia no controle e na redução da persistência da infecção por SH. O uso de AOs foi mais eficaz para modular a população microbiana da bactéria *F. prausnitzii* na microbiota cecal.

Importância e impacto do Estudo: A composição da dieta pode modular populações de bactérias butirôgenas, mas tais microrganismos podem não estarem correlacionados com a redução da colonização cecal por SH.

Palavras chave: ácido orgânico, *Faecalibacterium prausnitzii*, microbiota intestinal, peru, probiótico, produto de exclusão competitiva, *Salmonella*.

INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal (TGI) de perus é predominantemente composto por uma microbiota dinâmica, metabolicamente ativa e complexa, a qual desempenha papel vital na manutenção da função intestinal, saúde e desempenho animal (Danzeisen *et al.* 2013; Wei *et al.* 2016; Wilkinson *et al.* 2017). Nesse ambiente, está presente uma alta densidade de bactérias comensais (Barnes 1972), que em diferentes situações interagem diretamente com agentes patogênicos, modulando a colonização bacteriana intestinal.

Diversos estudos já demonstraram papéis cruciais relacionados a microbiota intestinal aviária, tais como: digestão, absorção de nutrientes e imuno modulação (Gong *et al.* 2007; Yeoman *et al.* 2012; Xiao *et al.* 2016), além de relevância para garantir a segurança do alimento, saúde animal e saúde pública (Oakley *et al.* 2014). No entanto, análises detalhadas que possibilitem compreender a funcionalidade da microbiota intestinal de perus, ou mesmo que forneçam informações sobre a predominância e a potencial importância de cada membro dessa comunidade frente aos desafios por agentes patogênicos ainda estão muito limitadas e pouco estudadas.

Reconhece-se que microrganismos do gênero *Faecalibacterium* representam cerca de 6% da microbiota cecal de perus adultos saudáveis (Wei *et al.* 2013). Uma das principais espécies membro desse gênero é o microrganismo *Faecalibacterium prausnitzii*, este, é consistentemente relatado como um importante produtor de ácido butírico nos cecos de aves (Bjerum *et al.* 2006; Lund *et al.* 2010) e como um indicador de saúde e alterações intestinais (Lopez-Siles *et al.* 2017). Devido a sua importância, se faz necessário ampliar a compreensão das interações desse microrganismo frente aos desafios intestinais, buscando melhor eficiência alimentar.

Salmoneloses causadas por sorovares não tifóides de *Salmonella enterica* são uma das causas mais importantes de infecções transmitidas por alimentos e um dos principais problemas de saúde pública, em termos globais, de alta morbidade e mortalidade (Majowicz *et al.* 2010). Esses sorovares constituem preocupação relevante para a produção avícola, pois a colonização por *S. enterica* no TGI de aves, principalmente frangos e perus, constituem reservatórios primários e

potenciais fatores de risco para contaminação do produto final (Behravesch *et al.* 2014).

Salmonella enterica subespecie *enterica* sorovar Heidelberg, figura como um sorovar não tifóide emergente em diversos países (Foley *et al.* 2011). No Brasil, sua prevalência vem aumentando em criações comerciais avícolas, em diversos estados brasileiros (Hofer *et al.* 1997; Pulido-andínez *et al.* 2013; Voss-Rech *et al.* 2015). Esse sorovar tem sido reportado como responsável por surtos de infecções ocorridos em perus (USAHA 2015), casos humanos de salmoneloses invasivas (Burt *et al.* 1990; Vugia *et al.* 2004). Em surtos recentes, o agente tem apresentado perfil de múltipla resistência antimicrobiana, o que desperta preocupação, pois trata-se de uma zoonose, portanto, um problema de saúde pública (CDC 2011; CDC 2016; Gieraltowski *et al.* 2016).

Atualmente, um dos desafios enfrentados pela indústria avícola mundial tem sido a busca por alternativas focadas no controle da SH, em toda a cadeia produtiva (Muniz *et al.* 2017; Voss-Rech *et al.* 2017). A problemática se faz maior devido a proibição do uso de antibióticos, como promotores de crescimento na alimentação animal. Alternativas como ácidos orgânicos (AOs), probióticos e produtos de exclusão competitiva (EC), prebióticos e enzimas, comumente estudadas, continuam em pauta, porém com diferentes combinações e enfoque são propostos na área de sanidade e nutrição para atuarem como moduladores de microbiota intestinal e para controlar *Salmonella* e outros patógenos intestinais.

O presente estudo objetivou avaliar o uso de probiótico, produto de EC, AOs administrados continuamente, via ração, sobre a morfometria intestinal, população de *F. prausnitzii* nos cecos e o controle da colonização e eliminação da SH.

MATERIAL E MÉTODOS

Declaração de Ética no uso de animais

O protocolo experimental foi submetido à aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) estando de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (Protocolo Número: 87/2016).

Amostras bacterianas e condições de cultivo

Probiótico

O probiótico foi composto por 11 amostras de bactérias ácido-láticas (*Lactobacillus reuteri* n= 9, *Lactobacillus frumenti* n= 1, *Lactobacillus johnsonii* n= 1), provenientes da microbiota cecal de perus de corte e selecionadas *in vitro*, no Laboratório de Ornitopatologia FMVZ-UNESP (Altarugio *et al.* 2017). Culturas das cepas selecionadas foram preparadas, separadamente, em 7 mL de Man, Rogosa and Sharpe caldo (MRS; Acumedia, Lansing, MI, USA) e incubadas a 37°C, durante 24 horas. Após o crescimento bacteriano, foi formado um *pool* das espécies cultivadas. Para determinar o número de unidades formadoras de colônias (UFCs) do probiótico, foram realizadas diluições decimais seriadas em solução tampão de salina fosfatada (PBS) (10mM Na₂HPO₄, 1mM KH₂PO₄, 140mM NaCl, 3mM KCl) pH 7,2, as quais foram plaqueadas em duplicata em deMan, Rogosa and Sharpe ágar (MRSA; Acumedia, Lansing, MI, USA).

***Salmonella* Heidelberg e desafio experimental**

Amostras de SH isoladas de perus de corte e matrizes de perus de corte foram previamente avaliadas *in vitro* e *in vivo*. Selecionou-se a cepa que apresentou características de virulência ou patogenicidade como: positividade para os genes de virulência *invA*, *agfA* e *lpfA*, resistência aos antibióticos: Ampicilina (10 µg); Amicacina (30 µg); Ceftiofur (30 µg); Ciprofloxacina (5 µg); Doxiciclina (30 µg); Gentamicina, (10 µg); Norfloxacina (10 µg); Tetraciclina (30 µg) (SENSIDISC; DME, Niterói, Brasil); resistência ao calor (55°C) (0,0848% após uma hora e 0,0009% após duas horas de exposição) e resistência ácida (pH 2,5, 6M HCL) (5,1087% após uma hora e 1,1957% após duas horas de exposição) conforme Berk *et al.* (2005).

A cepa foi marcada com ácido nalidíxico (Nal - WINTOMYLON[®]; Sanofi-Aventis, São Paulo, Brasil) e rifampicina (Rif - RIFALDIN[®]; Sanofi-Aventis, São Paulo, Brasil) por meio de cultivos sucessivos em ágar verde brilhante (AVB;

Oxoid, Basingstoke, UK) contendo doses crescentes de Nal e Rif conforme preconizado por Andreatti Filho *et al.* (1997). Para o desafio experimental, a cepa foi incubada a 40°C por 18 horas, em caldo infusão cérebro coração (Brain Heart Infusion Broth) (BHI; Acumedia, Lansing, MI, USA) contendo Nal/Rif 100 µg/mL. A quantificação de UFCs do inóculo foi realizada por meio de diluições decimais seriadas em PBS pH 7,2 e posterior plaqueamento, em duplicata, em AVB contendo Nal/Rif 100 µg/mL.

No terceiro e no décimo dia de vida, exceto as aves do grupo controle negativo, todas as demais foram desafiadas oralmente, via gavagem com 0,5 mL de 10^7 UFC de SH/mL, e 0,5 mL de 10^5 UFC de SH/mL respectivamente. Para as aves do grupo controle negativo foi administrado 0,5 mL de PBS, pH 7.2.

Aves, instalações e manejo

As instalações, equipamentos e ração foram monitorados para a presença de *Salmonella* spp., conforme protocolos preconizados Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL 1995; BRASIL 2003).

Para garantir que aves eram livres de *Salmonella* spp., no momento do alojamento, foi realizada a colheita de mecônio e retirada de 10 aves para eutanásia e posterior pesquisa de *Salmonella* spp. por meio da metodologia preconizada por Mallinson e Snoeyenbos (1989).

Cento e setenta perus de corte, fêmeas, de um dia de idade, da linhagem Nicholas (Aviagen, Brasil) foram adquiridas de um incubatório privado. As aves eram provenientes de matrizes certificadas como livres de *Salmonella* Pullorum, *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Typhimurium, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma Meleagridis*. No incubatório, as mesmas foram vacinadas contra as doenças de Newcastle, boubá aviária e rinotraqueíte infecciosa dos perus.

Medidas rigorosas de higiene e biosseguridade (separação lateral dos tratamentos, uso de equipamentos de proteção individual como botas, luvas e vestimentas de uso exclusivo de cada tratamento, bem como materiais para o manejo diário das aves, como baldes, esponjas e ancinho), foram tomadas para evitar contaminação cruzada durante a execução do experimento.

As aves foram distribuídas, aleatoriamente, em boxes de 5m², previamente cobertos com uma fina camada de maravalha e equipados com comedouro manual e bebedouro pendular. Os procedimentos de alojamento, alimentação e manejo foram similares para todas as aves, de acordo com o Manual da linhagem Nicholas (AVIAGEN Turkeys 2017a).

Dieta

O fornecimento de água e ração foi *ad libitum*. As dietas experimentais foram isonutritivas, formuladas à base de milho e farelo de soja, de acordo com níveis de exigências nutricionais recomendados pelo manual da linhagem Nicholas (AVIAGEN Turkeys 2017b). Todas as dietas eram livres de drogas anticoccidianas e promotores de crescimento. O programa alimentar foi constituído por duas fases, inicial (0-22 dias) e transição (22-35 dias). Sendo que na dieta inicial, a ração foi peletizada em *pellets* de 2,0 mm e na fase de transição, *pellets* de 6,0 mm.

Aditivos

Probiótico: Para inclusão na ração, o produto foi diluído em água destilada (1:10) e incorporado por aspersão, após o processo de peletização, na dosagem de 10⁶ UFC/kg de ração em ambas as fases de criação.

Produto de EC: Foi utilizado um produto comercial, na forma líquida, composto por microbiota intestinal inespecífica de perus SPF (*Specific Pathogen Free*), com nível de garantia de 10⁶UFC/mL. Para inclusão na ração, o produto de EC foi diluído em água destilada (1:10) e incorporado por aspersão, após o processo de peletização, 1 mL do produto por kg de ração em ambas fases de criação.

AOs: Formulação composta por um ácido orgânico de cadeia curta, produto na forma de sal contendo butirato de sódio (BS) 30% microencapsulado e um ácido orgânico de cadeia média, produto na forma líquida contendo ácido caprílico (AC) 99% P.a. A inclusão foi realizada da seguinte forma: **fase inicial** - 0,5 g de BS + 1 mL de AC/kg de ração, **fase de transição** – 1 g de BS + 2 mL AC/kg de ração.

Para garantir a viabilidade e a qualidade das cepas probióticas, o inóculo contendo as mesmas foi produzido semanalmente. Para aferir a viabilidade das bactérias ácido-láticas, foram colhidas duas amostras de ração, semanalmente. A

ração tratada com produto de EC e probiótico foi submetida à pesquisa de bactérias ácido-láticas por meio de cultivo em caldo MRS e plaqueamento em ágar MRSA.

Delineamento Experimental

As aves foram distribuídas, aleatoriamente, em cinco tratamentos com quatro repetições de oito aves cada, sendo: **Controle Negativo (CN)**: dieta basal, **AOs**: dieta basal + BS e AC (0-22 dias: 0,5 g de BS + 1 mL de AC/kg de ração; 22-35 dias: 1 g de BS + 2 mL AC/kg de ração) + desafio por SH, **Produto de EC**: dieta basal + 10^6 UFC/Kg de ração + desafio por SH, **Probiótico**: dieta basal + 10^6 UFC/kg de ração + desafio por SH, **Controle Positivo (CP)**: dieta basal + desafio por SH.

No terceiro e no décimo dia de vida, exceto as aves do grupo controle negativo, todos os grupos foram desafiados com SH. No 7º 19º e 35º dias foram eutanasiadas dez aves por grupo experimental e assepticamente foram removidos o inglúvio, duodeno, jejuno, íleo e ceco para quantificação relativa do microrganismo *Faecalibacterium prausnitzii*, análises de morfometria intestinal, quantificação de de SH no conteúdo de inglúvio e ceco e persistência da eliminação de SH nas fezes.

Quantificação de *Salmonella* Heidelberg

O inglúvio e um dos cecos foram removidos e colocados separadamente em bolsas plásticas estéreis, pesados e macerados com auxílio de espátula. De acordo com o peso do órgão e conteúdo determinou-se a quantidade de PBS pH 7,2 a ser adicionada a fim de alcançar a proporção de (1:10), obtendo-se a diluição 10^{-1} . Cada diluição foi plaqueada em AVB contendo Nal (100µg/mL) e Rif (100µg/mL) e as placas foram incubadas por 24 h a 40°C. O número de UFC/g de conteúdo e órgão foi convertido em escala logarítmica ($\log_{10}$) para interpretação dos resultados.

Análise de suabe cloacal para determinação da incidência de *Salmonella* Heidelberg

Para a colheita de suabe cloacal e o isolamento de SH, utilizaram-se protocolos preconizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL 1995). Os suabes foram colhidos e acondicionados em

tubos plástico contendo PBS pH 7,2, homogeneizados e incubados a 37°C por 24 horas. Após esse período, os mesmos foram homogeneizadas e submetidos ao enriquecimento seletivo em caldo Tetrationato (TT; Acumedia, Lansing, MI, USA) e Rappaport-Vassiliadis (RV, Acumedia, Lansing, MI, USA), sendo posteriormente incubadas a 37°C por 24 horas. As amostras foram cultivadas em AVB contendo Nal (100µg/mL) e Rif (100µg/mL) e incubadas por 24 horas a 40°C. Amostras que apresentaram colônias com morfologia típica de *Salmonella* foram consideradas positivas.

Análise histológica dos vilos e profundidade de cripta

Os segmentos intestinais foram divididos em **duodeno** - porção entre o piloro e a parte distal da alça duodenal, **jejuno** - a partir da parte distal da alça duodenal até o divertículo vitelino, **íleo** - a partir do divertículo vitelino até a inserção dos cecos e os **cecos** - da inserção até suas extremidades (Dyce *et al.* 1996). Para a avaliação da altura dos vilos e profundidade de criptas intestinais, fragmentos de aproximadamente 2 cm da porção média dos segmento, foram retirados e fixados em formol 10% por 48 h. Após esse período os fragmentos foram dissecados, desidratados em etanol, tratados com xilol e incorporados em parafina plástica. Secções de 5 µm foram preparadas utilizando um micrótomo automático, colocadas em lâminas de vidro e corados pela técnica hematoxilina-eosina – HE. Os cortes histológicos foram analisados e fotografados utilizando sistema analisador de imagem Axio Vision Software Rel. Versão 4.6.1 (Zeiss Vision) acoplado ao microscópio óptico modelo Axio Imager A1, Zeiss. As medidas de altura dos vilos, profundidade de criptas e relação vilo/cripta foram calculadas. Efetuaram-se 15 mensurações da altura dos vilos e 15 mensurações de profundidade de cripta de cada segmento colhido.

Quantificação relativa do *Faecalibacterium prausnitzii*

A colheita das amostras foi realizada de acordo com Wise e Siragusa (2007). Como controle positivo foi utilizado DNA genômico de *F. prausnitzii* (Cepa A2165). O DNA bacteriano das amostras foi extraído com kit de extração (QIAamp DNA Stool Mini Kit; Qiagen Valencia, CA) seguindo as instruções do fabricante.

PCR em tempo real (qPCR)

A quantificação relativa de *F. prausnitzii* foi obtida através da técnica de PCR quantitativo em tempo real, utilizando-se o StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems) que oferece a ferramenta de quantificação por curva padrão relativa. As reações de amplificação foram realizadas empregando o *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega, Madison, WI) ajustando-se o volume final de cada reação para 10 µL dos quais: 5 µL de *GoTaq® qPCR Master Mix* 2x, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo (F: 5'- cccttcagtgcgcagt-3' e R: 5'- gtcgcaggatgtcaagac-3', Rinttilä *et al.* 2004), 1 µL de DNA extraído inteirando-se com água DNase e RNase-Free (Water; Sigma, St. Louis,. MO), até atingir o volume final da reação. As condições utilizadas no modo de amplificação de longa duração para a quantificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguindo-se 40 ciclos compostos por uma etapa de desnaturação a 94°C por 15 segundos, uma etapa de anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto, seguidos de curva dissociação de 95°C até 60°C com leitura de fluorescência a cada 0,1°C. Para avaliar a inibição das reações de PCR, devido a possíveis substâncias inibidoras presentes nas amostras de conteúdo do ceco, foram realizadas reações com controle interno, conforme descrito por Lund *et al.* (2010). Para quantificação relativa do grupo alvo, foi utilizada uma alíquota de DNA genômico de *F. prausnitzii* (Cepa A2165) e, a partir dessa amostra, foram construídas curvas padrões com quatro pontos por meio de diluições sucessivas na proporção 1:2. Valores para a quantificação relativa das bactérias foram gerado usando SDS ver. 1.2.3 (Sistema de detecção de sequência 1.2.3-7300 Sistema de PCR em tempo real; Applied Biosystems, EUA).

Análise Estatística

Os resultados da contagem de SH foram submetidos à transformação logarítmica para alcançar a normalidade. Posteriormente, foram submetidos à análise de variância complementada com teste de Tukey de comparações múltiplas (5%), sendo calculada a média e o erro padrão médio ($\pm$ EPM). Para a avaliação da incidência de SH nos diferentes órgãos e suabe cloacal foi aplicado o teste de Goodman para contrastes entre e dentro de populações binomiais. Para a quantificação de *F. prausnitzii*, altura de vilosidades e profundidade de criptas, os

dados foram submetidos à técnica de análise de variância complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey (5%) (Zar, 2010).

Resultados

As amostras de ração colhidas semanalmente apresentaram as seguintes concentrações de bactérias ácido-láticas: Probiótico: $3,4 \times 10^5$ UFC/kg, $4,2 \times 10^6$ UFC/kg, $2,3 \times 10^5$ UFC/kg e 7×10^6 UFC/kg. Produto de EC: $7,1 \times 10^4$ UFC/kg, $3,3 \times 10^3$ UFC/kg, $5,2 \times 10^4$ UFC/kg e $1,1 \times 10^3$ UFC/kg.

Colonização e Incidência de *Salmonella* Heidelberg em conteúdo e órgão de ingluvío e ceco.

Os resultados da quantificação e incidência de SH, no ingluvío e ceco, estão apresentados na tabela 1. Nota-se que aos 19 dias de vida das aves, nove dias após o segundo desafio de SH, somente o tratamento com o probiótico foi capaz de reduzir a incidência a 20% e a colonização por SH no ingluvío. Ao contrário dos cecos, onde todos os tratamentos demonstraram capacidade de reduzir o número de UFC de SH em mais de uma unidade logarítmica, quando comparado com o grupo controle positivo.

Aos 35 dias de vida, as aves que receberam o produto de EC apresentaram menor incidência (10%) e menores contagens de SH no ingluvío quando comparado com os demais tratamentos. Da mesma forma que nos sete dias de vida, aos 35 nenhum tratamento foi capaz de reduzir a colonização e a incidência de SH no ceco.

Excreção fecal de *Salmonella* Heidelberg

Até o 23º dia de vida das aves, 13 dias após o segundo desafio, nenhum dos tratamentos avaliados reduziu a incidência da excreção fecal de SH. Somente aos 26 dias de vida das aves a excreção fecal foi influenciada pelos tratamentos, sendo que o grupo que recebeu AOs apresentou redução no número de aves eliminando a bactéria ($p \leq 0,05$). Aos 30 dias de vida, todos os tratamentos reduziram a eliminação da bactéria, quando comparado ao grupo não tratado. Aos 34 dias, observa-se redução e persistência da excreção fecal em todos os grupos experimentais (Tabela 3).

Morfologia Intestinal

Aos sete dias de vida, os animais que receberam dieta com AOs apresentaram maior altura das vilosidades no jejuno, quando comparado as aves pertencentes ao grupo controle positivo. Nos demais momentos avaliados, os tratamentos não influenciaram na altura das vilosidades e profundidade de criptas dos segmentos intestinais (Tabela 4).

Quantidade relativa de *F. prausnitzii* no conteúdo cecal

A quantificação do microrganismo *F. prausnitzii* no conteúdo cecal está apresentada na tabela 5. Observa-se que a quantidade relativa da bactéria se eleva com a idade das aves, não havendo diferenças entre os grupos experimentais aos sete dias de vida ($p>0,05$). As aves que receberam AOs apresentaram quantidades superiores da bactéria (19 e 35 dias) em relação aos demais grupos, evidenciando que o ácido caprílico e o ácido butírico podem influenciar positivamente a proliferação do microrganismo. Não houve correlação entre a quantidade relativa de *F. prausnitzii* no conteúdo cecal e o número de UFCs de SH.

Discussão

O efeito benéfico do uso de diferentes aditivos na alimentação de perus, tanto como alternativas ao uso de APC ou como ferramentas moduladoras de microbiota intestinal para prevenir e controlar a colonização intestinal por *Salmonella* spp. e outros patógenos, em perus de corte ainda é pouco documentado (Menconi *et al.* 2011; Milbradt *et al.* 2014a; Milbradt *et al.* 2014b; Evans *et al.* 2017; Forkus *et al.* 2017). Neste estudo, os aditivos utilizados continuamente, via ração, apresentaram efeitos positivos no controle e na redução da persistência da infecção por SH no inglúvio e no ceco, bem como sobre a população de *F. prausnitzii*, na microbiota cecal.

Nas aves, o inglúvio e os cecos constituem um dos principais sítios de atividade bacteriana (Gabriel *et al.* 2006) e também os principais locais de colonização por *Salmonella* (Impey *et al.* 1984, Durant *et al.* 1999). Acredita-se que o estabelecimento precoce de *Lactobacillus*, no inglúvio, seja essencial para a saúde

intestinal, pois fornece substrato para a fermentação microbiana, impedindo o crescimento de membros da família Enterobacteriaceae (Fuller 1977). Observamos que o incremento com *Lactobacillus* administrados, via ração, foi capaz de promover efeito positivo na redução da colonização e incidência de SH, no inglúvio, somente aos 19 dias de vida das aves.

Atualmente, as formulações probióticas existentes são produzidas com microbiota de frangos podendo ser utilizadas para perus. Como exemplo, cita-se o uso de bactérias probióticas extraídas de frangos e de fontes ambientais sendo estudadas e comercializadas para controlar *Salmonella* em perus (Hofacre *et al.* 2000; Vicente *et al.* 2007; Wolfenden *et al.* 2011; Menconi *et al.* 2011). Nossos resultados demonstram que o uso de probiótico produzido com cepas selecionadas de perus apresentou efeitos positivos na redução da colonização cecal por SH, aos 19 dias, no entanto, aos 35 dias o mesmo apresentou resultados semelhantes ao grupo controle positivo.

F. prausnitzii é abundante na microbiota intestinal de aves (Duncan *et al.* 2002; Lund *et al.* 2010) e considerado importante pela sua capacidade de produzir ácido butírico (Bjerum *et al.* 2006). Além de outros efeitos benéficos reconhecidos (Onrust *et al.* 2015), a presença do ácido butírico, no intestino de frangos, demonstrou exercer proteção contra *Salmonella* e outros patógenos entéricos (Fernandez-Rubio *et al.* 2009; Guilloteau *et al.* 2010; Song *et al.* 2017). Dessa forma, é de interesse o incremento na quantidade de *F. prausnitzii*, dado que a quantidade desse microorganismo pode modular os efeitos de outras bactérias e fornecer benefícios para o animal. Segundo Meimandipour *et al.* (2010), o uso de probiótico à base de bactérias ácido lácticas, principalmente do gênero *Lactobacillus*, apresentam efeitos butirogênicos, estimulando a proliferação de *F. prausnitzii* e, consequentemente, aumentando a concentração de ácido butírico. Para perus de corte, com as cepas de *Lactobacillus* utilizadas nesse estudo, não foi possível demonstrar esse efeito positivo.

Inicialmente, o uso de microbiota competitiva foi proposto com o objetivo de evitar a contaminação por *Salmonella* e acelerar a colonização por microbiota benéfica (Nurmi e Rantala 1973), o mecanismo exato dessa proteção ainda não está totalmente elucidado, sabe-se que, EC envolve a competição por substratos e sítios

de ligação e a produção de metabólitos antimicrobianos que inibem patógenos (Gabriel *et al.* 2006; La Ragione e Mead 2013).

Os resultados desse experimento indicaram que a administração do produto de EC demonstrou maior efeito protetor para controlar a colonização e diminuir a incidência de SH no inglúvio aos 35 dias de vida. Apesar de aqui não aprofundarmos sobre os mecanismos responsáveis por esta proteção, é sugestivo que os efeitos de proteção tenha ocorrido devido a maior viabilidade da microbiota competitiva no inglúvio em comparação com os outros tratamentos avaliados. Segundo Milbradt *et al.* (2014a) a suplementação de perus de corte via ração com produto de EC produzido com microbiota espécie específica, promove um incremento na quantidade de *Lactobacillus* no inglúvio e redução na quantidade de membros da família Enterobacteriaceae.

Rotineiramente, AOs de cadeia curta (BS) e média (AC) têm sido utilizados como aditivos na dieta de frangos e perus, demonstrando resultados satisfatórios na redução da colonização por *Salmonella*, quando utilizados de forma isolada (Van Immerseel *et al.* 2005; Kollanoor-Johny *et al.* 2012; Evans *et al.* 2017), sendo proposto que essa atividade antimicrobiana ocorra pela redução do pH intracelular, inibição da expressão gênica ou pela modulação da microbiota intestinal (Van Immerseel *et al.* 2006; Solis de los Santos *et al.* 2008).

Uma das variáveis que influencia na atividade antimicrobiana dos AOs consiste na forma química (esterificada ou não, ácido, sal, revestida ou não), a mesma determina o local de absorção e a ação ótima das formulações, sendo proposto que a suplementação com AOs não revestidos proporcionam efeitos antimicrobianos no inglúvio e que as formas revestidas levam esses compostos até o trato digestório inferior para que as células epiteliais do intestino também possam ser expostas ao ácido e, principalmente, para que a microbiota intestinal possa ser modificada (Thompson e Hinton 1997; Van Immerseel *et al.* 2005). Observamos que a formulação apresentada (BS revestido + AC não revestido) não apresentou efeito antimicrobiano contra SH no inglúvio, mas reduziu a colonização por SH no ceco aos 19 dias, não sendo capaz de reduzir o agente nesse órgão aos 35 dias.

O efeito combinado dessa mistura de AOs ainda não foi reportado para o controle de *Salmonella* na alimentação de perus de corte, no entanto, esses

resultados assemelham-se ao obtidos por outros estudos quando ambos os compostos foram utilizados de forma isolada e em dosagens similares na dieta de frangos de corte e poedeiras. Segundo Van Immerseel *et al.* (2005) o BS é capaz de reduzir a colonização cecal por *Salmonella*, no entanto, a eliminação intermitente persiste. Kollanoor-Johny *et al.* (2012) reportam que o AC promove redução de *S. Enteritidis* não apenas nos cecos, mas também no ingluvírio, intestino delgado, cloaca, fígado e no baço em cinco a dez dias após a infecção. No presente estudo, observamos uma redução eficaz apenas nos cecos aos 19 dias.

Em perus de corte, Evans *et al.* (2017) investigaram várias dosagens de AC (0,75, 1,5, 2,25 e 3 g/kg) na forma de pó para controlar *S. Typhimurium* em peruzinhos. Três dias após a infecção, apenas a dosagem de 3g/kg de ração apresentou contagens reduzidas do agente no ceco (redução de 1-log₁₀ UFC/g). Enfatizamos a necessidade de mais estudos para verificar o uso novas dosagens, a interação ou os efeitos sinérgicos da associação de ambos os ácidos no controle patógenos intestinais em perus.

A maior quantidade do microrganismo *F. prausnitzii* foi observada nos animais que receberam a dieta acrescida com AOs (19 e 35 dias), tal fato evidencia que a interação entre o AC e o BS pode estar implicada em alterações benéficas na modulação da microbiota cecal, podendo influenciar positivamente na proliferação de bactérias com efeitos butirogênicos, mas não influenciar especificamente no controle de *Salmonella*, haja vista as quantificações de UFCs de SH obtidas pelos animais de que receberam AOs aos 35 dias de vida e a ausência de correlação entre a quantidade relativa de *F. prausnitzii* no conteúdo cecal e o número de UFCs de SH em todos os grupos avaliados.

Particularmente, a abundância relativa observada na quantidade de *F. prausnitzii* pelo uso de AOs quando comparado aos demais tratamentos, indicam um proeminente papel na eficiência da formulação apresentada para modular a microbiota cecal, devendo o uso da mesma ser projetado como um caminho funcional para a promoção melhorias relacionadas à saúde intestinal de perus, devido às habilidades benéficas já reconhecidas desse microrganismo para a saúde intestinal humana e animal (Miquel *et al.* 2014).

Ressaltamos que a ausência de correlação negativa entre a população de *F. prausnitzii* e o número de UFCs de SH não indica que o microrganismo estudado não exerça efeitos protetores contra a colonização e, até mesmo, na eliminação da SH do trato intestinal. Deve ser levado em consideração os vários atributos de virulência observados na seleção da cepa estudada e a magnitude do desafio experimental, no presente estudo trabalhamos com um desafio de SH considerado alto, quando comparado com as condições habituais de criações comerciais. Isto é, em condições de campo, com desafios mais brandos, talvez fosse possível encontrar uma correlação entre a quantidade de *F. prausnitzii* e o número de UFCs de SH, haja visto que este microrganismo é considerado um dos maiores produtores de ácido butírico, o qual é capaz reduzir o crescimento e a invasão de SH, no TGI.

É reconhecido que alguns fatores (ambiente, tipo de desafio, stress, imunidade) possam influenciar na persistência da excreção de *Salmonella* ao longo do ciclo de vida da ave, o que pode contribuir para o sucesso ou a falha no uso dos aditivos na alimentação, neste trabalho no 30º dia de vida, 20 dias após o segundo desafio, observa-se redução e na persistência da excreção fecal de SH nos grupos experimentais e comparando com o grupo controle positivo. Aos 34 dias, exceto nos animais que receberam EC, observa-se redução da excreção fecal em todos os grupos experimentais, fato que, provavelmente, se deva a resposta imunológica e avanço na idade das aves. Segundo Gast (2013) a infecção por sorovares paratíficos pode persistir na mucosa intestinal aviária por meses, essa persistência, quando por SH pode levar ao desequilíbrio da microbiota intestinal, causando danos à saúde e ao desempenho da ave, além de contaminar alimentos (Sadeyen *et al.* 2006; Borsoi *et al.* 2009).

AOs, probióticos e produtos de EC também são reconhecidos por apresentarem efeitos positivos sobre a morfologia do epitélio intestinal de aves. Aos sete dias de vida a administração de AOs influenciou de forma positiva a altura das vilosidades do jejuno, o que desperta pouca atenção, pois em particular o ácido butírico já é bem reconhecido por atuar no desenvolvimento trófico do TGI (Leeson *et al.* 2005; Panda *et al.* 2009; Sinkadar *et al.* 2017). Nos outros momentos avaliados não foram observadas alterações morfológicas significativas decorrentes da infecção ou do uso dos aditivos. Em frangos, Borsoi *et al.* (2010) descrevem que o

desafio por SH pode impactar na estrutura da mucosa e reduzir a altura de vilosidades intestinais.

Conclusão

A administração contínua de AOs, probiótico e produto de EC, via ração, foi eficaz no controle da infecção e na redução da eliminação fecal de SH. No entanto, o uso de AOs foi mais eficaz para modular a população do microrganismo *F. prausnitzii* na microbiota cecal, sugerindo um proeminente papel no uso desses compostos para aumentar a abundância desta bactéria na microbiota cecal de perus.

Comprovamos que sob as condições experimentais a composição da dieta pode modular a população de uma bactéria benéfica com efeito butirogênico.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio e suporte para financiamento do projeto de pesquisa (Número do processo: 2015/18350-3) e pela concessão da bolsa de mestrado para o primeiro autor (Número do processo: 2015/16428-5).

Tabela 1 – Colonização do inglvio e ceco por *Salmonella* Heidelberg em perus de corte desafiados no terceiro e no décimo dia de vida com 0,5 mL de 10^7 UFC de SH/mL, e 0,5 mL de 10^5 UFC de SH/mL respectivamente.

Tratamento**	Inglúvio – UFClog ₁₀ /g±EPM*		
	Idade (dias)		
	7	19	35
CP	3,6±0,31	1,6±0,01 ^a	1,1±0,02 ^a
EC	3,1±0,12	1,8±0,21 ^a	0,2±0,01 ^b
AOs	3,3±0,41	1,7±0,07 ^a	0,8±0,03 ^a
Probiótico	3,0±0,12	0,7±0,33 ^b	0,9±0,21 ^a

	Ceco – UFClog ₁₀ /g±EPM*		
	Idade (dias)		
	7	19	35
CP	7,6±0,81	4,9±0,65 ^a	1,7±0,04
EC	7,5±0,77	3,8±0,55 ^b	1,5±0,01
AOs	7,5±0,98	3,9±0,48 ^b	1,7±0,67
Probiótico	7,6±0,34	3,5±0,22 ^b	1,3±0,05

^{a,b} letras diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey (P<0.05). * EPM Erro Padrão Médio **CP – Controle Positivo: Dieta sem aditivo promotor de crescimento; EC – Produto de Exclusão Competitiva: Dieta acrescida de produto de EC (10^6 UFC/kg de ração); AOs – Ácidos Orgânicos: Dieta acrescida de ácidos orgânicos (0-22 dias: 0,5g de butirato de sódio + 1g de ácido caprílico/kg de ração; 22-35 dias: 1g de butirato de sódio + 2g de ácido caprílico/kg de ração; **Probiótico** –: Dieta acrescida de probiótico (10^6 UFC/kg de ração).

Tabela 2. Incidência (isolamento) de *Salmonella* Heidelberg no ingluvío e no ceco de perus de corte desafiados no terceiro e no décimo dia de vida com 0,5 mL de 10^7 UFC de SH/mL, e 0,5 mL de 10^5 UFC de SH/mL respectivamente.

Inglúvio - <i>Salmonella</i>-positivo/total (%)			
Tratamento**	Idade (dias)		
	7	19	35
CP	10/10(100%)	6/10(60%) ^a	5/10(50%) ^a
EC	10/10(100%)	5/10(50%) ^a	1/10(10%) ^b
AOs	10/10(100%)	7/10(70%) ^a	4/10(40%) ^a
Probiótico	10/10(100%)	2/10(20%) ^b	4/10(40%) ^a
P-value	0,798	0,038	0,045
Ceco – <i>Salmonella</i>-positivo/total (%)			
	Idade (dias)		
	7	19	35
CP	10/10(100%)	10/10(100%)	7/10(70%)
EC	10/10(100%)	10/10(100%)	7/10(70%)
AOs	10/10(100%)	10/10(100%)	6/10(60%)
Probiótico	10/10(100%)	10/10(100%)	5/10(50%)
P-value	-	-	0,999

^{a,b} letras diferentes na coluna diferem entre si. ****CP** – Controle Positivo: Dieta sem aditivo promotor de crescimento; **EC** – Produto de Exclusão Competitiva: Dieta acrescida de produto de EC (10^6 UFC/kg de ração); **AOs** – Ácidos Orgânicos: Dieta acrescida de ácidos orgânicos (0-22 dias: 0,5g de butirato de sódio + 1g de ácido caprílico/kg de ração; 22-35 dias: 1g de butirato de sódio + 2g de ácido caprílico/kg de ração; **Probiótico** – Dieta acrescida de probiótico (10^6 UFC/kg de ração).

Tabela 3. Incidência de excreção fecal de *Salmonella* Heidelberg durante o período experimental (0-35 dias) em perus de corte desafiados no terceiro e no décimo dia de vida.

Idade (dias)/ Suabe cloacal - <i>Salmonella</i> -positivo/total (%)									
Tratamento**	3	7	11	15	19	23	26	30	34
CP	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	1/4
	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%) ^b	(100%) ^b	(25%)
EC	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	3/4
	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%) ^b	(75%) ^a	(75%)
AOs	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	2/4	2/4	1/4
	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(50%) ^a	(50%) ^a	(25%)
Probiótico	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	4/4	4/4	3/4	1/4
	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(75%)	(100%)	(100%) ^b	(75%) ^a	(25%)

****Controle Positivo:** Dieta sem aditivo promotor de crescimento; **Produto de EC:** Dieta acrescida de produto de EC (10⁶UFC/kg de ração); **Ácidos Orgânicos:** Dieta acrescida de ácidos orgânicos (0-22 dias: 0,5g de butirato de sódio + 1g de ácido caprílico/kg de ração; 22-35 dias: 1g de butirato de sódio + 2g de ácido caprílico/kg de ração); **Probiótico:** Dieta acrescida de probiótico (10⁶UFC/kg de ração). Todas as aves receberam duas doses de desafio de *Salmonella* Heidelberg

Tabela 4. Efeito de diferentes aditivos na morfologia intestinal de perus de corte desafiados no terceiro e no décimo dia de vida com *Salmonella* Heidelberg.

Tratamento**	Altura dos vilos e profundidade de cripta (μm) [*] - 7 dias de vida							
	Duodeno		Jejuno		Íleo		Ceco	
	Vilo	Cripta	Vilo	Cripta	Vilo	Cripta	Vilo	Cripta
AOs	1301 $\pm$ 16,46	80,1 $\pm$ 0,58	802,5 $\pm$ 6,84 ^a	58,9 $\pm$ 0,66	424,5 $\pm$ 3,96	55 $\pm$ 0,60	162,4 $\pm$ 1,70	44,5 $\pm$ 0,54
EC	1276 $\pm$ 7,74	84,9 $\pm$ 0,76	750,1 $\pm$ 7,72 ^{ab}	57,2 $\pm$ 0,57	431,9 $\pm$ 3,32	50,1 $\pm$ 0,52	161 $\pm$ 1,79	44,5 $\pm$ 0,54
Probiótico	1282,5 $\pm$ 9,35	86,9 $\pm$ 0,73	754,9 $\pm$ 7,25 ^{ab}	56,4 $\pm$ 0,61	413,5 $\pm$ 3,81	49 $\pm$ 0,65	157,3 $\pm$ 1,78	44,1 $\pm$ 0,43
CP	1295,9 $\pm$ 9,68	82,6 $\pm$ 0,95	696,1 $\pm$ 6,34 ^b	56,7 $\pm$ 0,58	411,6 $\pm$ 3,63	49 $\pm$ 0,48	153 $\pm$ 1,74	40,2 $\pm$ 0,53
CN	1352 $\pm$ 13,71	84,5 $\pm$ 0,80	735 $\pm$ 5,64 ^{ab}	54 $\pm$ 0,68	439 $\pm$ 2,34	50 $\pm$ 0,56	164 $\pm$ 2,41	44 $\pm$ 0,71
	Altura dos vilos e profundidade de cripta (μm) [*] - 19 dias de vida							
	Vilo	Cripta	Vilo	Cripta	Vilo	Cripta	Vilo	Cripta
AOs	1684 $\pm$ 12,41	97 $\pm$ 0,76	947 $\pm$ 11	70 $\pm$ 0,86	547 $\pm$ 4,61	56 $\pm$ 0,53	190 $\pm$ 2,66	49 $\pm$ 0,67
EC	1716 $\pm$ 9,37	89 $\pm$ 0,67	923 $\pm$ 8,08	66 $\pm$ 0,57	545 $\pm$ 5,65	58 $\pm$ 0,58	190 $\pm$ 1,58	49 $\pm$ 0,55
Probiótico	1681 $\pm$ 11,06	91 $\pm$ 0,62	874 $\pm$ 8,77	71 $\pm$ 0,64	550 $\pm$ 5,94	58 $\pm$ 0,58	191 $\pm$ 2,2	52 $\pm$ 0,56
CP	1619 $\pm$ 12,72	88 $\pm$ 0,66	816 $\pm$ 7,36	61 $\pm$ 0,48	514 $\pm$ 3,75	56 $\pm$ 2,39	184 $\pm$ 2,34	49 $\pm$ 0,56
CN	1755 $\pm$ 9,67	88 $\pm$ 0,70	889 $\pm$ 10,5	67 $\pm$ 0,81	558 $\pm$ 7,61	55 $\pm$ 0,68	206 $\pm$ 2,44	55 $\pm$ 0,61
	Altura dos vilos e profundidade de cripta (μm) [*] - 35 dias de vida							
	Vilo	Cripta	Vilo	Cripta	Vilo	Cripta	Vilo	Cripta
AOs	1973 $\pm$ 11,74	108 $\pm$ 0,84	1122 $\pm$ 17,64	84 $\pm$ 0,94	738 $\pm$ 8,66	72 $\pm$ 0,88	223 $\pm$ 3,15	54 $\pm$ 0,65
EC	1955 $\pm$ 10,57	104 $\pm$ 1,08	1050 $\pm$ 14,69	85 $\pm$ 1,00	760 $\pm$ 8,66	72 $\pm$ 1,19	220 $\pm$ 3,25	57 $\pm$ 0,62
Probiótico	1978 $\pm$ 18,61	99,9 $\pm$ 1,04	1045 $\pm$ 13,42	83 $\pm$ 1,20	729 $\pm$ 7,86	71 $\pm$ 0,97	245 $\pm$ 4,62	61,5 $\pm$ 1,15
CP	1919 $\pm$ 19,71	99,9 $\pm$ 0,95	1097 $\pm$ 12,21	89 $\pm$ 1,07	711 $\pm$ 8,62	68 $\pm$ 0,77	216 $\pm$ 2,03	55 $\pm$ 0,66
CN	1920 $\pm$ 22,36	102 $\pm$ 0,93	1058 $\pm$ 12,9	81 $\pm$ 1,04	724 $\pm$ 6,77	69 $\pm$ 0,88	218 $\pm$ 3,07	57 $\pm$ 0,78

^{ab} letras diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey (P<0.05). *Média $\pm$ EPM: Erro Padrão Médio (Mensuração de 15 vilos por segmento – média de 10 aves por tratamento). ****AOs** – Ácidos Orgânicos: dieta acrescida de ácidos orgânicos (0-22 dias: 0,5g de butirato de sódio + 1g de ácido caprílico/kg de ração; 22-35 dias: 1g de butirato de sódio + 2g de ácido caprílico/kg de ração); **EC** – Produto de Exclusão Competitiva: dieta acrescida de produto de EC (10⁶UFC/kg de ração); **Probiótico**: dieta acrescida de probiótico (10⁶UFC/kg de ração); **CP** – Controle Positivo: dieta sem aditivo promotor de crescimento; **CN** - Controle Negativo: dieta sem aditivo promotor de crescimento.

Tabela 5. Quantidade relativa de *Faecalibacterium prausnitzii* no conteúdo cecal de perus de corte desafiados no terceiro e no décimo dia de vida com *Salmonella* Heidelberg e submetidos ao tratamento com diferentes aditivos.

<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>			
Idade (dias)			
Tratamento**	7	19	35
CP	0,0003±0,00001	0,0014±0,00012 ^{cB}	0,3056±0,033 ^{bC}
AOs	0,0001±0,00001	0,4985±0,31 ^{aB}	0,6305±0,023 ^{aC}
EC	0,0005±0,00002	0,0293±0,0022 ^{cB}	0,2319±0,021 ^{bC}
Probiótico	0,0003±0,00001	0,1058±0,011 ^{bB}	0,0816±0,002 ^{cB}

^{ab} letras diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey (P<0.05). * EPM Erro Padrão Médio ****CP** – Controle Positivo: Dieta sem aditivo promotor de crescimento; **EC** – Produto de Exclusão Competitiva: Dieta acrescida de produto de EC (106UFC/kg de ração); **AOs** – Ácidos Orgânicos: Dieta acrescida de ácidos orgânicos (0-22 dias: 0,5g de butirato de sódio + 1g de ácido caprílico/kg de ração; 22-35 dias: 1g de butirato de sódio + 2g de ácido caprílico/kg de ração; **Probiótico** – Probiótico: Dieta acrescida de probiótico (10⁶UFC/kg de ração).

REFERÊNCIAS

Altarugio, R., Vellano, I.H.B., Moraes, A.C.I., Milbradt, E.L., Andreatti Filho, R.L., Guimarães-Okamoto, P.T. C. and Okamoto, A. S. (2017) *In vitro* probiotic selection and characterization of *Lactobacillus* spp. isolated from healthy domesticated Turkeys. *J Appl Poult Res*.

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

AVIAGEN Turkeys. (2017a) Feeding Guidelines for Nicholas and B.U.T. Heavy Lines. Available at: <http://www.aviagenturkeys.com/uploads/2015/11/20/NU06%20Feeding%20Guidelines%20for%20Nicholas%20&%20BUT%20Heavy%20Lines%20EN.pdf> (Accessed on September 18, 2017).

AVIAGEN Turkeys. (2017b) Breeder Management Guidelines. Available at: <http://www.aviagenturkeys.us/performance-objectives> (Accessed on September 18, 2017).

Barnes, E.M. (1972) The avian intestinal flora with particular reference to the possible ecological significance of the cecal anaerobic bacteria. *Am J Clin Nutr* **25**, 1475-1479.

Behravesh, C.B., Brinson, D., Hopkins, B.A. and Gomez, T.M. (2014) Backyard poultry flocks and salmonellosis: a recurring, yet preventable public health challenge. *Clin Infect Dis* **58**, 1432–1438.

Berk, P.A., de Jonge, R., Zwietering, M.H., Abee, T., Kieboom, J (2005) Acid resistance variability among isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *J Appl Microbiol* **99**, 859-866.

Bjerrum, L., Engberg, R.M., Leser, T.D., Jensen, B.B., Finster, K. and Pedersen, K. (2006) Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. *Poult Sci* **85**, 1151–1164.

Borsoi, A., Santin, E., Santos, L.R., Salle, C.T.P., Moraes, H.L.S. and Nascimento, V.P. (2009) Inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance, and pulsed field gel electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation. *Poult Sci* **88**, 750-758.

BRASIL. (1995) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº126, de 03 de novembro de 1995. Normas de credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico das Salmoneloses Aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium*). Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

BRASIL. (2003) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria da Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Burt, C.R., Proudfoot, J.C., Roberts, M. and Horowitz, R.H. (1990) Fatal myocarditis secondary to *Salmonella* septicemia in a young adult. *J Emerg Med* **8**, 295–297.

CDC. (2011) Multistate outbreak of human *Salmonella* Heidelberg infections linked to ground turkey (Final Update). Available at: <https://www.cdc.gov/salmonella/2011/ground-turkey-11-10-2011.html> (Accessed on September 5, 2017).

CDC. (2016) National enteric disease surveillance: *Salmonella* Annual Report, 2013. Available at: <https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/salmonella-annual-report-2013-508c.pdf> (Accessed on September 5, 2017).

Danzeisen, J.L., Calvert, A.J., Noll, S.L., McComb, B., Sherwood, J.S., Logue, C.M. and Johnson, T.J. (2013) Succession of the turkey gastrointestinal bacterial microbiome related to weight gain. *PeerJ* **1**, e237.

Duncan, S.H., Hold, G.L., Harmsen, H.J.M., Stewart, C.S. and Flint, H.J. (2002) Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and

a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 2141-2146.

Durant, J.A., Corrier, D.E., Byrd, J.A., Stanker, L.H. and Ricke, S.C. (1999) Feed deprivation affects crop environment and modulates *Salmonella enteritidis* colonization and invasion of Leghorn hens. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1919–1923.

Dyce, K.M., Sack, W.O. and Wensing, C.J.G. (1996) Anatomia das aves. In *Tratado de Anatomia Veterinária*, 2nd ed. Dyce, K.M., Wensing, C.J.G. and Sack, W.O. pp. 631-650. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

EFSA (European Food Safety Authority). (2015) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J* **13**, 3991.

Evans, N.P., Collins, D.A., Pierson, F.W., Mahsoub, H.M., Sriranganathan, N., Persia, M.E., Karnezos, T.P., Sims, M.D. and Dalloul, R. A. (2017) Investigation of medium chain fatty acid feed supplementation for reducing *Salmonella* Typhimurium colonization in turkey poults *Foodborne Pathog Dis* **14**, 2017.

Fernández-Rubio, C., Ordóñez, C., Abad-González, J., Garcia-Gallego, A., Honrubia, M.P., Mallo, J.J. and Balanã-Fouce, R. (2009) Butyric acid-based feed additives help protect broiler chickens from *Salmonella* Enteritidis infection. *Poult Sci* **88**, 943–948

Foley, S.L., Nayak, R., Hanning, I.B., Johnson, T.J., Han, J. and Ricke, S.C. (2011) Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. *Appl Environ Microbiol* **77**, 4273-4279.

Forkus, B., Ritter, S., Vlysidis, M., Geldart, K. and Kaznessis, Y.N. (2017) Antimicrobial probiotics reduce *Salmonella enterica* in turkey gastrointestinal tracts. *Sci Rep* **7**, 40695.

Fuller, R. (1977) The importance of Lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. *Br Poult Sci* **1**, 85-94.

Gabriel, I., Lessire, M., Mallet, S. and Guillot, J.F. (2006) Microflora of the digestive tract: Critical factors and consequences for poultry. *World's Poult Sci J* **62**, 499–511.

Gast, R.K. (2013) *Salmonella* infections. In *Diseases of poultry*. 13th ed. Swayne, D. E., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Suarez, D.L. and Nair, V. pp. 677-736. Ames Iowa: Wiley-Blackwell.

Gieraltowski, L., Higa, J., Peralta, V., Green, A., Schwensohn, C., Rosen, H., Libby, T., Kissler, B., Marsden-Haug, N., Booth, H., Kimura, A., Grass, J., Bicknese, A., Tolar, B.; Defibaugh-Cháves, S., Williams, I., Wise, M. (2016) National outbreak of multidrug resistant *Salmonella* Heidelberg infections linked to a single poultry company. *PLoS ONE* **11**, e016236.

Gong, J., Si, W., Forster, R.J., Huang, R., Yul, H., Yin, Y., Yang, C. and Han, Y. (2007) 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. *FEMS Microbiol Ecol* **59**, 147–157.

Guilloteau, P., Martin, L., Eeckhaut, V., Ducatelle, R., Zabielski, R. and Van Immerseel, F. (2010) From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutr Res Rev* **23**, 366–384.

Hofacre, C.L., Primm, N.D., Vance, K., Goodwin, M.A. and Brown, J. (2000) Comparison of a lyophilized chicken-origin competitive exclusion culture, a lyophilized probiotic, and fresh turkey cecal material against *Salmonella* colonization. *J Appl Poult Res* **9**, 195–203.

Hofer, E., Silva Filho, S.J. and Reis, E.M.F. (1997) Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves do Brasil. *Pesq Vet Bras* **17**, 55-62.

Impey, C.S., Mead, G.C. and George, S.M. (1984) Evaluation of treatment with defined and undefined mixture of gut microorganisms for preventing *Salmonella* colonization in chicks and turkey poults. *Food Microbiol* **1**, 143-147.

Kollanoor-Johny, A., Mattson, T., Baskaran, S.A., Amarlaradjou, M.A.R., Hoagland, T.A., Darre, M.J., Khan, M.I., Schreiber, D.T., Donoghue, A.M., Donoghue, D.J. and Venkitanarayanan, K. (2012) Caprylic acid reduces *Salmonella* Enteritidis populations in various segments of digestive tract and internal organs of 3- and 6-week-old broiler chickens, therapeutically^{1,2}. *Poult Sci* **91**, 1686–1694.

La Ragione, E. and Mead, G. (2013) Competitive exclusion. In *Salmonella in domestic animals*, 2nd ed Barrow, P.A. and Methner, U. pp.426-454. (Eds). Wallingford: CABI Publishing.

Leeson, S., Namkung, H., Antongiovanni, M. and Lee EH. (2005) Effect of butyric acid on the performance and carcass yield of broiler chickens. *Poult Sci* **84**, 1418–1422.

Lopez-Siles, M., Duncan, S. H., Garcia-Gil, L. J., and Martinez-Medina, M. (2017) *Faecalibacterium prausnitzii*: from microbiology to diagnostics and prognostics. *ISME J.* **11**, 841–852.

Lund, M., Bjerrum, L. and Pedersen, K. (2010) Quantification of *Faecalibacterium prausnitzii*- and *Subdoligranulum variabile*-like bacteria in the cecum of chickens by real-time PCR. *Poult Sci* **89**, 1217–1224.

Majowicz, S., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., Jones, T.F., Fazil, A. and Hoekstra, R.M. (2010) The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis* **50**, 882–889.

Mallinson, E.T., Snoeyenbos, G.H. (1989) Salmonellosis. In *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*, 3rd edn ed. Purchase, H.G. et al. pp. 3–11. Pennsylvania: American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania.

Menconi, A., Wolfenden, A.D., Shivaramaiah, S., Terraes, J.C., Urbano, T., Kuttel, J., Kremer, C., Hargis, B.M. and Tellez, G. (2011) Effect of lactic acid bacteria probiotic culture for the treatment of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in neonatal broiler chickens and turkey poults. *Poult Sci* **90**, 561-565.

Milbradt, E.L., Zamae, J.R., Araújo Júnior, J.P., Mazza, P., Padovani, C.R., Carvalho, V.R., Sanfelice, C., Rodrigues, D.M., Okamoto, A.S. and Andreatti Filho, R.L. (2014a) Control of *Salmonella* Enteritidis in turkeys using organic acids and competitive exclusion product. *J Appl Microbiol* **117**, 554–563.

Milbradt, E.L., Okamoto, A.S., Garcia, E.A., Sanfelice, C., Centenaro, L.P. and Andreatti Filho, R.L. (2014b) Use of organic acids and competitive exclusion product as an alternative to antibiotic as a growth promoter in the raising of commercial turkeys. *Poult Sci* **93**, 855–1861.

Miquel, S., Martín, R., Bridonneau, C., Robert, V., Sokol, H., Bermúdez-Humarán, L.G., Thomas, M. and Langella, P. (2014) Ecology and metabolism of the beneficial intestinal commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii*. *Gut Microbes* **5**, 146-151.

Meimandipour, A., Hair-Bejo, M., Shuhaimi, M., Azhar, K., Soleimani, A.F., Rasti, B. and Yazid, A.M. (2010) Gastrointestinal tract morphological alteration by unpleasant physical treatment and modulating role of *Lactobacillus* in broilers. *Br Poult Sci* **51**, 52-59.

Muniz, E.C., Verdi, R., Leão, J.A., Back, A. and do Nascimento, V.P. D. (2017). Evaluation of the effectiveness and safety of a genetically modified live vaccine in broilers challenged with *Salmonella* Heidelberg. *Avian Pathol*, 1-7.

Nurmi, E. and Rantala, M. (1973) New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature* **241**, 210-211.

Oakley, B.B., Lillehoj, H.S., Kogut, M.H., Kim, W.K., Maurer, J.J., Pedroso, A., Lee, M.D., Collet, S.R., Johnson, T.J. and Cox, N.A. (2014) The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiol Lett* **360**, 100-112.

Onrust, L., Ducatelle, R., Van Driessche, K., De Maesschalck, C., Vermeulen, K., Haesebrouck, F., Eeckhaut, V. and Van Immerseel, F. (2015) Steering endogenous butyrate production in the intestinal tract of broilers as a tool to improve gut health. *Front Vet Sci* **2**, 75.

Panda, A.K., Rama Rao, S.V., Raju, M.V.L.N. and Shyam, G.S. (2009) Effect of butyric acid on performance, gastrointestinal tract health and carcass characteristics in broiler chickens. *Asian-Aust J Anim Sci* **22**, 1026–1031.

Pulido-Landínez, M., Sánchez-Ingunza, R., Guard, J. and do Nascimento, V.P. (2013) Assignment of serotype to *Salmonella enterica* isolates obtained from poultry and their environment in southern Brazil. *Lett Appl Microbiol* **57**, 288-294.

Rada, V. and Marounek, M. (1996) Effect of monensin on crop microflora of broiler chickens. *Ann Zootech* **45**, 283-288.

Van Immerseel, F., Boyen, F., Gantois, I., Timbermont, L., Bohez, L., Pasmans, F., Haesebrouck, F. and Ducatelle, R. (2005) Supplementation of coated butyric acid

in the feed reduces colonization and shedding of *Salmonella* in poultry. *Poult Sci* **84**, 1851-1856.

Van Immerseel, F., Russell, J. B., Flythe, M.D., Gantois, I., Timbermont, L., Pasmans, F., Haesebrouck, F. and Ducatelle, R (2006). The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathol* **35**, 182–188.

Vicente, J., Higgins, S., Bielke, L., Tellez, G., Donoghue, D., Donoghue, A., Hargis, B. (2007) Effect of probiotic culture candidates on *Salmonella* prevalence in commercial turkey houses. *J of Appl Poult Res* **16**, 471–476.

Voss-Rech, D., Vaz, C.S.L., Alves, L., Coldebella, A., Leão, J.A., Rodrigues, D.P. and Back, A. (2015) A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. *Poult Sci* **94**, 433-441.

Vugia, D.J., Samuel, M., Farley, M.M., Marcus, R., Shiferaw, B., Shallow, S., Smith, K. and Angulo, F.J. (2004) Invasive *Salmonella* infections in the United States, Food-Net, 1996-1999: incidence, serotype distribution, and outcome. *Clin Infect Dis* **38**, S149–S156.

Xiao, Y., Xiang, Y., Zhou, W., Chen, J., Li, K. and Yang, H. (2016) Microbial community mapping in intestinal tract of broiler chicken. *Poult Sci* **96**, 1387-1393.

Rinttilä, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogus, L. and Palva, A. (2004) Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol* **97**, 1166–1177.

Sadeyen, J.R., Trotereau, J., Protais, J., Beaumont, C., Sellier, N., Salvat, G., Velge, P. and Lalmanach, A.C. (2006) *Salmonella* carrier-state in hens: study of host resistance by a gene expression approach. *Microbes Infect* **8**, 1308-1314.

Solis de los Santos, F, Donoghue, A.M., Venkitanarayanan, K., Dirain, M.L., Reyes-Herrera, I., Blore, P.J. and Donoghue, D.J. (2008) Caprylic acid supplemented in feed reduces enteric *Campylobacter jejuni* colonization in ten-day-old broiler chickens. *Poult Sci* **87**, 800–804.

Song, B., Li, H., Wu, Y., Zhen, W., Wang, Z., Xia, Z. and Guo, Y. (2017) Effect of microencapsulated sodium butyrate dietary supplementation on growth performance and intestinal barrier function of broiler chickens infected with necrotic enteritis. *Anim Feed Sci Technol* **232**, 6-15.

Sikandar, A., Zaneb, H., Younus, M., Khattak, F., Masood, S., Aslam, A., Ashraf, S., Rehman, H. and Yousaf, M.S. (2017) Effect of sodium butyrate on performance, immune status, microarchitecture of small intestinal mucosa and lymphoid organs in broiler chickens. *Asian-Australas J Anim Sci* **30**, 690-699.

Thompson, J.L. and Hinton, M. (1997) Antibacterial activity of formic and propionic acids in the diet of hens on *Salmonella* s in the crop. *Br Poult Sci* **38**, 59–65.

(USAHA). (2015) Report of the committee on *Salmonella*: United States Animal Health Association. Available at: <http://www.usaha.org/Portals/6/Reports/2015/report-sal-2015.pdf> (Accessed on September 5, 2017).

Voss-Rech, D., Trevisol, I.M., Brentano, L., Silva, V.S., Rebelatto, R., Jaenisch, F. R.F., Okino, C.H., Moraes, M.A.Z., Coldebella, A., Boltton, S.A. and Vaz, C.S.L. (2017) Impact of treatments for recycled broiler litter on the viability and infectivity of microorganisms. *Vet Microbiol* **203**, 308-314.

Zar, J.H. (2010) *Bioestatistical analysis*. Sed, NJ: Prentice-Hall.

Wei, S., Lilburn, M. and Yu, Z. (2016) The bacteriomes of ileal mucosa and cecal content of broiler chickens and turkeys as revealed by metagenomic analysis. *Int J of Microbiol* **2016**.

Wilkinson, T.J., Cowan, A.A., Vallin, H.E., Onime, L.A., Oyama, L.B., Cameron, S.J., Gonot, C., Moorby, J.M., Waddams, K., Theobald, V.J., Leemans, D., Bowra, S., Nixey, C. and Huws, S.A. (2017) Characterization of the microbiome along the gastrointestinal tract of growing turkeys. *Front Microbiol* **8**, 1089.

Wise, M.G. and Siragusa, G.R. (2007) Quantitative analysis of the intestinal bacterial community of one- to three-weekold commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic-free vegetable-based diets. *J Appl Microbiol* **102**, 1138–1149.

Wolfenden, R.E., Pumford, N.R., Morgan, M.J., Shivaramaiah, S., Wolfenden, A.D., Pixley, C.M., Green, J., Tellez, G. and Hargis, B.M. (2011) Evaluation of selected direct-fed microbial candidates on live performance and *Salmonella* reduction in commercial turkey brooding houses. *Poult Sci* **90**, 2627–2631.

Yeoman, C.J., Chia, N., Jeraldo, P., Sipos, M., Goldenfeld, N.D. and White, B.A. (2012) The microbiome of the chicken gastrointestinal tract. *Anim Health Res Rev* **13**, 89–99.

ANEXO

Author Guidelines

Journal of Applied Microbiology publishes high quality research and review papers on novel aspects of applied microbiology, including environmental, food, agricultural, medical, pharmaceutical, veterinary, soil, systematics, water and biodeterioration. Papers reporting work on all microorganisms, including viruses, are welcomed providing they demonstrate new findings of significance to the field as a whole.

In 2009, *Journal of Applied Microbiology* updated its Aims and Scope and will now publish only the top 25% of research.

ARTICLE TYPES

Original Articles

Original Articles comprise most of the Journal and should have as their aim the development of concepts as well as the recording of facts. The manuscript should be prepared for a wide readership and as far as possible should present novel results of a substantial programme of research.

Review Articles

Review Articles will present a substantial survey with an adequate historical perspective of the literature on some facet of applied microbiology. We would prefer to see a distillation of early and present work within the field to show progress and explain the present interest and relevance. The manuscript should not be simply a review of past work or be concentrated largely on unpublished results.

EDITORIAL PROCESS

New manuscripts sent to the Journal will be handled first by the Editorial Office who checks compliance with the guidelines to authors. The manuscript is assigned to a handling Editor by the Chief Editor, and goes through a rapid screening process at which stage a decision to reject or to go to full review is made. This step ensures a rapid rejection of unsuitable manuscripts for the journal. Manuscripts that go to full review are assigned a minimum of two reviewers. Following the return of two reports, the handling Editor provides a report to the Chief Editor, who takes the decision to accept, revise or reject the manuscript. Revised manuscripts are directly handled by the Chief Editor who decides whether or not the manuscript should go back to the handling Editor for additional comments from the reviewers. Following the return of a report from the handling Editor and reviewers, the Chief Editor makes the decision to accept, further revise or reject the manuscript.

Authors may be advised that short papers not exceeding four published pages would be better placed in *Letters in Applied Microbiology*. Sequential publication of numbered papers will not be permitted.

EDITORIAL POLICY

To ensure responsible publication practices, this Journal adheres to Wiley Blackwell's [publication ethics policies](#), which include guidelines on handling suspected publication misconduct and complaints about the Journal. This Journal is a member of, and subscribes to the principles of, the [Committee on Publication Ethics](#).

Authorship

Qualification for authorship should comprise (1) substantial contribution to conception and design or the acquisition and analysis of data, (2) drafting or critically revising the manuscript, and (3) approval of the final submitted version. All authors must satisfy all three criteria, and all those who do satisfy this criteria must be included in the list of authors when the paper is submitted to the Journal. By submission of a manuscript to the Journal, all authors warrant that they have the authority to publish the material and that the paper, or one substantially the same, has neither been published previously, nor is being considered for publication elsewhere. Submissions may be subject to testing for textual similarity to other published works via the CrossCheck software employed by the Journal.

Conflict of interest disclosure

Journal of Applied Microbiology requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the cover letter to the Chief Editor, in the manuscript (in the Conflict of Interest section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

Ethics of experimentation

The Journal will only accept manuscripts in which there is evidence of the ethical use of animals or harmful substances. The care and use of experimental animals must comply with all relevant local animal welfare laws, guidelines and policies, and a statement of such compliance should be provided upon submission. Where possible, alternative procedures that replace the use of animals, either partially or completely, for example *in vitro* biological systems, should be used. Where this is not possible, the minimum number of animals should be used and pain and suffering reduced, consistent with attaining the scientific objectives of the study. All reasonable steps must be taken to ensure the humane treatment of animals, so as to minimize discomfort, distress and pain. Animals in pain or moribund should be painlessly killed according to local euthanasia regulations. The Journal encourages corresponding authors of manuscripts involving animal research to refer to the [ARRIVE guidelines](#) before submission of a manuscript.

Potential threat to security

The Journal expects that all authors will conform to the [National Science Advisory Board for Biosecurity \(NSABB\)](#) guidelines for Dual Use Life Sciences Research. Where a reviewer is concerned that an article might include information that could be a threat to security then the Editor will treat the article as possible DURC (dual use research of concern) and may consult a specialist reviewer. Their advice will be taken into account by the Editor in making any final decision on publication.

Biosecurity

The Journal asks authors of papers related to [Schedule 5 biological agents](#) to inform the Editor at the time of manuscript submission if their study has the potential for both benevolent and malevolent

application. This is often referred to as “dual use research of concern”. The [National Science Advisory Board for Biosecurity \(NSABB\)](#) guidelines state that a “dual use research of concern” can arise in relation to “research that, based on current understanding, can be reasonably anticipated to provide knowledge, products, or technologies that could be directly misapplied by others to pose a threat to public health and safety, agricultural crops and other plants, animals, the environment, or material”.

Antibiotic antimicrobial testing and microbial resistance

A number of methods like disc diffusion, Etest, agar dilution, broth microdilution and broth macrodilution, are suitable for *in vitro* antimicrobial susceptibility testing. However, the test used must be performed in accordance with an internationally accepted procedure; for example tests published by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC), the Deutsches Institut für Normung e.V. (DIN) and the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Further guidance and interpretation of MIC 50 and MIC 90 values as well as guidance for the interpretation of multiresistance can be found in Schwarz *et al.* J. Antimicrobial Chemother 2010; 65: 601-604.

Data availability

Data that is integral to the paper must be made available in such a way as to enable readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in the paper. Any restriction on the availability of this data must be disclosed at the time of submission. Data may be included as part of the main article where practical. We recommend that data for which public repositories are widely used, and are accessible to all, should be deposited in such a repository prior to publication. The appropriate linking details and identifier(s) should then be included in the publication and where possible the repository, to facilitate linking between the journal article and the data. If such a repository does not exist, data should be included as supporting information to the published paper or authors should agree to make their data available upon reasonable request.

- Nucleotide sequence data should be deposited in the EMBL/GenBank/DDBJ Nucleotide Sequence Data Libraries and the accession number referenced in the manuscript text, e.g. “E. coli (GenBank accession no. EUXXXXXX.X)”. Sequence data should only be included if they are new (unpublished), complete (no unidentified nucleotides included) and if the sequence information itself provides important new biological insights of direct relevance to the question addressed in the manuscript. Generally sequences should not be submitted if the same gene has been reported in another species unless a comparison with related sequences contributes important new information.
- Presentation of nucleotide sequences should include clear indications of nucleotide numbers and points of interest, e.g. promoter sequences, ribosome binding sites, mutations, insertions, probe sequences, etc. In the case of comparisons, nucleotides which differ between the sequences should be readily visible to the reader, e.g. by the use of bold face, shading, boxing or by the use of a dash to represent identical nucleotides. The font size used in the manuscript should facilitate appropriate reduction of the figure.

Copyright Transfer Agreement

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below: CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

OnlineOpen

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Referrals to the Open Access Journal *MicrobiologyOpen* and *Food Science & Nutrition*

This journal works together with two of Wiley's open access journals, *MicrobiologyOpen* and *Food Science & Nutrition* to enable rapid publication of good quality research that is unable to be accepted for publication by our journal. Authors may be offered the option of having the paper, along with any related peer reviews, automatically transferred for consideration by one of these two journals. *MicrobiologyOpen* and *Food Science & Nutrition* are Wiley open access journals and article publication fees apply. For more information, please go to www.microbiologyopen.com/info and www.foodscience-nutrition.com/info.

SUBMISSION

Authors should submit their manuscripts online at <http://mc.manuscriptcentral.com/appliedmicrobiology>. The main text of a manuscript must be submitted as a Word document (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file. For review purposes submitted papers (both original and revised articles) must be formatted with continuous line numbering and double spaced text throughout. All original files that you upload will be available for the Editorial Office to access.

Cover letter

The cover letter should contain answers to the following two questions, which will help the Editors in determining whether your manuscript should be sent for full peer review (~50 words per answer): 1. How does this work fit the Aims and Scope of the Journal? 2. In what way is this work novel? The

cover letter should also disclose any potential sources of conflict of interest that Editors may consider relevant to their manuscript.

Suggesting reviewers

Authors are invited to suggest at least two reviewers. It is not appropriate for reviewers to be members or former members of the authors' organization(s), or to have been associated with them. Conversely, authors may identify 'non-preferred' reviewers or institutions that they would rather were not approached. Authors should give justification for choosing non-preferred reviewers or institutions in their cover letter. Authors are advised that handling Editors reserve the right to select reviewers of their choice.

MANUSCRIPT PREPARATION AND PRESENTATION

Manuscripts should be drafted as concisely as possible. As space in the Journal is at a premium, the Editors always reserve the right to require authors to reduce the length of their manuscripts. Manuscripts will not be reviewed unless the English is of a publishable standard.

It is strongly recommended that you use the [author submission checklist](#) to help you to prepare your submission to the Journal.

The main text of the manuscript should be prepared as a Word document (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file. Text must be double-spaced, and the pages of the manuscript must be numbered consecutively.

The title page should show the title of the manuscript; the names of authors and place(s) where the work was done; an abbreviated running headline not exceeding 35 letters and spaces; and the complete contact details for the corresponding author.

Original Articles should not exceed 34 pages and should contain the following sections in this order:

- **ABSTRACT:** A brief summary of about 150-200 words, should give the major findings of the investigation under the following four headings: Aims; Methods and Results; Conclusions; Significance and Impact of Study. A list of between five and eight keywords should be added;
- **INTRODUCTION:** A balance must be struck between the pure and applied aspects of the subject;
- **MATERIALS AND METHODS:** Ensure that the work can be repeated according to the details provided. By submission of a manuscript, the authors consent that biological material, including plasmids, viruses and microbial strains, unobtainable from national collections will be made available to members of the scientific community for non-commercial purposes subject to national and international regulations governing the supply of biological material. In the case of a new diagnostic PCR, you should consider the need for an internal amplification control (JAM 2004 96(2):221; available [here](#)).
- **RESULTS:** Well-prepared tables and figures must be a cardinal feature of the 'Results' section because they convey the major observations to readers who scan a paper. Information provided in tables and figures should not be repeated in the text, but focus attention on the importance of the principal findings of the study. In general, journal papers will contain between one and seven figures and tables;
- **DISCUSSION:** This must not recapitulate the results and authors must avoid the temptation of preparing a combined 'Results and Discussion' section;
- **ACKNOWLEDGEMENTS:** Contributors who do not qualify as authors should be acknowledged and their particular contribution described. All sources of funding for the work reported, for all the authors, must be acknowledged. Both the research funder and the grant number (if applicable) should be given for each source of funds;
- **CONFLICT OF INTEREST:** If no conflict of interest exists, then 'no conflict of interest declared' should appear within this section. Otherwise, authors should list all pertinent commercial and other relationships that may be perceived as a potential source of conflict of interest.

- REFERENCES;
- SUPPORTING INFORMATION (if applicable): Supporting Information can be a useful way for an author to include important but ancillary information with the online version of an article. Examples of Supporting Information include additional tables, data sets, figures, movie files, audio clips, 3D structures, and other related nonessential multimedia files. Supporting Information should be cited within the article text. The availability of supporting information should be indicated in the main manuscript by a section headed 'Supporting Information', under which should be appropriate legends for the material. It is published as supplied by the author, and a proof is not made available prior to publication; for these reasons, authors should provide any Supporting Information in the desired final format. For further information on recommended file types and requirements for submission, please visit: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/supinfo.asp>

Review Article manuscripts must normally not exceed 32 pages (A4) including references, figures and tables. As references can make a heavy demand on the pages available to you, it is suggested that you select key references only. The headings in Review Articles are of the author's choice, but the manuscript should begin with a short SUMMARY of 150-200 words. There is no requirement for review articles to have a 'significance and impact' section; this is at the discretion of the author.

Please check and confirm that your article is optimized for search engines. Keywords should appear in the title, abstract and throughout your article in order to increase your article's online visibility. For more information, please see [Writing for SEO](#).

References

The Harvard system should be used. Citation of references having three or more names should be cited in the text as Jones *et al.* (1992) at the first and subsequent times of quoting the reference. A series of references should be given in ascending date order (Green and Smith 1946; Jones *et al.* 1956). Names with the prefixes de, do van, von, etc. will be placed in alphabetical order of the first letter of the prefix, e.g. von Braun would appear under 'V'. Different publications having the same author(s) and year will be distinguished by, for example, 1992a, 1992b. Papers or other publications having no obvious author(s) should usually be cited as 'Anon.' with the year in the text and bibliography. Web sites should be quoted in the text with an access date. Abbreviate journal titles according to Index Medicus (http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html). Personal communications should be cited in the text with initials and family name of all individuals.

The following is an example of order and style to be used in the manuscript:

Fricker, C.R. (1995) Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. In Protozoan Parasites in Water ed. Betts, W.B., Casemore, D., Fricker, C.R., Smith, H.V. and Watkins, J. pp.91-96. London: The Royal Society of Chemistry.

Garner, J.S. and Favero, M.S. (1985) *Guidelines for Handwashing and Hospital Environment Control*. US Public Health Service, Centers for Disease Control HHS No. 99-117. Washington DC: Government Printing Office.

Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P. and Carter, M.J. (2004) Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett Appl Microbiol* **39**, 127-135.

Tables

Tables must be prepared in the same format as the manuscript text, and should ideally appear at the end of the main manuscript file. Tables must not include ruled vertical or horizontal lines with the exception of headers and a footer (see example). The use of explanatory footnotes is permissible

and they should be marked by the following (shown in order of preference): *, †, ‡, §, ¶, **, †† etc. For an example of table style, [click here](#).

Figures

Figures should be uploaded to the online submission site as separate files. Authors are advised that poor quality figures may delay the publication of their paper. Symbols or keys representing data series in graphs and charts must not be shown on the figure itself but be included in the legend. For an example of figure style, [click here](#).

Photographs must be of good quality and high contrast. The magnification must be indicated by adding a bar representing a stated length. Composite photographs can reduce the numbers that require publication. The Journal will not accept figures illustrating SDS-PAGE and agarose gels with multiple lanes, where lane order has been rearranged using digital imaging software. The figure should also show sufficient of the gel to reveal reference markers (e.g. the sample origin and a tracker dye, or a lane of molecular mass markers).

- Save line art such as charts, graphs and illustrations in EPS or PDF format. Most programs have a 'Save as...' or 'Export...' feature to allow you to do this
- Save photographic images in TIFF format. These should be at a resolution of at least 300 dpi at final size
- Save figures containing a combination of photographic images and text (eg annotated photographic images with text labels) as EPS or PDF. Any photographic images embedded within these should be at least 300 dpi
- Perform a visual check of the quality of the generated image. You should be able to zoom in to about 300% without the image becoming noticeably blurred or pixelated. If the image does appear pixelated at this zoom, then try going back to the original image and checking that it complies with the recommended format and settings
- Detailed information on the submission of electronic artwork can be found at: http://media.wiley.com/assets/7323/92/electronic_artwork_guidelines.pdf

Colour figures

Online-only colour in figures is free of charge, however it is essential in these cases that the figure legends apply equally well to both printed greyscale and online colour versions, and do not specifically refer to the colour. Alternatively you can opt to pay for colour in the print and online versions. If your paper is accepted and you have opted for printed colour, we will need a completed Colour Work Agreement Form. This form can be downloaded as a PDF from [here](#) and should be sent to the provided address on acceptance.

English usage, abbreviations and units

Use 'z' spelling where possible, except analyse, dialyse, hydrolyse, etc.; sulfur, sulfate, etc. When using numbers in the text, one to nine should be written in full and 10 and above should be written as numerals. The Journal uses SI units: g l⁻¹ not g/l; d, h, min, s (time units) but week and year in full; mol l⁻¹ (not M or N); probability is P; centrifugation conditions relative to gravity (**g**). Please refer to the Biochemical Journal 'Instructions to Authors' www.biochemj.org/bj/bji2a.htm.

Please [click here](#) for some examples of common abbreviations used in the Journal.

Microbial nomenclature

The Latin binomial name of micro-organisms, plants and animals (other than farm animals) must be given at first mention in the text; thereafter the generic name will be abbreviated in such a way that confusion is avoided when dealing with several genera all beginning with the same letter, viz. *Pseudomonas*, *Proteus*, *Pediococcus*, etc. (see list of abbreviations below). Subspecies are italicized (*Corynebacterium diphtheriae* subsp. *mitis*); groups and types are printed in Roman and designated by capital letters or Arabic figures (e.g. *Staphylococcus aureus* group A). Common names will not have an initial capital letter nor will they be underlined in the manuscript, viz. pseudomonad, salmonellas. The specific name will be given in full in the captions to tables and figures. Major ranks are written in Roman with an initial capital (e.g. Enterobacteriaceae).

Please [click here](#) for a list of abbreviations currently in use for common generic names and for notes on referring to plant pathogenic bacteria.

Gnotobiotic animals

The terminology for describing the environmental status of animals in gnotobiotic experiments has established itself by usage. *Germ-free* implies freedom from any detectable microorganisms or viruses and it is limited by the tests used to detect contaminants. *Conventional animals* have a full complement of associated microbes. *Open conventional animals* are housed in a standard animal house. *Isolator conventional animals* are maintained in isolators and associated with full flora. *Ex-germ-free* animals are those with an associated flora which have become conventional.

Statistics

Tests must be presented clearly to allow a reader with access to the data to repeat them. Statistical tests used in the study should be clearly indicated in the Materials and Methods section. It is not necessary to describe every statistical test fully, as long as it is clear from the context what was done. In particular, null hypotheses should be clearly stated.

Authors are urged to give consideration to the assumptions underlying any statistical tests used and to assure the reader that the assumptions are at least plausible. Authors should be prepared to use nonparametric tests if the assumptions do not seem to hold.

Footnotes

Not permitted other than on the first page of a manuscript where they are used to show the author's change of address and the address for correspondence.

Experimental hazards

Chemical or microbiological hazards that may be involved in the experiments must be explained. Authors should provide a description of the relevant safety precautions adopted or cite an accepted 'Code of Practice'.

English-language editing service

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found [here](#). All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

AFTER ACCEPTANCE

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF file from this site and corrections made following the instructions sent with the proofs. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetter errors, may be charged separately.

Early View

Journal of Applied Microbiology is covered by Wiley Online Library's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at: <http://www.doi.org/faq.html>.

Offprints

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Free access to the final PDF offprint or your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the Journal.

Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, Wiley Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the Managing Editor or Production Editor.

Disclaimer

Whilst every effort is made by the Publishers and Editorial Board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this Journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser concerned. Accordingly, the Publishers and Editors and their respective

employees, officers and agents accept no responsibility or liability whatsoever for the consequences of any such inaccurate or misleading data, opinion or statement.