

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor ,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir de
01/11/2020.

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

PROBIÓTICO ADMINISTRADO EM EMBRIÕES E PINTOS DE FRANGOS DE
CORTE NA REDUÇÃO DA COLONIZAÇÃO POR *Salmonella* Heidelberg E
INTEGRIDADE ENTÉRICA

BRUNA BOARO MARTINS

Tese apresentada ao Programa
de Pós-graduação em
Zootecnia como parte dos
requisitos para obtenção do
título de Doutor em Zootecnia.

Botucatu - SP
Novembro – 2018

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

PROBIÓTICO ADMINISTRADO EM EMBRIÕES E PINTOS DE FRANGOS DE
CORTE NA REDUÇÃO DA COLONIZAÇÃO POR *Salmonella* Heidelberg E
INTEGRIDADE ENTÉRICA

BRUNA BOARO MARTINS
Mestre em Zootecnia

Orientador: Prof. Dr. Antônio Celso Pezzato

Tese apresentada ao Programa
de Pós-graduação em
Zootecnia como parte dos
requisitos para obtenção do
título de Doutor em Zootecnia.

Botucatu - SP
Novembro – 2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

M381p Martins, Bruna Boaro, 1989-
Probiótico administrado em embriões e pintos de frangos de corte na redução da colonização por *Salmonella Heidelberg* e integridade entérica / Bruna Boaro Martins. - Botucatu : [s.n.], 2018
101 f.: il., grafs., tabs.

Tese(Doutorado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2018
Orientador: Antônio Celso Pezzato
Inclui bibliografia

1. Frango de corte. 2. Ave - Crescimento. 3. Probióticos. 4. Prevenção de infecções. I. Pezzato, Antônio Celso II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

Elaborada por Maria Lúcia Martins Frederico - CRB-8:5255

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

BIOGRAFIA DO AUTOR

Bruna Boaro Martins – nascida em 05 de fevereiro de 1989, na cidade de Botucatu – SP, filha de Augusto Pedro Martins e Márcia Regina Fernandes Boaro.

Em março de 2008 iniciou o curso de graduação em Zootecnia na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Botucatu – SP, em agosto de 2010 passou a ser bolsista de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, fato que se estendeu até o mês de julho de 2011. O título de Bacharel em Zootecnia foi obtido em dezembro de 2012.

Ingressou, em março de 2013, no curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Botucatu - SP, sendo bolsista da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP durante todo o período. O título de Mestre em Zootecnia foi recebido em abril de 2015.

Em agosto de 2015 iniciou o curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, - Câmpus de Botucatu – SP, com bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq durante todo o período. A defesa de doutorado foi realizada em novembro de 2018.

Em novembro de 2017, ingressou no curso de pós-graduação intitulado MBA em Gestão de Negócios na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo com término previsto para julho de 2019.

Dedico

Sobretudo a Deus,

Por zelar por mim durante essa caminhada, agradeço o amparo dispendido nos momentos de dificuldades e por iluminar meu caminho de tal forma que pude ter passos firmes em busca dos meus objetivos.

À minha mãe,

Márcia Regina Fernandes Boaro, minha maior incentivadora sem a qual nada disso faria sentido. Obrigada por confiar e acreditar em mim e acima de tudo por me encorajar a seguir tantas vezes que me encontrei em dificuldade. Amiga, companheira, mestre e exemplo de vida, essa conquista é fruto do seu amor e dedicação por mim.

Agradeço

Em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Ducatti (*in memoriam*), por me acolher prontamente para o ingresso no doutorado. Obrigada por confiar em mim antes mesmo de me conhecer, pelos ensinamentos e experiências trocadas que foram essenciais para me encorajar seguir até o fim.

Ao Prof. Dr. Antônio Celso Pezzato, obrigada pela disposição em prontamente me ajudar e acima de tudo, pela confiança no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, Câmpus de Botucatu, pela oportunidade de realizar este curso e aprimorar meus conhecimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, Câmpus de Botucatu, pelos ensinamentos e experiências trocadas durante o curso de doutorado.

Ao prof. Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho e prof. Dr. Adriano Sakai Okamoto do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Câmpus de Botucatu, pela concessão do uso das instalações do infectório, bem como pelas amostras de *Salmonella* Heidelberg cedidas e pelos esclarecimentos de tantas dúvidas.

À prof. Dra. Maria Márcia Pereira Sartori, pela ajuda nas análises estatísticas.

À empresa BioCamp, pela oportunidade de trabalhar em parceria, só levo bons frutos que contribuíram de forma ímpar para o meu crescimento profissional. Obrigada Ivan Lee e Paulo Martins pela confiança em meu trabalho e pelas experiências trocadas.

Aos amigos, Luiz Gustavo Bicas Barbosa e Bárbara Cristina da Silva Fernandes obrigada pela ajuda durante todo o desenvolvimento desse trabalho, foi de extrema importância.

Ao meu anjo da guarda, pela fidelidade de estar sempre ao meu lado me guiando.

Ao meu amado companheiro Guilherme Amelio Milian, meu especial obrigada, por estar ao meu lado incondicionalmente. Agradeço por tantas vezes se tornar um economista zootecnista e me ajudar no desenvolvimento desse trabalho. Seu companheirismo e afeto foram essenciais.

À todos que aqui não foram citados nominalmente, mas que de alguma forma contribuíram com o desenvolvimento desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Muito obrigada!

PROBIÓTICO ADMINISTRADO EM EMBRIÕES E PINTOS DE FRANGOS DE
CORTE NA REDUÇÃO DA COLONIZAÇÃO POR *Salmonella* Heidelberg E
INTEGRIDADE ENTÉRICA

RESUMO – Objetivou-se avaliar o efeito de probiótico administrado *in ovo* ou spray sobre a histomorfometria, contagem de células caliciformes (CC), avaliação ultraestrutural da mucosa entérica e quanto à capacidade de redução de *Salmonella* Heidelberg (SH) em órgãos e no conteúdo cecal de frangos de corte desafiados experimentalmente com SH. Para histomorfometria, CC, avaliação ultraestrutural da mucosa entérica foram utilizados 297 frangos de corte Cobb®, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (2x2)+2, com 9 repetições. Para as análises microbiológicas, foram utilizados 162 frangos de corte Cobb®, distribuídos em DIC com 3 tratamentos (T3, T4 e T5), com 9 repetições de 6 aves cada. T1: aves tratadas *in ovo* com probiótico; T2: aves tratadas por spray com probiótico; T3: aves tratadas *in ovo* com probiótico e desafiadas com SH; T4: aves tratadas por spray com probiótico e desafiadas com SH; T5: aves não tratadas com probiótico e desafiadas com SH; T6: aves não tratadas com probiótico e não desafiadas com SH. No 2º dia de vida, as aves infectadas foram anilhadas e alojadas junto às aves dos tratamentos T3, T4 e T5. Para contagem de SH em órgãos e no conteúdo cecal aos 3, 5, 7, 14 e 21 dias pós-desafio e para análise histomorfométrica, CC e avaliação ultraestrutural nos 5, 9, 16 e 23 dias de vida das aves, 5 aves de cada tratamento mais 1 ave anilhada, dos tratamentos T3, T4 e T5 foram eutanasiadas. Os dados microbiológicos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis ranks, enquanto que os dados de histomorfometria e CC foram submetidos à análise de variância. Aos 21 dias pós-desafio para o conteúdo cecal, foi possível observar que aves do T4 apresentaram menor contaminação quando comparado com as aves do T3 e T5. Para os parâmetros histomorfométrico e CC, o probiótico apresentou ligeira melhora nas medidas em todas as idades e segmentos estudados. A integridade da mucosa ileal mostrou-se mais preservada, e a colonização com agente trófico foi mais intensa na mucosa cecal das aves do T2 e T4. O probiótico destaca-se como importante alternativa ao uso de antibióticos para controle de SH em frangos e corte, pois houve redução da contaminação no conteúdo cecal, melhora a integridade da mucosa entérica de frangos de corte, e mostra maior eficácia em estabelecer microbiota protetora capaz de preservar a ultraestrutura intestinal quando submetido a desafio com SH, sendo que a via de aplicação spray apresenta maior potencial de atuação.

PALAVRA-CHAVE: agente trófico, exclusão competitiva, *in ovo*, microbiológico, saúde intestinal

PROBIOTIC ADMINISTERED IN EMBRYOS AND CHICK OF BROILERS IN THE REDUCTION OF COLONIZATION BY *Salmonella* Heidelberg AND ENTERIC INTEGRITY

ABSTRACT – The aim of this study was to evaluate the effect of probiotic administered *in ovo* or spray on histomorphometry, goblet cell count (CC), ultrastructural evaluation of the enteric mucosa and the ability to reduce *Salmonella* Heidelberg (SH) in organs and cecal content in broilers challenged experimentally with SH. For the histomorphometry, CC, ultrastructural evaluation of the enteric mucosa, 297 Cobb® broilers were used, distributed in a completely randomized design in a factorial (2x2) +2, with 9 replicates. For the microbiological analyzes, 162 Cobb® broilers were used, distributed in completely randomized design with 3 treatments (T3, T4 and T5), with 9 replicates of 6 birds each. T1: birds treated *in ovo* with probiotic; T2: birds treated with probiotic by spray; T3: birds treated *in ovo* with probiotic and challenged with SH; T4: birds treated with probiotic by spray and challenged with SH; T5: birds not treated with probiotic and challenged with SH; T6: birds not treated with probiotic and not challenged with SH. On the 2nd day of life, the infected birds were ringed and housed with birds from T3, T4 and T5 treatments. For SH count in organs and cecal content at 3, 5, 7, 14 and 21 days post challenge and for histomorphometric analysis, CC and ultrastructural evaluation at 5, 9, 16 and 23 days of life of the birds, 5 birds of each treatment plus one ringed bird, T3, T4 and T5 treatments were euthanized. The microbiological data were submitted to the Kruskal-Wallis ranks test, while the histomorphometric and CC data were submitted to analysis of variance. At 21 days post challenge for cecal content, it was possible to observe that T4 birds presented lower contamination when compared to the birds of T3 and T5. For the histomorphometric and CC parameters, the probiotic had a slight improvement in measurements in all ages and segments studied. The integrity of the ileal mucosa was more preserved, and the colonization with trophic agent was more intense in the cecal mucosa of the birds of T2 and T4. The probiotic is an important alternative to use of antibiotics for control SH in broilers, because there was a reduction in contamination in the cecal content, it improves the integrity of enteric mucosa of broilers, and it shows a greater efficacy in establishing a protective microbiota of preserving the intestinal ultrastructure when challenged with SH, with the spray application route showing greater potential for action.

KEYWORDS: trophic agent, competitive exclusion, *in ovo*, microbiological, intestinal health

Sumário

CAPÍTULO 1	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	2
INTRODUÇÃO	2
REVISÃO DE LITERATURA.....	4
Desenvolvimento do trato gastrointestinal	4
Importância da alimentação precoce.....	6
Probiótico.....	7
<i>Salmonella</i> spp.	12
<i>Salmonella</i> Heidelberg	13
OBJETIVOS	14
Objetivos gerais	14
Objetivos específicos	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
 CAPÍTULO 2 - PROBIÓTICO NA REDUÇÃO DA INFECÇÃO EM FRANGOS DE	
CORTE DESAFIADOS COM <i>Salmonella</i> Heidelberg	24
RESUMO	25
ABSTRACT	26
INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS	29
Delineamento experimental.....	29
Probiótico.....	29
Tratamento <i>in ovo</i>	29
Tratamento por spray.....	30
Desafio com <i>Salmonella</i> Heidelberg	30
Avaliação da ausência prévia de <i>Salmonella</i> spp. nas aves e na ração.....	33
Avaliação da proteção das aves contra a infecção por <i>Salmonella</i> Heidelberg (SH)	33

Avaliação da infecção sistêmica	33
Amostras de órgãos	34
Amostras de conteúdo cecal	34
Avaliação da excreção fecal de <i>Salmonella</i> Heidelberg	35
Análise estatística	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
Avaliação da proteção das aves contra a infecção por <i>Salmonella</i> Heidelberg (SH)	36
CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

CAPÍTULO 3 - INTEGRIDADE ENTÉRICA DE FRANGOS DE CORTE TRATADOS COM PROBIÓTICO POR DIFERENTES VIAS E DESAFIADOS COM *Salmonella* Heidelberg.....

RESUMO	49
ABSTRACT	50
INTRODUÇÃO	51
MATERIAL E MÉTODOS	53
Delineamento experimental.....	53
Probiótico.....	54
Tratamento <i>in ovo</i>	54
Tratamento por spray.....	54
Desafio com <i>Salmonella</i> Heidelberg	54
Histomorfometria entérica e contagem do número de células caliciformes na mucosa intestinal.....	57
Avaliação ultraestrutural da integridade entérica.....	58
Análise Estatística.....	58
RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
Histomorfometria entérica e contagem do número de células caliciformes na mucosa intestinal.....	59
Avaliação ultraestrutural da integridade entérica.....	72
CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

CAPÍTULO 4 – IMPLICAÇÕES

Lista de Tabelas

Capítulo 2 - PROBIÓTICO NA REDUÇÃO DA INFECÇÃO EM FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM <i>Salmonella</i> Heidelberg	24
Tabela 1 – Composição centesimal e nutricional calculada da ração basal no período de 1 a 23 dias de idade	32
Tabela 2 – Análise microbiológica quanlitativa em órgãos, conteúdo cecal e suabe de cloaca de frangos de corte tratados com probiótico e contaminados com <i>Salmonella</i> Heidelberg	37
Tabela 3 – Análise microbiológica quantitativa ($\log_{10}$ UFC/g) e qualitativa para presença de <i>Salmonella</i> Heidelberg em aves que receberem desafio com a bactéria diretamente via intraesofágica	38
Capítulo 3 - INTEGRIDADE ENTÉRICA DE FRANGOS DE CORTE TRATADOS COM PROBIÓTICO POR DIFERENTES VIAS E DESAFIADOS COM <i>Salmonella</i> Heidelberg	48
Tabela 1 – Composição centesimal e nutricional calculada da ração basal no período de 1 a 23 dias de idade	56
Tabela 2 – Médias de altura de vilo, profundidade de cripta e largura de vilo (μm) da mucosa do duodeno de frangos de corte aos 5 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com <i>Salmonella</i> Heidelberg	62
Tabela 3 – Médias de altura de vilo, profundidade de cripta e largura de vilo (μm) da mucosa do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 5 e 9 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com <i>Salmonella</i> Heidelberg	63
Tabela 4 – Médias de profundidade de cripta (μm) da mucosa do duodeno e íleo de frangos de corte aos 16 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com <i>Salmonella</i> Heidelberg	64

Tabela 5 – Médias de altura de vilo, profundidade de cripta e largura de vilo (μm) da mucosa do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 16 e 23 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com *Salmonella* Heidelberg 65

Tabela 6 – Contagem do número de células caliciformes na mucosa do duodeno e jejuno de frangos de corte aos 5 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com *Salmonella* Heidelberg 69

Tabela 7 – Contagem do número de células caliciformes na mucosa do íleo de frangos de corte aos 5 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com *Salmonella* Heidelberg 69

Tabela 8 – Contagem do número de células caliciformes na mucosa do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 9 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com *Salmonella* Heidelberg 70

Tabela 9 – Contagem do número de células caliciformes na mucosa do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 16 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com *Salmonella* Heidelberg 70

Tabela 10 – Contagem do número de células caliciformes na mucosa do duodeno de frangos de corte aos 23 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com *Salmonella* Heidelberg 71

Tabela 11 – Contagem do número de células caliciformes na mucosa do jejuno e íleo de frangos de corte aos 23 dias de idade tratados com probiótico e desafiados com *Salmonella* Heidelberg 71

Lista de Figuras

Capítulo 2 - PROBIÓTICO NA REDUÇÃO DA INFECÇÃO EM FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM *Salmonella* Heidelberg 24

Figura 1 - Análise Microbiológica em fígado de frangos de corte tratados com probiótico e desafiados experimentalmente com *Salmonella* Heidelberg 42

Figura 2 - Análise Microbiológica em baço de frangos de corte tratados com probiótico e desafiados experimentalmente com *Salmonella* Heidelberg 42

Figura 3 - Análise Microbiológica do conteúdo cecal de frangos de corte tratados com probiótico e desafiados experimentalmente com *Salmonella* Heidelberg ... 43

Figura 4 - Análise Microbiológica do suabe de cloaca de frangos de corte tratados com probióticos e desafiados experimentalmente com *Salmonella* Heidelberg 43

Capítulo 3 - INTEGRIDADE ENTÉRICA DE FRANGOS DE CORTE TRATADOS COM PROBIÓTICO POR DIFERENTES VIAS E DESAFIADOS COM *Salmonella* Heidelberg 48

Figura 1 - Fotomicrografia da mucosa ileal de frangos de corte aos 5 dias de idade. Tratamentos: Ctr N: controle negativo – sem probiótico e sem desafio com *Salmonella* Heidelberg; T1: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T2: probiótico pulverizado via spray no nascimento. 400X, 800X e 1500X 74

Figura 2 - Fotomicrografia da mucosa ileal de frangos de corte aos 9 dias de idade. Tratamentos: Ctr N: controle negativo – sem probiótico e sem desafio com *Salmonella* Heidelberg; T1: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T2: probiótico pulverizado via spray no nascimento. 400X, 800X e 1500X 75

Figura 3 - Fotomicrografia da mucosa ileal de frangos de corte aos 16 dias de idade. Tratamentos: Ctr N: controle negativo – sem probiótico e sem desafio com *Salmonella* Heidelberg; T1: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T2: probiótico pulverizado via spray no nascimento. 400X, 800X e 1500X 76

Figura 4 - Fotomicrografia da mucosa ileal de frangos de corte aos 23 dias de idade. Tratamentos: Ctr N: controle negativo – sem probiótico e sem desafio com *Salmonella* Heidelberg; T1: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T2: probiótico pulverizado via spray no nascimento. 400X, 800X e 1500X 77

Figura 5 - Fotomicrografia da mucosa ileal de frangos de corte aos 5 dias de idade. Tratamentos: Ctr I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. 400X, 800X e 1500X 78

Figura 6 - Fotomicrografia da mucosa ileal de frangos de corte aos 9 dias de idade. Tratamentos: Ctr I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. 400X, 800X e 1500X 79

Figura 7 - Fotomicrografia da mucosa ileal de frangos de corte aos 16 dias de idade. Tratamentos: Ctr I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. 400X, 800X e 1500X 80

Figura 8 - Fotomicrografia da mucosa ileal de frangos de corte aos 23 dias de idade. Tratamentos: Ctr I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. 400X, 800X e 1500X 81

Figura 9 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 5 dias de idade. Tratamentos: Ctr N: controle negativo – sem probiótico e sem desafio com *Salmonella* Heidelberg; T1: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T2: probiótico pulverizado via spray no nascimento. 400X, 1500X e 5000X 84

Figura 10 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 9 dias de idade. Tratamentos: Ctr N: controle negativo – sem probiótico e sem desafio com *Salmonella* Heidelberg; T1: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T2: probiótico pulverizado via spray no nascimento. 400X, 1500X e 5000X 85

Figura 11 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 16 dias de idade. Tratamentos: Ctr N: controle negativo – sem probiótico e sem desafio com *Salmonella* Heidelberg; T1: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T2: probiótico pulverizado via spray no nascimento. 400X, 1500X e 5000X 86

Figura 12 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 23 dias de idade. Tratamentos: Ctr N: controle negativo – sem probiótico e sem desafio com *Salmonella* Heidelberg; T1: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação; T2: probiótico pulverizado via spray no nascimento. 400X, 1500X e 5000X 87

Figura 13 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 5 dias de idade. Tratamentos: Ctr I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. 400X, 1500X e 5000X 88

Figura 14 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 9 dias de idade. Tratamentos: Ctr I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. 400X, 1500X e 5000X 89

Figura 15 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 16 dias de idade. Tratamentos: Ctr I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. 400X, 1500X e 5000X 90

Figura 16 - Fotomicrografia da mucosa cecal de frangos de corte aos 23 dias de idade. Tratamentos: Ctr I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. 400X, 1500X e 5000X 91

Figura 17- Fotomicrografia aos 5, 9, 16 e 23 dias de idade da mucosa ileal à esquerda e cecal à direita de frangos de corte que receberam desafio com *Salmonella* Heidelberg via intraesofágica. Tratamentos: Ctr I: controle infecção – sem probiótico e com desafio com *Salmonella* Heidelberg; T3: probiótico inoculado *in ovo* no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida; T4: probiótico pulverizado via spray no nascimento e desafiadas por contato com *Salmonella* Heidelberg no 2º dia de vida. Íleo: 400X, 800X e 1500X e ceco: 400X, 1500X e 5000X..... 92

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal – Relatório Anual 2018. Disponível em: https://www.dropbox.com/s/4yxz1x4qmonkg0f/4653a_final_abpa_relatorio_anual_2018_web_paginas.pdf?dl=0. Acesso em 10 agosto de 2018.
- Back, A. Salmonelose. In: Manual de Doenças das Aves. 2 ed. Cascavel. Editora Integração, p.174-195, 2010.
- Bai, J.; Rai, R. Bacterial quorum sensing and food industry. *Comp Rev Food Science Food Safety*, v.10, p.184-194, 2011.
- Barrow, P.A. et al. The paratyphoid salmonellae. *Revue Scientifique et Technique*. v.19, n.2, p.351-375, 2000.
- Barrow, P.A.; Jones, M.A.; Smith, A.L.; Wigley, P. The long view: *Salmonella* – the last forty years. **Avian Pathol**, v. 41, n.5, p. 413-420, 2012.
- Bertequini, A.G.; Hossain, S.M. Utilização de um tipo de probiótico como promotor de crescimento em rações de frangos de corte. In: Conferência apinco de ciência e tecnologia avícola, 1993, Santos. **Anais...** Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p.1, 1993.
- Boaro, B.M. Morfofisiologia do trato intestinal. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2009, Porto Alegre. **Anais...** Facta: Campinas, 2009. p. 262-274.
- Boleli, I. C.; Maiorka, A.; Macari, M. Estrutura funcional do trato digestório. In: Macari, M.; Furlan, R. L.; Gonzales, E. Fisiologia Aviária aplicada a frangos de corte. 2ª ed. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, p.75-95, 2002.
- Busanello, M.; Pozza, M.S.S.; Barros, P.C.; Chambo, A.P.S.; Eckstein, I.I. Probióticos, seus modos de ação e a produção animal. *Scientia Agraria Paranaensis*, v.11, n.4, p.14-24, 2012.
- Careghi, C.; Tona, K.; Onagbesan, O.; Buyse, J.; Decuyper, E.; Bruggeman, V. The effects of the spread of hatch and interaction with delayed feed access after hatch

on broiler performance until seven days of age. **Poultry Science**, v.84, p.1314–1320, 2005.

Cera, K.R.; Mahan, D.C.; Cross, R.F.; Reinhart, G.A.; Whitmoyer, R.E. Effect of age, weaning and posweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young suine. **Journal of animal science**, v.66, n. 2, p. 574-584, 1988.

Cesario, M.D. Desenvolvimento embrionário pré e pós-postura – períodos críticos. In: Macari, M.; Gonzalez, E.; Patrício, I.S.; Naas, I.A.; Martins, P.C. Manejo da incubação. 3ª Ed. Campinas: FACTA, p.48-62, 2013.

Chapell, L. et al. The immunology of avian systemic salmonellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.128, p.53-59, 2009.

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, p.1150–1153, 2006.

Clavijo, V.; Flórez, M.J.V. The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review, **Poultry Science**, v.97, p.1006–1021, 2018.

Colla, F.L.; Rodrigues, L.B.; Borsoi, A.; Dickel, E.L.; Nascimento, V.P.; Santos, L.R. Isolamento de *Salmonella* Heidelberg em diferentes pontos da tecnologia de abate de frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.79, n.4, p.603-606, 2012.

Desmidt, M.; Ducatelle, R.; Mast, J.; Goddeeris, M.; Kaspers, B.; Haesebrouck, F. Role of the humoral immune system in *Salmonella* Enteritidis phage type four infection in chickens. **Vet Immunol**, Amsterdam, v.63, n.4, p. 355-367, 1998.

Dibner, J.J.; Kitchell, M.L.; Atwell, C.A.; Ivey, J. The effect of dietary ingredients and age on the microscopic structure of the gastrointestinal tract in poultry. **Journal of Applied Poultry Research**, v.5, p.70-77, 1996.

EMA (European Medicines Agency) and EFSA (European Food Safety Authority). EMA and EFSA Joint Scientific Opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting

impacts on food safety (RONAFA). [EMA/CVMP/570771/2015]. **European Food Safety Authority Journal**, v.15, n.1, pp. 245, 2017.

FAO/WHO (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2017.

Ferket, P.R. Embryo epigenetic response to breeder management and nutrition. World's Poultry Congress. Salvador Proceedings; Salvador, Brazil, 2012.

Flemming, J.S.; Freitas, R.J.S. Avaliação do efeito de prebióticos (MOS), probióticos (*Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*) e promotor de crescimento na alimentação de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.2, p.41-47, 2005.

Foley, S.L.; Nayak, R.; Hanning, I.B.; Johnson, T.J.; Han, J.; Ricke, S.C. Population dynamics of *Salmonella* enteric serotypes in commercial egg and poultry production. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.13, p.4273-4279, 2011.

Forstner, J.F.; Oliver, M.G.; Sylvester, F.A. Production, structure and biologic relevance of gastrointestinal mucins. In: Guerrant R.L. (Ed.), *Infections of Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York. p.71-88, 1995.

Fuller, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.6, p.365-378, 1989.

Furlan R.L. Aspectos fisiológicos da utilização de probióticos e prebióticos visando a saúde intestinal. Memórias Asociacion de Médicos Veterinarios Especialistas en Avicultura del Ecuador. AMEVEA-E, Quito. p. 25, 2010.

Higgins, J.P. et al. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture treatment timing on *Salmonella* Enteritidis in neonatal broilers. **Poultry Science**, v.89, p.243-247, 2010.

Hofer, E.; Silva Filho, S.J.; Reis, E.M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.2, p. 55-62, 1997.

- Jin, L.Z. et al. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. **Poultry Science**, v.77 p.1259-1265, 1998.
- JOINT WHO/FAO/OIE. Food and Agricultural Organization/World Health Organization Background document for the Joint WHO/FAO/OIE expert. In: Workshop on nonhuman antimicrobials usage and antimicrobials resistance scientific assessment. Geneva, Switzerland, December v.1, n.5, p.117, 2003.
- Kabir, S.M.L. The Role of Probiotics in the Poultry Industry. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, p. 3531-3546. 2009.
- Knap, I. Kehlet, A.B.; Bennedsen, M.; Mathis, G.F.; Hofacre, C.L.; Lumpkins, B.S.; Jensen, M.M.; Raun, M.; Lay, A. *Bacillus subtilis* (DSM17299) significantly reduces *Salmonella* in broilers. **Poultry Science**, v.90, p. 1690-1694, 2011.
- Kottwitz, L.B.M.; Oliveira, T.C.R.M.; Alcocer, I.; Farah, S.M.S.S.; Abrahão, W.S.M.; Rodrigues, D.P. Avaliação epidemiológica dos surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no estado do Paraná. **Acta Scenarium Health Sciences**, v.32,n.1,p.9-15, 2010.
- Kuritz, L.N.; Westphal, P.; Santin, E. Probióticos na avicultura. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.8, p.1457-1465, 2014.
- Lancini, J.B. Fatores exógenos na função gastrointestinal. In: Fisiologia da Digestão e Absorção das Aves. Fundação Apinco, p. 99-126, 1994.
- Lee, K. et al. Direct-fed antimicrobials and their impact on the intestinal microflora and immune system of chickens. **Journal of Poultry Science**, v.47, p.106-114, 2010.
- Lima, E.T.; Andreatti Filho, R.L.; Gonçalves, G.A.M.; Rocha, T.S.; Menconi, A.M.; Okamoto, A.S. Perfil de sensibilidade de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis isolada de aves, frente a drogas e substâncias antimicrobianas produzidas por *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus salivarius*. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.1, p.180-189, 2009.

- Loddi, M.M. Probióticos e prebióticos na nutrição de aves. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, n.23, p.1-8, 2001.
- Lorençon, L., Nunes, R. V. N., Pozza, P. C., Pozza, M. S. S., Appelt, M. D., Silva, W. M. S. Utilização de promotores de crescimento para frangos de corte em rações fareladas e peletizadas. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v.29, p.151-158, 2007.
- Lourenço, M.C.; Kuritza, L.N.; Westphal, P.; Miglino, L.B.; Pickler, L.; Kraieski, A.L.; Santin, E. Uso de probiótico sobre a ativação de células T e controle de *Salmonella* Minnesota em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.1, p.11-14, 2013.
- Macari, M.; Lunedo, R.; Pedroso, A.A. Microbiota intestinal de aves. In: Macari, M.; Mendes, A.A., Menten, J.F; Naas, I.A. Produção de frangos de corte. 2ª Ed. Campinas: FACTA, p.300-319, 2014.
- Maiorka, A.; Rocha, C. Dietas iniciais, desenvolvimento do trato gastrointestinal e impacto sobre o desempenho de frango de corte. **V Intestinal Health Food Safety Seminar**, 2009.
- 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.
- Mendes, A.A. sanidade avícola: o segredo do sucesso da avicultura brasileira. Audiência pública na câmara dos deputados. Brasília, 2015.
- Ministério da Saúde. Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. 2018. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>. Acessado em: 20 de agosto. 2018.
- Moraes, A.C.I.; Bastos, I.H.; Altarugio, R.; Nagayoshi, B.A.; Gross, L.S.; Okamoto, A.S.; Andreatti Filho, R.L. Avaliação da atividade inibitória de *Lactobacillus* spp.

sobre Salmonella Heidelberg. **Revista Ciência, Tecnologia & Ambiente**, v.6, n.1, p.43-49, 2017.

Morgulis, M.S. Imunologia Aplicada. In: Macari, M.; Furlan, R.L.; Gonzales, E. Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. Jaboticabal: FUNEP/UNESP. p.231, 2008.

Noy Y, Sklan D. Energy utilization in newly hatched chicks. **Poultry Science**, v.78, p.1750–1756, 1999.

Noy, Y.; Sklan, D. Digestion and absorption in the young chick. **Poultry Science**, v.74, n.2, p.366- 373, 1995.

Oliveira, J.E.; Van der Hoeven-Hangoor, E.; Van der Linde, I.B.; Montijn, R.C.; Van der Vossen, J.M. *In Ovo* Inoculation of Chicken Embryos with Probiotic Bacteria and Its Effect on Posthatch Salmonella Susceptibility. **Poultry Science**, v.93, p.818-829, 2014.

Oliveira, M.D.; Zavarize, K.C.; Gomes, N.A.; Rocha, F.R.T.; Martins, J.M.S.; Litz, F.H.; Castilhano, H. Aditivos alternativos na alimentação de aves. **PUBVET**, Londrina, v.6, n.27, ed. 214, 2012.

Organização mundial da saúde animal - OIE. **Bioseguridad y resistencia a los antimicrobianos**. 2012. Disponível em: <http://www.oie.int/es/para-losperiodistas/comunicados-de-prensa>. Acesso em: 11 set. 2017.

Park, Y. H., Hamidon, F., Rajangan, C., Soh, K. P., Gan, C. Y., Lim, T. S., ... Liong, M. T. Application of Probiotics for the Production of Safe and High-quality Poultry Meat. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v.36, n.5, p.567–576, 2016.

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

Quigley, J. 2001. Calf Note #34-Intestinal mucin. In: Calf Notes.com. Disponível em <http://www.calfnotes.com/pdf/CN034.pdf>

- Rocha, C.; Maiorka, A. Nutrição “in ovo”. In: Macari, M.; Gonzalez, E.; Patrício, I.S.; Naas, I.A.; Martins, P.C. Manejo da incubação. 3ª Ed. Campinas: FACTA, p.223-239, 2013.
- Roto, S.M.; Kwon, Y.M.; Ricke, S.C. Applications of *in ovo* technique for the optimal development of the gastrointestinal tract and the potential influence on the establishment of its microbiome in poultry. **Frontiers in Veterinary Science**, v.3, p63, 2016.
- Santos, R.J.; Meza, S.K.L.; Martini, K.C.; Nunes, R.V. A importância do controle da *Salmonella* na cadeia produtiva de frango de corte. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.12, n.3, p.167-174, 2013.
- Scottá, B.A.; Campos, P.F.; Gomide, A.P.C.; Barroca, C.C.; Formigoni, A.S.; Zerlotini, M.F. Nutrição pré e pós-eclosão em aves. **PUBVET**, Londrina, v. 8, n. 8, Ed. 257, Art. 1702, 2014.
- Sell, J.L.; Angel, C.R.; Piquer, F.J.; Mallarino, E.G.; Al-Batshan, H.A. Development patterns of selected characteristics of the gastrointestinal tract of young turkeys. **Poultry Science**, v.70, p.1200–1205, 1991.
- Silva, C.A.; Hoshi, E.H.; Pacheco, G.D.; Briganó, M.V. Avaliação de probiótico (*Pediococcus acidilactici* e *Bacillus subtilis*) após o desmame e efeitos no desempenho de leitões. *Semana: Ciências Agrárias*, Londrina, v.27, n.1, p 133-140, 2006.
- Silva, E.N.; Alves Filho, R.L. Probioticos e prebioticos na avicultura. II simpósio de sanidade avícola, Santa Maria, RS. 2000.
- Solcia, E.; Polak, J.M.; Pearse, A.G.E.; Forssman, W.G.; Larsson, L.I.; Sundler, F.; Lechago, J.; Grimelius, L.; Fijita, T.; et al. Classification of gastroenteropancreatic endocrine cells. In: Bloom, S.R. (ed.). Gut hormones. Edinburgh, Churchill-Livingstone, p.40-48, 1978.

- Song, J.; Xiao, K. Ke, Y.L.; Jiao, L.F.; Hu, C.H.; Diao, Q.Y.; Shi, B.; Zou, X.T. Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. **Poultry Science**, v.93, n.3, p.581–588, 2014.
- Szabó, I.; Wieler, L.H.; Tedin, K.; Scharek-Tedin, L.; Taras, D.; Hensel, A.; Appel, b.; Nöckler, K. Influence of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 infection in a porcine animal infection model. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.9, p.2621-2628, 2009.
- Teague, K.D.; Graham, L.E.; Dunn, J.R.; Cheng, H.H.; Anthony, N.; Latorre, J.D.; Menconi, A.; Wolfenden, R.E.; Wolfenden, A.D.; Mahaffey, B.D.; Baxter, M.; Hernandez-Velasco, X.; Merino-Guzman, R.; Bielke, L.R.; Hargis, B.M.; Tellez, G. In ovo evaluation of FloraMax[®]-B11 on Marek's disease HVT vaccine protective efficacy, hatchability, microbiota composition, morphometric analysis, and *Salmonella* enteritidis infection in broiler chickens. **Poultry Science**, v.96, p.2074–2082, 2017.
- Thompson, K.L.; Applegate, T.J. Feed withdrawal alters small-intestinal morphology and mucus of Broiler. **Poultry Science**, v.85, p.1535–1540, 2006.
- Uni, Z.; Ferket, P.R. Methods for early nutrition and their potential. **World Poultry Science Journal**, v.60, p.103–113, 2004.
- Uni, Z.; Smirnov, A.; Sklan, D. Pre- and posthatch development of goblet cells in the broiler small intestine: effect of delayed access to feed. **Poultry Science**, v.82, p.320–327, 2003a.
- Uni, Z.; Tako, E.; Gal-Garber, O.; Sklan, D. Morphological, Molecular, and Functional Changes in the Chicken Small Intestine of the Late-Term Embryo. **Poultry Science**, v.82, p.1747–1754, 2003b.
- Van Dijk, J.; Huisman, J.; Koninkx, J. Structural and functional aspects of a healthy gastrointestinal tract. In: Structural and functional aspects of a healthy gastrointestinal tract. In: Nutrition and Health of the Gastrointestinal Tract. Ed. M. Blok, H. 2002.

Wolfenden, A.D.; Vicente, J.L.; Bielke, L.R.; Pixley, C.M.; Higgins, S.E.; Donoghue, D.J.; Hargis, B.M.; Tellez, G. Evaluation of spray application of a Lactobacillus-based probiotic on Salmonella Enteritidis colonization in broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, v.6, n.7, p.493-496, 2007.

Wu, B.Q.; Zhang, T.; Guo, L.Q.; Lin, J.F. Effects of Bacillus subtilis KD1 on broiler intestinal flora. **Poultry Science**, v.90, n.11, p.2493-2499, 2011.

PROBIÓTICO NA REDUÇÃO DA INFECÇÃO EM FRANGOS DE CORTE
DESAFIADOS COM *Salmonella* Heidelberg

RESUMO - O experimento foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de probiótico administrado *in ovo* ou spray, quanto à capacidade de redução de *Salmonella* Heidelberg (SH) em órgãos e no conteúdo cecal de frangos de corte desafiados experimentalmente com SH. Foram utilizados 162 frangos de corte de um dia de idade, machos da linhagem Cobb®, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com 3 tratamentos, e 9 repetições de 6 aves cada. Sendo os tratamentos: Controle infecção: aves não tratadas com probiótico e desafiadas por contato com SH no 2º dia de vida; *In ovo*: aves tratadas *in ovo* com probiótico no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com SH no 2º dia de vida; Spray: aves tratadas por spray com probiótico no 1º dia de vida e desafiadas por contato com SH no 2º dia de vida. Um grupo de aves não tratadas foi desafiado no 1º dia de vida com cultura de SH, contendo $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, as aves receberam 0,5 mL da cultura bacteriana via intraesofágica. No 2º dia de vida, as aves infectadas foram anilhadas e alojadas junto às aves tratadas na proporção de 1 ave infectada para cada 5 aves livres de infecção. Aos 3, 5, 7, 14 e 21 dias pós-desafio, 5 aves mais 1 ave anilhada de cada tratamento, foram eutanasiadas para contagem de SH em órgãos e no conteúdo cecal. Os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ranks ao nível de 5% de significância. Aos 21 dias pós-desafio para análise de conteúdo cecal e aos 13 dias pós-desafio para o suabe de cloaca, foi possível observar que aves que receberam tratamento com probiótico via Spray apresentaram menor contaminação quando comparado com as aves que receberam tratamento com probiótico *In ovo* e Controle Infecção. O probiótico destaca-se como importante alternativa ao uso de antibióticos para controle de SH em frangos e corte, pois houve redução da contaminação no conteúdo cecal e em suabe de cloaca, sendo que a administração via Spray mostrou-se mais efetiva. Assim o probiótico pode ser considerado agente trófico eficaz e que atende as novas tendências de mercado.

PALAVRA-CHAVE: agente trófico, exclusão competitiva, *in ovo*, microbiológico, saúde intestinal

PROBIOTIC IN REDUCTION OF INFECTION IN BROILERS CHALLENGED WITH
Salmonella Heidelberg

ABSTRACT – A trial was conducted to evaluate the effect of probiotic administered *in ovo* or spray on the ability to reduce *Salmonella* Heidelberg (SH) in organs and cecal content in broilers challenged experimentally with SH. Were used 162 one-day-old, males, Cobb® chicks distributed in a completely randomized design with 3 treatments and 9 replicates of 6 birds each. The treatments were: Control Infection: birds not treated with probiotic and challenged by contact with SH on the 2nd day of life; *In ovo*: birds treated *in ovo* with probiotic on the 18th day of incubation and challenged by contact with SH on the 2nd day of life; Spray: birds treated by spray with the probiotic in the 1st day of life and challenged by contact with SH on the 2nd day of life; A group of untreated birds was challenged on the 1st day of life with SH culture containing 1.0×10^8 CFU/mL, the birds received 0.5 mL of the bacterial culture via intraesophageal. On the 2nd day of life, the infected birds were ringed and housed with birds from different treatments, in the ratio of 1 infected bird to 5 infected birds. At 3, 5, 7, 14 and 21 days after challenge, 5 birds plus 1 ringed bird of each treatment were euthanized for SH counts in organs and cecal contents. Data were submitted to Kruskal-Wallis ranks non-parametric test at the 5% level of significance. At 21 days post challenge for the analysis of cecal content and at 13 days post challenge for cloacal suabe, it was possible to observe that the birds that received treatment with probiotic via Spray presented lower contamination when compared to the birds that received treatment with probiotic *In ovo* and Control Infection. The probiotic is an important alternative to use of antibiotics to control SH in broilers, because there was a reduction in contamination in cecal content and in cloacal suabe, being that administration via Spray was more effective. Therefore the probiotic can be considered effective trophic agent and that satisfies the new market tendencies.

KEYWORDS: competitive exclusion, *in ovo*, intestinal health, microbiological, trophic agent

CONCLUSÃO

O probiótico destaca-se como importante alternativa ao uso de antibióticos para controle de *Salmonella* Heidelberg em frangos e corte, pois houve redução da contaminação no conteúdo cecal e em suabe de cloaca, sendo que a administração via Spray mostrou-se mais efetiva. Assim o probiótico pode ser considerado agente trófico eficaz e que atende as novas tendências de mercado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, H.K. Antibiotic Resistance Gene Discovery in Food-Producing Animals. **Current Opinion in Microbiology**, v.19, p. 25-29, 2014.
- Andreatti Filho, R.L.; Okamoto, A.S.; Lima, E.T.; Gratão, P.R.; Delbem, S.R. Effect of cecal microflora and *Lactobacillus salivarius* *in ovo* administration used on chicken previously challenged with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Arquivos Brasileiros Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.4, p.467-471, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 62 -Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União. Brasília, 26 de agosto de 2003.
- Cury, H.A. Avaliação de aditivos na água de bebida para controle de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Heidelberg em frangos de corte. 2013. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.
- Ferreira, L.L. et al. Salmonelose em sanidade avícola e saúde pública. **Revista Eletrônica Nutridime**, v.10, p. 2716 – 2751, 2013.
- Jeong, J.S.; Kim, I.H. Effect of *Bacillus subtilis* C-3102 spores as a probiotic feed supplement on growth performance, noxious gas emission and intestinal microflora in broilers. **Poultry Science**, v.93, p.3097–3103, 2014.

- Khobondo, J.O.; Muasya, T.K.; Miyumo, S.; Okeno, T.O.; Wasike, C.B.; Mwakubambanya, R.; Kingori, A.M.; Kahi, A.K. Genetic and nutrition development of indigenous chicken in Africa. **Livestock Research for Rural Development**. v.27, 2015a.
- Khobondo, J.O.; Ogore, P.B.; Atela, J.A.; Onjoro, P.S.; Ondiek, J.O.; Kahi, A.K. The effects of dietary probiotics on natural IgM antibody titres of Kenyan indigenous chicken. **Livestock Research for Rural Development**, v.27, 2015b.
- Knap, I. et al. *Bacillus subtilis* (DSM17299) significantly reduces *Salmonella* in broilers. **Poultry Science**, v.90, p.1690–1694, 2011.
- Lekshimi, M. et al. The food production environment and the development of antimicrobial resistance In human pathogens of animal origin. **Microorganisms**, v.5, p.1-1, 2017.
- Lima, L. Ambiência e as leis da termodinâmica. In: 19º Simpósio Brasil Sul de Avicultura e 10º Brasil Sul Poultry Fair. 2018, Chapecó. **Anais...** Chapecó: Núcleo Oeste de Médicos Veterinários e Zootecnistas, p.18-20, 2018.
- Madej, J. P.; Stefaniak, T.; Bednarczyk, M. Effect of *in ovo*-delivered prebiotics and synbiotics on lymphoid-organs' morphology in chickens. **Poultry Science**, v.94, p.1209–1219, 2015.
- Matté, F.; Dalmagro, M.; Gazoni, F. L.; Piltz, S. Eficácia de um probiótico composto por 11 cepas de *Lactobacillus* no controle da *Salmonella* Heidelberg em frangos de corte. **Anais Conferência Apinco FACTA**. Atibaia, SP. 2014.
- Mead, G. et al. The *Salmonella* on Raw Poultry Writing Committee. Scientific and Technical Factors Affeting the setting of *Salmonella* Criteria for Raw Poultry: A Global Perspective. **Journal of Food Protection**, v.73, p.1566-1590, 2010.
- Menconi, A.; et al. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture for the treatment of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in neonatal broiler chickens and turkey poult. **Poultry Science**, n. 90, p. 561-565, 2011.

Murate, L.S.; Paião, F.G.; Almeida, A.M., Berchieri Jr, A.; Shimokomaki, M. Efficacy of prebiotics, probiotics, and synbiotics on laying hens and broilers challenged with *Salmonella* Enteritidis. **Journal Poultry Science**, v.52, p.52-56, 2015.

OIE (2013) The One health concept: the OIE approach. Disponível em: www.oie.int.

Oliveira, J. E.; Hoeven-Hangoor, E.; Linde, I. B.; Montijn, R. C.; Vossen, J. M. B. M. In ovo inoculation of chicken embryos with probiotic bacteria and its effect on posthatch *Salmonella* susceptibility. **Poultry Science**, v. 93, p. 818–829, 2014.

Pruszyńska-Oszmerek, E.; Kolodziejewski, P. A.; Stadnicka, K.; Sassek, M.; Chalupka, D.; Kuston, B.; Nogowski, L.; Mackowiak, P.; Maiorano, G.; Jankowski, J.; Bednarczyk, M. In ovo injection of prebiotics and synbiotics affects the digestive potency of the pancreas in growing chickens. **Poultry Science**, v.94, p.1909–1916, 2015.

Rodrigues, D. P. Salmoneloses aviárias e saúde pública. In: 19º Simpósio Brasil Sul de Avicultura e 10º Brasil Sul Poultry Fair. 2018, Chapecó. **Anais...** Chapecó: Núcleo Oeste de Médicos Veterinários e Zootecnistas, p.98-104, 2018.

Rostagno, H.S.; Albino, L.F.T.; Donzele, J.L.; Gomes, P.C.; Oliveira, R.F.; Lopes, D.C.; Ferreira, A.S.; Barreto, S.L.T.; Euclides, R.F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3. ed. Viçosa-MG: UFV, 252p, 2011.

Silva, I. et al . Evaluation of a Probiotic and a Competitive Exclusion Product Inoculated In Ovo on Broiler Chickens Challenged with *Salmonella* Heidelberg. **Brazilian Journal of Poultry Science**. Campinas, v. 19, p. 19-26, 2017.

Teague, K. D.; Graham, L. E.; Dunn, J. R.; Cheng, H. H.; Anthony, N.; Latorre, J. D.; Menconi, A.; Wolfenden, R. E.; Wolfenden, A. D.; Mahaffey, B. D.; Baxter, M.; Hernandez-Velasco, X.; Merino-Guzman, R.; Bielke, L. R.; Hargis, B. M.; Tellez, G. In ovo evaluation of FloraMax®-B11 on Marek's disease HVT vaccine protective efficacy, hatchability, microbiota composition, morphometric analysis, and *Salmonella* enteritidis infection in broiler chickens. **Poultry Science**, v.96, p.2074–2082, 2017.

WHO (2015). Global Plan on Antimicrobial Resistance. Disponível em: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en>.

Zhang, Z.F.; Kim I.H. Effects of multistrain probiotics on growth performance, apparent ileal nutrient digestibility, blood characteristics, cecal microbial shedding, and excreta odor contents in broilers. **Poultry Science**, v. 93, p. 364–370, 2014.

INTEGRIDADE ENTÉRICA DE FRANGOS DE CORTE TRATADOS COM PROBIÓTICO POR DIFERENTES VIAS E DESAFIADOS COM *Salmonella* Heidelberg

RESUMO – O experimento foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de probiótico administrado *in ovo* ou spray sobre a histomorfometria, contagem de células caliciformes e avaliação ultraestrutural da mucosa entérica de frangos de corte desafiados experimentalmente com *Salmonella* Heidelberg (SH). Foram utilizados 297 frangos de corte de um dia de idade, machos da linhagem Cobb®, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (2x2)+2, com 9 repetições de 5 aves nos tratamentos sem desafio e 6 aves nos tratamentos com desafio com SH. Sendo os tratamentos: T1: aves tratadas *in ovo* com probiótico no 18º dia de incubação; T2: aves tratadas por spray com probiótico no 1º dia de vida; T3: aves tratadas *in ovo* com probiótico no 18º dia de incubação e desafiadas por contato com SH no 2º dia de vida; T4: aves tratadas por spray com probiótico no 1º dia de vida e desafiadas por contato com SH no 2º dia de vida; T5 (controle infecção): aves não tratadas com probiótico e desafiadas por contato com SH no 2º dia de vida; T6 (controle negativo): aves não tratadas com probiótico e não desafiadas com SH. Um grupo de aves não tratadas foi desafiado no 1º dia de vida com cultura de SH, contendo $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, as aves receberam 0,5mL da cultura bacteriana via intraesofágica. No 2º dia de vida, as aves infectadas foram anilhadas e alojadas junto às aves dos tratamentos T3, T4 e T5, na proporção de 1 ave infectada para cada 5 aves livres de infecção. Nos 5, 9, 16 e 23 dias de vida das aves, 5 aves de todos os tratamentos mais 1 ave anilhada dos tratamentos T3, T4 e T5 foram eutanasiadas para análise histomorfométrica, contagem de células caliciformes e avaliação ultraestrutural, sendo que para a última análise foram utilizadas 3 aves por tratamento. Os dados de histomorfometria e contagem de número de células caliciformes foram submetidos à análise de variância ao nível de 5% de significância. Para os parâmetros histomorfométrico e contagem de número de células caliciformes, o probiótico apresentou ligeira melhora nas medidas em todas as idades e segmentos estudados. A integridade da mucosa ileal mostrou-se mais preservada, e a colonização com agente trófico foi mais intensa na mucosa cecal das aves do T2 e T4. O probiótico utilizado no presente estudo melhora a integridade da mucosa entérica de frangos de corte nas diferentes idades estudadas, e quando submetido a desafio com SH, mostra maior eficácia em estabelecer microbiota protetora capaz de preservar a ultraestrutura intestinal, sendo que a via de aplicação spray apresenta maior potencial de atuação.

PALAVRA-CHAVE: agente trófico, saúde intestinal, microbiota, ultraestrutura

ENTERIC INTEGRITY OF BROILERS TREATED WITH PROBIOTIC BY DIFFERENT ROUTES AND CHALLENGED WITH *Salmonella* Heidelberg

ABSTRACT - A trial was conducted to evaluate the effect of probiotic administered *in ovo* or spray on, histomorphometry, goblet cell count and ultrastructural evaluation of the enteric mucosa of broilers challenged experimentally with *Salmonella* Heidelberg (SH). Were used 297 one-day-old, males, Cobb® chicks distributed in a completely randomized design in a factorial (2x2) +2, with 9 replicates of 5 birds in the treatments without challenge and 6 birds in the treatments with challenge with SH. The treatments were: T1: birds treated *in ovo* with probiotic on the 18th day of incubation; T2: birds treated with probiotic spray on the 1st day of life; T3: birds treated *in ovo* with probiotic on the 18th day of incubation and challenged by contact with SH on the 2nd day of life; T4: birds treated by spray with the probiotic in the 1st day of life and challenged by contact with SH on the 2nd day of life; T5 (control infection): birds not treated with probiotic and challenged by contact with SH on the 2nd day of life; T6 (negative control): birds not treated with probiotic and not challenged with SH. A group of untreated birds was challenged on the 1st day of life with SH culture containing 1.0×10^8 CFU/mL, the birds received 0.5mL of the bacterial culture via intraesophageal. On the 2nd day of life, the infected birds were ringed and housed with birds from T3, T4 and T5 treatments, in the ratio of 1 infected bird to 5 infected birds. At 5, 9, 16 and 23 days of life of the birds, 5 birds of all treatments plus 1 ringed bird of T3, T4 and T5 treatments were euthanized for histomorphometric analysis, goblet cell counts. For ultrastructural evaluation were used three birds per treatment. The data of histomorphometric and goblet cell count were submitted to analysis of variance at the 5% level of significance. For the histomorphometry and number of goblet cell counts, the probiotic was able to show a tendency to improve measurements at all ages and segments studied. The integrity of the ileal mucosa was slightly more preserved, and the colonization with trophic agent was more intense in the cecal mucosa of the T2 and T4 birds. The probiotic used in the present study improves the integrity of the enteric mucosa of broiler at the different ages studied, and when challenged with SH, shows greater efficacy in establishing a protective microbiota capable of preserving the intestinal ultrastructure, being that spray application route presents has greater potential for action.

KEYWORDS: intestinal health, microbiota, trophic agent, ultrastructure

CONCLUSÃO

O probiótico utilizado no presente estudo melhora a integridade da mucosa entérica de frangos de corte nas diferentes idades estudadas, e quando submetido a desafio com *Salmonella* Heidelberg, mostra maior eficácia em estabelecer microbiota protetora capaz de preservar a ultraestrutura intestinal. Entre as vias de aplicação, a spray apresenta maior potencial de atuação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal – Relatório Anual 2018. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>>. Acesso em 10 jul. 2018.
- Adhikari, P. A., Kim, W.K. Overview of prebiotics and probiotics: focus on performance, gut health and immunity – a review. **Annals of Animal Science**, v.17, 2017.
- Ajuwon, K. M. Toward a better understanding of mechanisms of probiotics and prebiotics action in poultry species. **Journal Applied Poultry Research**, v.0, p.1-7, 2015.
- Al-Sagan A.A. & Abudabos A.M. Effect of a prebiotic, probiotic and symbiotic on performance of broilers under *Clostridium Perfringens* challenge. **Thai Journal Vet Med**, v.47, n.2, p.257-264, 2017.
- Behmer, O.A.; Tolosa, E.M.C.; Freitas Neto, A.G. Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica. 2.ed. Barueri: Editora Manole, p.331, 2003.
- Beski, S.S.M.; Al-Sardary, S,Y.T. Effects of dietary supplementation of probiotic and synbiotic on broiler chickens hematology and intestinal integrity. **International Journal Poultry Science**, v.14, p.31-36, 2015.
- Boleli, I. C.; Maiorka, A.; Macari, M. Estrutura funcional do trato digestório. In: Macari, M.; Furlan, R. L.; Gonzales, E. Fisiologia Aviária aplicada a frangos de corte. 2ª ed. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, p.75-95, 2002.

- Borsoi, A.; Santin, A.E.; Santos, L.R.; Salle, A.C.T.P.; Moraes, H.L.S.; Nascimento, A.V.P. 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, **Poultry Science**, v.88, p. 750–758, 2009.
- Caputo, L.F.G.; Gitirana, L.B.; Manso, P.P.A. Técnicas histológicas. In: Molinaro, E.M.; Caputo, L.F.G.; Amendoeira, M.R.R. Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratório de saúde. Rio de Janeiro: Escola Politecnica de Saúde Joaquim Venâncio, v.2, p. 89-188, 2010.
- Chichlowski, M.; Croom, W.J.; Edens, F.W.; McBride, B.W.; Qiu, R.; Chiang, C.C.; Daniel, L.R.; Havenstein, G.B.; Koci, M.D. Microarchitecture and spatial relationship between bacteria and ileal, cecal, and colonic epithelium in chicks fed a direct-fed microbial, primalac, and salinomycin. **Poultry Science**, v.86, p.1121–1132, 2007.
- Clavijo, V.; Flórez, M.J.V. The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review. **Poultry Science**, v.97, n.3, p.1006-1021, 2018.
- Cox, C.M.; Dalloul, R.A. Immunomodulatory role of probiotics in poultry and potential in ovoapplication. **Beneficial Microbes**, v.6, p.45–52, 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.
- EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. **EFSA Journal**, n.12(2):3547, p.312, 2014.
- Fuller, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Microbiology**. v.66, n.5, p.365-378, 1989.

- Hume, M.E. Historic perspective: Prebiotics, probiotics, and other alternatives to antibiotics. **Poultry Science**, v.90, p.2663-2669, 2011.
- Laxminarayan, R.; Matsoso, P.; Pant, S.; Brower, C.; Rottingen, J.A.; Klugman, K.; Davies, S. Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. **The Lancet**, v.387, n.10014, p.168-175, 2015.
- Lei, X.; Piao, X.; Ru, Y.; Zhang, H.; Péron, A.; Zhang, H. Effect of *Bacillus amyloliquefaciens*-based Direct-fed Microbial on Performance, Nutrient Utilization, Intestinal Morphology and Cecal Microflora in Broiler Chickens. **Asian Australas. Journal Animal Science**, v.28, n.2, p.239-246, 2015.
- Lourenço, M.C.; Kuritza, L.N.; Westphal, P.; Miglino, L.B.; Pickler, L.; Kraieski, A.L.; Santin, E. Use of probiotics on the T cells activation and *Salmonella* Minnesota control in broiler chickens. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.1, p.11-14, 2013.
- Macari, M.; Lunedo, R.; Pedroso, A.A. Microbiota intestinal de aves. In: Macari, M.; Mendes, A.A., Menten, J.F.; Naas, I.A. Produção de frangos de corte. 2ª Ed. Campinas: FACTA, p.300-319, 2014.
- Manafi, M.; Khalaji, S.; Hedayati, M.; Pirany, N. Efficacy of *Bacillus subtilis* and bacitracin methylene disalicylate on growth performance, digestibility, blood metabolites, immunity, and intestinal microbiota after intramuscular inoculation with *Escherichia coli* in broilers. **Poultry Science**, v.96, n.5, p.1174–1183, 2017.
- Martins, B.B.; Mendes, A.A.; Martins, M.R.F.B.; Aguiar, E.F.; Alvarenga, B.O.; Lee, I.M. Efeito das diferentes vias de aplicação do probiótico sobre a integridade cecal em frangos de corte desafiados ou não com *Salmonella* Enteritidis. In: IV Congresso Sul Brasileiro de Avicultura, Suinocultura e Laticínios e Feira de equipamentos, serviços e inovação. 2014, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Federação das Indústrias do Estado do Rio Grande do Sul, 2014.
- Martins, B.B.; Mendes, A.A.; Martins, M.R.F.B.; Aguiar, E.F.; Alvarenga, B.O.; Lee, I.M. Eficácia de probiótico no desempenho, morfologia e integridade entérica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis. In: CONFERÊNCIA FACTA, 2015, Campinas. **Anais...** Facta: Campinas, 2015.

- Matias, T.D. Influência de probiótico sobre a saúde intestinal de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Heidelberg em diferentes tempos de jejum pós eclosão. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal de Goiás. p.73, 2016.
- Muniz, E.C. Salmonelas paratíficas em aves: avaliação da resposta imunológica e controle por meio de probióticos. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p.98, 2014.
- Oakley, B.B.; Buhr, R.F.; Ritz, C.W.; Kiepper, B.H.; Berrang, M.E.; Seall, B.S.; Cox, N.A. Successional changes in the chicken cecal microbiome during 42 days of growth are independent of organic acid feed additives. **BMC Veterinary Research**, v.10, p.282, 2014.
- OIE. Responsible and prudent use of antimicrobial agents in Veterinary Medicine. Terrestrial Animal Health Code. Chapter 6.9. 2017. Disponível em: www.oie.org.
- Oliveira, J.E.; Hoeven-Hangoor, E.; Linde, I.B.; Montijn, R. C.; Vossen, J. M. B. M. In ovo inoculation of chicken embryos with probiotic bacteria and its effect on posthatch *Salmonella* susceptibility, **Poultry Science**, v. 93, p. 818–829, 2014.
- Rahimi, S.; Grimes, J.L.; Fletcher, O.; Oviedo, E.; Sheldon, B.W. Effect of a direct-fed microbial (Primalac) on structure and ultrastructure of small intestine in turkey poults, **Poultry Science**, v. 88, p.491–503, 2009.
- Rocha, P.M.C.; Barros, M.E.G.; Evêncio-Neto, J. Análise morfométrica da parede intestinal e dinâmica de mucinas secretadas no jejuno de frangos suplementados com probiótico *Bacillus subtilis* cepa C3102. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v.36, n.4, p.312-316, 2016.
- Rostagno, H.S.; Albino, L.F.T.; Donzele, J.L.; Gomes, P.C.; Oliveira, R.F.; Lopes, D.C.; Ferreira, A.S.; Barreto, S.L.T.; Euclides, R.F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3. ed. Viçosa-MG: UFV, 252p, 2011.

- Shneitz, C.; Koivunen, E.; Tuunainen, P.; Valaja, J. The effects of a competitive exclusion product and two probiotics on *Salmonella* colonization and nutrient digestibility in broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, p.1-11. 2016.
- Silveira, M. Preparo de amostras biológicas para a Microscopia Eletrônica de Varredura. In: Souza, W. Técnicas básicas de Microscopia Eletrônica aplicada as Ciências Biológicas. Rio de Janeiro, p.33- 56, 1998.
- Statistical Analysis System. **SAS User's Guide**: Verson 9.2 Review Edition. SAS Institute Inc, Cary, NC, 2009.
- Sterzo, E.V. Morfologia dos cecos de pintos de corte submetidos ao tratamento com microbiota cecal antes e após infecção por *Salmonella enteritidis*. 2011. 98 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011.
- Teague, K. D.; Graham, L. E.; Dunn, J. R.; Cheng, H. H.; Anthony, N.; Latorre, J.D.; Menconi, A.; Wolfenden, R.E.; Wolfenden, A.D.; Mahaffey, B.D.; Baxter, M.; Hernandez-Velasco, X.; Merino-Guzman, R.; Bielke, L.R.; Hargis, B.M.; Tellez, G. *In ovo* evaluation of FloraMax[®]-B11 on Marek's disease HVT vaccine protective efficacy, hatchability, microbiota composition, morphometric analysis, and *Salmonella enteritidis* infection in broiler chickens. **Poultry Science**, v.96, p.2074–2082, 2017.
- Vineetha, P.G.; Tomar, S.; Saxena, V.K.; Kapgate, M.; Suvarna, A.; Adil, K. Effect of laboratory-isolated *Lactobacillus plantarum* LGFCP4 from gastrointestinal tract of guinea fowl on growth performance, carcass traits, intestinal histomorphometry and gastrointestinal microflora population in broiler chicken. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.101, p. e362–e370, 2017.
- Wang, X.; Farnell, Y. Z.; Peebles, E.D.; Kiess, A.S.; Wamsley, K.G.S.; Zhai, W. Effects of prebiotics, probiotics, and their combination on growth performance, small intestine morphology, and resident *Lactobacillus* of male broilers. **Poultry Science**, v.95, p.1332–1340, 2016.

Zhang, L.; Zhang, L.; Yang, C.; Zhan, X.; Zeng, X.; Zhou, L.; Cao, G.; Chen, An'guo. Effects of dietary supplementation of probiotic, *Clostridium butyricum*, on growth performance, immune response, intestinal barrier function, and digestive enzyme activity in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.7, n.3, 2016.

Zhen, W.; Shao, Y.; Gong, X.; Wu, Y.; Geng, Y.; Wang, Z.; Guo, Y. Effect of dietary *Bacillus coagulans* supplementation on growth performance and immune responses of broiler chickens challenged by *Salmonella* Enteritidis. **Poultry Science**, p.119, 2018.