

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**ERICH HELFER CARVALHO**

**PROBIÓTICOS DE CULTURAS DEFINIDAS E INDEFINIDAS NO CONTROLE DE  
*SALMONELLA ENTERITIDIS* EM FRANGOS DE CORTE**

**DISSERTAÇÃO**

**DOIS VIZINHOS**

**2012**

**ERICH HELFER CARVALHO**

**PROBIÓTICOS DE CULTURAS DEFINIDAS E INDEFINIDAS NO CONTROLE DE  
*SALMONELLA ENTERITIDIS* EM FRANGOS DE CORTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia - Área de Concentração: Produção e Nutrição Animal.

Orientação: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angélica Signor Mendes

Co-orientação: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sabrina Endo Takahashi

**DOIS VIZINHOS**

**2012**

C331p Carvalho, Erich Helfer.  
Probióticos de culturas definidas e indefinidas no controle de *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte / Erich Helfer Carvalho. – Dois Vizinhos : [s.n], 2012.

82 f.

Orientadora: Angélica Signor Mendes

Co-orientadora: Sabrina Endo Takahashi.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Dois Vizinhos, 2012.

Bibliografia: f. 69-76.

1. Aves-saúde. 2. Segurança alimentar. 3. Probióticos  
I.Mendes, Angélica Signor, orient. II.Takahashi, Sabrina Endo, co-orient, III.Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos. IV.Título

CDD: 636.50896



Ministério da Educação  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
Câmpus Dois Vizinhos  
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
**Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**



## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**Título da Dissertação nº 001**

**Probióticos de culturas definidas e indefinidas no controle de *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte**

por

**Erich Helfer Carvalho**

Dissertação apresentada às quatorze horas do dia dezoito de novembro de dois mil e doze, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, Linha de Pesquisa – Produção e Nutrição Animal, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (Área de Concentração: Produção animal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Banca examinadora:

---

**Dr. Angélica Signor Mendes**  
UTFPR

---

**Dr. Marta Helena Dias da Silveira**  
UTFPR

---

**Dr. Luiz Felipe Caron**  
UFPR

Visto da Coordenação:

---

**Prof. Dr. Luis Fernando G. de Menezes**  
Coordenador do PPGZO

\*A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

## AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos em primeiro lugar a Deus, a que devemos toda honra e toda glória, por abençoar as nossas obras e fazer resplandecer sob nós a divina luz.

A minha família: esposa Rita Tatiane Leão da Silva e filha Hellen Silva Carvalho pelo amor, carinho, incentivo e apoio em todos os momentos. Aos meus pais Eloi Carvalho e Judite Lurdes Helfer Carvalho, meus irmãos Klaus Helfer Carvalho e Denis Helfer Carvalho pelo apoio em toda a minha educação e trajetória acadêmica.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) campus Dois Vizinhos/PR em nome do Diretor Geral Prof. Dr. Sérgio Miguel Mazaro, Diretor de Pesquisa e Pós-Graduação Prof. Dr. Paulo Cesar Conceição e Coordenador do Mestrado em Zootecnia Prof. Dr. Luis Fernando Glasenapp de Menezes e demais colaboradores pelo mérito da aprovação do Mestrado em Zootecnia que iniciou suas atividades em 14 de março de 2011 e assim ter me proporcionado ser o primeiro Mestre em Zootecnia formado pela UTFPR campus Dois Vizinhos.

A todos os professores do Mestrado pela dedicação, em especial aos professores que se disponibilizaram dar aulas à noite para viabilizar a continuidade no programa dos alunos que trabalham nos horários normais de aulas. Em especial ao Prof. Dr. Vicente de Paula Macedo que viabilizou o primeiro contato com os demais professores e assim proporcionou-me o andamento no projeto do mestrado. A Prof. Dr. Sabrina Endo Takahashi e Prof. Valter Oshiro Vilela pelo apoio de serem meus primeiros orientadores e de terem aceitado a condução do projeto. Aos estagiários Fabio Gudoski, Douglas Vanderlei Bonamigo, Cleison de Souza e colega José Rodolfo pela ajuda na construção do aviário experimental e condução do experimento.

Ainda mais especial a professora, orientadora e amiga Dr. Angélica Signor Mendes pelo apoio, incentivo, conselhos e principalmente pela atitude e agilidade na conclusão de todas as atividades pertinentes ao programa, sendo que a parceria e amizade esta sedimentada na instituição através da formação de um grupo de pesquisa em Avicultura o LINAV (Laboratório de Inovações Avícolas) que iniciou suas atividades em 2012 e que terá um caminho de sucesso nos próximos anos.

Aos membros da banca avaliadora da dissertação Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>o</sup> Marta Helena Dias da Silveira e Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Luis Felipe Caron pelas considerações e sugestões de melhorias no trabalho.

A empresa TecSui – Produtos Agropecuários em nome de Evandro Carlos dos Santos e sua equipe pelo apoio nas instalações do aviário experimental da UTFPR.

A empresa Brasil Foods (BRF), na qual desenvolvo minhas atividades profissionais, em nome de meus amigos Ivomar Oldoni e Mario Sérgio Assayag Júnior os quais são os responsáveis pela viabilização do projeto desenvolvido e ao mesmo tempo colaboradores de meu desenvolvimento técnico e profissional. Priscilla Koerich, João Zuffo, Vinicius Tagliari e equipe Laboratório de Saúde Animal da BRF de Videira/SC.

A Unidade da BRF Dois Vizinhos: Gerências - Jairo Victor Favretto e Ronaldo Scariot; Fomento Agropecuário: Alessandra Appel, João Nelson Arruda, Gilvanio Biancato, Lourenço Sausen, Mateus Rossini, Elisandro Dias, Neimar Antonello, Júnior Mattei , Ademir da Rosa, Marcelo Mesacasa, Adilson Refatti, Jeferson Polasso , Alvadir Galon, Marcio da Rosa, Alir Pegorini, Alisson Gudoski; Fábrica de Rações: Erondi, Fábio Bratti, Ademir Girardi e equipe; Matrizes e Incubatório: Jonatas Wolf, Oltair Rodrigues, Elisandro Carvalho e equipe pela contribuição no experimento.

Em fim, a todos os demais amigos que de uma maneira ou de outra auxiliaram na conquista deste objetivo.

Todos que colaboraram para a conquista deste objetivo demonstram que não somos uma ilha e por isso necessitamos da ajuda das pessoas.

"Uma longa viagem começa com um passo".

Muito Obrigado!

CARVALHO, Erich Helfer. **Probióticos de Culturas Definidas e Indefinidas no Controle de *Salmonella* Enteritidis em Frangos de Corte**. 2012. 82 folhas. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2012.

## RESUMO

Uma preocupação mundial em saúde pública são as doenças transmitidas por alimentos. A Salmonelose figura como a segunda doença de transmissão alimentar mais frequente em países como Estados Unidos, Canadá e na Comunidade Europeia. No Brasil desde 1999 até 2011 a *Salmonella* é a principal bactéria causadora de doenças transmitidas por alimentos. A *Salmonella* é um bacilo Gram-negativo, não formador de esporos e devido diferenças bioquímicas subdividem-se em 2 espécies: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica* sendo que a última divide-se em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. A *Salmonella enterica enterica* sorovar Enteritidis é um dos principais sorovares encontrados em aves que está relacionado com Salmonelose em humanos. Nas últimas décadas a principal forma de controle de enfermidades bacterianas em granjas avícolas foi o uso de antimicrobianos. No entanto, o uso destas drogas como medida preventiva tem sido questionada uma vez que extensos relatos surgiram sobre a resistência aos antimicrobianos entre bactérias patogênicas. Desta forma, a proibição de diversos antibióticos na avicultura tem gerado a necessidade do desenvolvimento de novas formas de controle das infecções bacterianas e da melhora no desempenho zootécnico. Os probióticos têm sido propostos como candidatos a preencher esta lacuna. Probióticos foram definidos como aditivos compostos por microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro modulando o sistema imune. Os probióticos podem ser constituídos por culturas de microrganismos definidos ou culturas de microrganismos indefinidos. Porém, ainda não existem estudos que possam comprovar qual das constituições de probióticos é a mais eficaz no controle de *Salmonella*, o que requer maiores estudos em relação às diferentes constituições de probióticos disponíveis para utilização. Neste contexto o objetivo do presente estudo é abordar por meio de uma revisão bibliográfica a importância da *Salmonella* na saúde pública e os probióticos como relevante ferramenta de controle de Salmonelose. Um segundo objetivo é elaborar um capítulo com um artigo intitulado: “Probióticos de Culturas Definidas e Indefinidas no Controle de *Salmonella* Enteritidis em Frangos de Corte”.

Palavras-chave: Saúde das aves. Segurança Alimentar. Probióticos.

CARVALHO, Erich Helfer. **Probiotics Cultures Defined and Undefined in Control of *Salmonella* Enteritidis in Broilers**. 2012. 82 folhas. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2012.

## ABSTRACT

A global public health concern are diseases transmitted by food. Salmonellosis as the second figure of foodborne disease more common in countries like United States, Canada and the European Community. In Brazil since 1999 until 2011 the *Salmonella* bacterium is the leading cause of foodborne illness. *Salmonella* is a gram-negative, non-spore-forming and due to biochemical differences are divided into two species: *Salmonella bongori* and *Salmonella enterica* and the last divided into six subspecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* and *indica*. The *Salmonella enterica enterica* serovar Enteritidis is a major serotypes found in birds that are related to Salmonellosis in humans. In recent decades the main way to control bacterial diseases in poultry farms was the use of antimicrobials. However, the use of these drugs as a preventive measure has been questioned since extensive reports have appeared on the antimicrobial resistance among pathogenic bacteria. Thus, the prohibition of various antibiotics in poultry has raised the need to develop new ways to control bacterial infections and improves on the performance. Probiotics have been proposed as candidates to fill this gap. Probiotics have been defined as live microorganisms comprise additives which, when administered in adequate amounts, confer health benefits modulating the host's immune system. Probiotics may be constituted by cultures of microorganisms defined or undefined cultures of microorganisms. However, there are no studies to prove which of the constitutions of probiotics is most effective in controlling *Salmonella*, which requires further study in relation to the different constitutions of probiotics available for use. In this context, the objective of this study is to address through a literature review on the importance of public health *Salmonella* and probiotics as relevant control tool Salmonellosis. A second goal is to develop a chapter with an article titled: "Efficacy of a Probiotics Cultures Defined and Undefined in Control of *Salmonella* Enteritidis in Broilers".

Keywords: Bird Health. Food Safety. Probiotics.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rotas de infecção por <i>Salmonella</i> enterica, barreiras do hospedeiro e os mecanismos de defesa imunológica em vários tecidos.....	23
---	----

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

- Tabela 1 - Médias e desvio padrão de peso corporal (g) de frangos de corte nas diferentes idades submetidos aos tratamentos experimentais.....77
- Tabela 2 - Média e desvio padrão de conversão alimentar e mortalidade no período de 1 a 31 dias de idade nos diferentes tratamentos.....78
- Tabela 3 - Número de amostras positivas em relação ao total de amostras analisadas (positivas/total (% positividade)) para *Salmonella* Enteritidis em *pool* de íleo, tonsilas cecais e cecos e *pool* de coração, fígado e baço aos 5 dias e 31 dias de idade e *swabs* de cama aos 12 dias de idade nos diferentes tratamentos.....79
- Tabela 4 - Média e desvio padrão da contagem de células de *Salmonella* Enteritidis (NMP/g) em *pool* de íleo, tonsilas cecais e cecos e *pool* de coração, fígado e baço aos 5 dias e 31 dias de idade nos diferentes tratamentos.....80
- Tabela 5 - Comparação das médias da contagem de *Salmonella* Enteritidis, pelo método do Número mais Provável de células bacterianas por grama (NMP/g), em *pool* de íleo, tonsilas cecais e cecos aos 5 dias e 31 dias de idade entre os tratamentos sem probióticos (T1), probióticos de flora definida (T2 + T3) e probióticos de flora indefinida (T4 + T5).....81

## LISTA DE SIGLAS

AFLP	Polimorfismo
BHI	Infusão Cérebro Coração ( <i>Brain Heart Infusion</i> )
DNA	Desoxirribonucleico
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
FT – 4	Fagotipo 4
FT – 8	Fagotipo 8
FT – 13	Fagotipo 13a
GALT	Tecido Linfóide Associado ao Intestino
H <sub>2</sub> S	Ácido Sulfídrico
IgA	Imunoglobulina A
LIA	Ágar Lisina-ferro ( <i>Lysine Iron Agar</i> )
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPA	Ministério da Agricultura e Abastecimento
MSRV	Meio Semi-sólido modificado <i>Rapapport Vassiliadis</i>
PNSA	Plano Nacional de Sanidade Avícola
PRP	Programa de Redução de Patógenos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Eletroforese em campo pulsado
rRNA	Ácido Ribonucleico ribossômico
SIM	Meio Sulfeto Indol Motilidade ( <i>Sulphur Indol Motility</i> )
SPI 1	Ilha de Patogenicidade 1
SPI 2	ilha de Patogenicidade 2
TGI	Tratogastrointestinal
TSI	Ágar Tríplice de açúcar e ferro
UFC	Unidade Formadora de Colônias
XLD	Xilose ágar desoxicolato

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	13
2.1 <i>SALMONELLA</i> : CARACTERÍSTICAS GERAIS .....	13
2.2 EPIDEMIOLOGIA E IMPORTÂNCIA DA <i>SALMONELLA</i> EM SAÚDE PÚBLICA .....	15
2.3 <i>SALMONELLA</i> ENTERITIDIS .....	17
2.4 PATOGÊNESE DA INFECÇÃO E FATORES DE VIRULÊNCIA .....	18
2.5 HOMEOSTASE INTESTINAL EM AVES .....	20
2.6 IMUNIDADE INTESTINAL DAS AVES .....	22
2.7 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE <i>SALMONELLA</i> .....	25
2.8 CONTROLE DE <i>SALMONELLA</i> EM FRANGOS DE CORTE .....	26
2.8.1 Probióticos .....	30
REFERÊNCIAS .....	35
CAPÍTULO 1.....	50
PROBIÓTICOS DE CULTURAS DEFINIDAS E INDEFINIDAS NO CONTROLE DE <i>SALMONELLA</i> ENTERITIDIS EM FRANGOS DE CORTE .....	50
RESUMO .....	51
INTRODUÇÃO .....	52
MATERIAL E MÉTODOS .....	53
Animais, Ambiente e Dieta do Experimento.....	53
Delineamento Experimental.....	54
Preparação do inóculo de <i>Salmonella</i> Enteritidis e desafio das aves .....	55
Desempenho zootécnico.....	55
Análises Microbiológicas .....	56
Contagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis .....	56
Isolamento de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	57
Análise Estatística .....	58
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
Desempenho Zootécnico .....	58
Isolamento de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	60
Contagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis .....	63

Comparação das diferentes composições de probióticos: cultura definida <i>versus</i> cultura indefinida .....	67
CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS .....	69
TABELAS .....	77

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Uma preocupação mundial em saúde pública são as doenças transmitidas por alimentos. Nas últimas décadas ocorreu um aumento de sua ocorrência em muitas partes do mundo. O risco da disseminação destas doenças pode estar vinculado pela adaptação microbiana, mudanças nos sistemas de produção de alimentos, hábitos alimentares da população, sistemas de produção animal, processos produtivos e tecnologia de alimentos, globalização no comércio internacional, aumento das populações susceptíveis, mudanças no estilo de vida e comportamento, demandas dos consumidores, assim como mudanças na demografia humana (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2007).

A Salmonelose figura como a segunda doença de transmissão alimentar mais frequente em países como Estados Unidos, Canadá e na Comunidade Europeia, onde é apontada como causa de aproximadamente 14% dos surtos ocorridos em 2010 (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2012). No Brasil desde 1999 até 2011, dados do Ministério da Saúde apontam a *Salmonella* como a principal bactéria causadora de doenças transmitidas por alimentos no Brasil (BRASIL, 2011).

O termo “Salmonelose” é usado para indicar a infecção causada por bactérias do gênero *Salmonella* da família Enterobacteriaceae. A *Salmonella* é um bacilo Gram-negativo, não formador de esporos e devido diferenças bioquímicas subdividem-se em 2 espécies: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica* sendo que a última divide-se em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (BACK; ISHIZUKA, 2010). A *Salmonella enterica enterica* sorovar Enteritidis e a *Salmonella enterica enterica* sorovar Thyphimurium são os principais sorotipos encontrados em aves que estão relacionados com Salmoneloses em humanos (BORSOI et al., 2011).

As aves são os maiores reservatórios de *Salmonella* spp. existentes. As *Salmonellas* são frequentemente relatadas em aves e seus subprodutos, particularmente devido ao sistema de produção em confinamento ao qual são submetidas e aos programas nacionais para isolamento e identificação de *Salmonella* spp. (YAO et al., 2011).

O consumo de alimentos contaminados por esta bactéria pode causar uma gastroenterite que provoca dores abdominais, vômito, diarreia, e é especialmente prejudicial aos grupos considerados de risco (crianças, idosos, grávidas e imunodeprimidos), podendo gerar quadros mais complicados e causar a morte do paciente. As toxinfecções alimentares em seres humanos estão relacionadas ao consumo de carne de frango e ovos contaminados (ROSSI JÚNIOR et al., 2009), sendo a carne de frango o alimento de maior enfoque na

aplicação de programas de prevenção e controle aplicados por governos em todo o mundo visando a redução de casos em humanos (MEAD et al., 2010).

Nas últimas décadas a principal forma de controle de enfermidades bacterianas foi o uso de antimicrobianos. No entanto, o uso destas drogas como medida preventiva tem sido questionada uma vez que extensos relatos surgiram sobre a resistência aos antimicrobianos entre bactérias patogênicas (PARRY, 2003). Alguns antibióticos podem facilitar a colonização, aumentar a excreção e prolongar a disseminação de *Salmonella* spp. Desta forma, a proibição de diversos antibióticos na avicultura tem gerado a necessidade do desenvolvimento de novas formas de controle das infecções bacterianas (COX; PAVIC, 2010).

Neste contexto, os probióticos têm sido propostos como candidatos a preencher esta lacuna (KABIR, 2009). Probióticos foram definidos como aditivos compostos por microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro modulando o sistema imune (GAGGÍA, 2010).

Na alimentação das aves, as espécies que pertencem aos probióticos possuem um efeito benéfico sobre o desempenho zootécnico, a modulação da microbiota intestinal e inibição do patógeno, alterações histológicas intestinais, imunomodulação, parâmetros hematológicos e bioquímicos e as características sensoriais da carne de frango (KABIR, 2009).

Neste contexto o objetivo do presente estudo é abordar, por meio de uma revisão bibliográfica, a importância da *Salmonella* na saúde pública e os probióticos como relevante ferramenta de controle de Salmonelose. Um segundo objetivo é elaborar um capítulo com um artigo intitulado: “Probióticos de Culturas Definidas e Indefinidas no Controle de *Salmonella* Enteritidis em Frangos de Corte”.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 SALMONELLA: CARACTERÍSTICAS GERAIS**

*Salmonella* é um bacilo Gram negativo, aeróbio ou anaeróbio facultativo, não formador de esporos, oxidase positivo, catalase negativo, fermenta açúcares com produção de gás, produção de H<sub>2</sub>S, comporta-se como patógeno intracelular facultativo e é normalmente móvel com flagelos peritríqueos, exceto para *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Gallinarum

que são imóveis (FORSHELL; WIERUP, 2006). O gênero *Salmonella* consiste de apenas duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *Salmonella enterica* é dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (GRIMONT; WEILL, 2007).

Em cada subespécie são reconhecidos diferentes sorovares totalizando na atualidade 2.610, segundo o esquema clássico de Kauffman-White, com base na caracterização de seus antígenos H (flagelares), O (somático) e ocasionalmente Vi (capsular). A distribuição de acordo com as espécies e subespécies é como se segue: *Salmonella enterica* subespécie *enterica* (1.547 sorovares); *Salmonella enterica* subespécie *salamae* (513 sorovares); *Salmonella enterica* subespécie *arizonae* (100 sorovares); *Salmonella enterica* subespécie *diarizonae* (341 sorovares); *Salmonella enterica* subespécie *houtenae* (73 sorovares); *Salmonella enterica* subespécie *Indica* (13 sorovares); *Salmonella bongori* (23 sorovares); os quais não reconhecem a espécie proposta *Salmonella subterranea* tendo sido a mesma inserida como sorovar da espécie *bongori* (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

Dentro da espécie *Salmonella enterica* subespécie *enterica* se destacam os sorovares Gallinarum, Pullorum, Enteritidis e Typhimurium. Estes sorovares são monitorados pelo Plano Nacional de Sanidade Avícola - PNSA através da instrução normativa nº 78 de 03 de novembro de 2003 (BRASIL, 2003), que foca o agente em matrizes de frango de corte e o Programa de Redução de Patógenos (PRP) que foi instituído pela Instrução Normativa nº 70 de 06 de outubro de 2003 (BRASIL, 2003), que foca nos frigoríficos, sendo que os sorovares Enteritidis e Typhimurium são os isolados relacionados com maior frequência em produtos avícolas e em casos de infecções alimentares (FLORES; VIVIAN; LOVATO, 2010). Apesar da introdução do PRP brasileiro em 2003, a literatura continua registrando a detecção de *Salmonella* num elevado número de carcaças no comércio varejista (CARVALHO & CORTEZ, 2008).

A doença causada por *Salmonella* é genericamente chamada de Salmonelose (DOYLE, 1990). O *habitat* natural das *Salmonellas* pode ser dividido em três categorias com base na especificidade do hospedeiro e padrão clínico por ele determinado: altamente adaptadas ao homem incluindo *Salmonella Typhi* e *Salmonella Paratyphi A, B e C*, agentes da febre entérica; altamente adaptadas aos animais, *Salmonella Dublin* (bovinos), *Salmonella Choleraesuis* e *Salmonella Typhisuis* (suínos), *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum* (aves), responsáveis pelo paratifo animal. A terceira categoria inclui a maioria dos sorovares que atingem o homem e animais, designadas *Salmonellas* zoonóticas, responsáveis por doenças de transmissão alimentar, de distribuição mundial, sendo detectadas na maioria das



espécies animais utilizados para consumo humano, além de animais silvestres e domésticos (RODRIGUES, 2011).

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA E IMPORTÂNCIA DA *SALMONELLA* EM SAÚDE PÚBLICA

O crescimento do comércio internacional aumentou a disseminação de agentes patogênicos e contaminantes nos alimentos. Hoje em dia, o mundo está inter-relacionado e interdependente. Assim, surtos de doenças transmitidas por alimentos têm se tornado uma ameaça potencial para o mundo inteiro. (TAUXE et al., 2010).

Um novo conceito, "*One World, One Health*" ("Um Mundo, Uma Saúde"), apareceu recentemente, indicando que o mundo despertou para a ligação entre as doenças animais e à saúde pública. Pois 60% das doenças infecciosas humanas conhecidas têm a sua origem em animais (quer sejam domésticos ou selvagens), assim como 75% das doenças humanas emergentes e 80% dos agentes patogênicos que podem potencialmente ser usados no bioterrorismo. Também as populações humanas necessitam de uma dieta regular de proteína de leite, ovos ou de carne, e que uma deficiência pode ser também um problema de saúde pública. Algumas estimativas sugerem que a produção mundial de alimentos de origem animal é reduzida em mais de 20% devido à alguma doença nos plantéis de animais, o que significa que até mesmo doenças de animais que não são transmissíveis ao homem podem levar a sérios problemas de saúde pública devido à escassez de alimentos de origem animal. Este conceito deve ser traduzido como um novo paradigma a nível internacional, sendo trabalhado pelas organizações mundiais como *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), *World Health Organization* (WHO), *World Organization for Animal Health* (OIE), *World Bank* (WB) e a *United Nations Children's Fund* (UNICEF), e a nível nacional o que deverá resultar em uma política sustentável para a prevenção da saúde pública e das doenças animais de impacto na interface humano-animal (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2012).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) *Salmonella* é o agente bacteriano mais frequentemente envolvido em casos de doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo. O agente é normalmente transmitido ao homem por meio de alimentos de origem animal, como carne, ovos e leite (NASCIMENTO et al., 2012).

Um grande número de mortes humanas é causado por bactérias do gênero *Salmonella*, particularmente nos países em desenvolvimento. Sorovares tifóides matam em

torno de 244.000 pessoas a cada ano (CRUMP et al., 2004), e sorovares não tifóides matam em torno de 155.000 pessoas a cada ano (MAJOWICZ et al., 2010). O número de casos de Salmonelose em humanos nos Estados Unidos continua em torno de 17,6 para cada 100.000 pessoas, uma taxa que é tão alta hoje como era há uma década (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2011). Metade dos recentes surtos de doenças de origem alimentar na Inglaterra foi causado por *Salmonella enterica*, mais do que qualquer outro agente patogênico (GORMLEY et al., 2011).

De acordo com dados do Ministério da Saúde do Brasil, 7.234 surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) foram registrados entre 1999 e 2011, e *Salmonella* spp. foi associada com 43% dos casos em que o agente etiológico foi identificado, com 1.660 casos confirmados. A carne, processados e miúdos de frango representam 6% e ovos e produtos a base de ovos representam 26% do total de surtos de DTA (BRASIL, 2012).

Historicamente *Salmonella* Typhimurium foi o agente mais comum da doença de origem alimentar nos seres humanos, embora nas últimas décadas *Salmonella* Enteritidis tenha sido mais frequentemente envolvida em surtos de Salmonelose (KOTTWITZ et al., 2010). Há uma preocupação crescente sobre as infecções humanas causadas por outros sorovares como Infantis, Agona, Hadar, Heidelberg e Virchow (FREITAS NETO et al., 2010).

Na União Europeia *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Hadar e *Salmonella* Virchow são consideradas pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar os sorovares mais importantes em termos de saúde pública (EUROPEAN FOOD SAFETY AGENCY, 2007). No Japão, entre 1999 e 2002, 32% dos casos de infecção de origem alimentar foram devido à *Salmonella*, com Typhimurium, Enteritidis e Infantis como os sorovares predominantes. Na Argentina segundo dados do Laboratório Nacional de Referência de Enterobactérias do Instituto Carlos G. Malbrán, a partir do ano 2000 em diante, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Infantis e *Salmonella* Agona estiveram entre os primeiros 10 sorovares mais frequentemente isolados em seres humanos, estando além disso *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Thompson implicadas em surtos humanos de doenças transmitidas por alimentos procedentes de diversas origens (CAFFER et al., 2010).

Nos Estados Unidos os sorovares mais frequentemente isolados de fontes humanas foram *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Newport, *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Javiana (CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION, 2007).

No Brasil atualmente os sorovares mais incidentes em carcaças de frangos são *Salmonella* Enteritidis (9.86%), *Salmonella* Minnesota (9.38%), *Salmonella* Agona (8.41%), *Salmonella* Infantis (5.77%), *Salmonella* Typhimurium (5.53%) e *Salmonella* Mbandaka (5.05%) (FREITAS, 2011).

Mesmo com a crescente preocupação com os patógenos emergentes nos últimos anos, a *Salmonella* continua sendo a principal causa de infecção alimentar no mundo. Segundo o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), a Salmonelose é responsável por, pelo menos, 1,4 milhão de doentes, 15.000 hospitalizações e 400 mortes por ano nos Estados Unidos (GAST, 2008).

Dentre os fatores, sozinhos ou associados, que contribuem para os surtos de salmonelose humana, destacam-se o tempo muito longo entre preparo e consumo, conservação inadequada pelo frio, matéria prima contaminada, manipuladores contaminados, processamento térmico inadequado, equipamentos contaminados, contaminação cruzada, reaquecimento inadequado, alimento tóxico e contaminação química (AMSON; HARACEMIV; MASSON, 2006). Do total de 7 surtos de toxinfecção investigados durante 13 meses, em municípios do estado de São Paulo 85,7% ocorreram em residências e, a contaminação dos alimentos/preparações, nas etapas de manipulação e preparação, principalmente. Os fatores que contribuíram para a ocorrência dos surtos foram armazenamento sob temperatura inadequada (71,4%), tratamento térmico inadequado (28,6%), contaminação cruzada (28,6%), contaminação originada pelo manipulador (28,6%), desinfecção inadequada de alimentos consumidos in natura (14,3%) e consumo de alimentos crus contaminados (14,3%) (BARRETTO; STURION, 2010).

### 2.3 *SALMONELLA* ENTERITIDIS

A *Salmonella* Enteritidis emergiu como um grande problema avícola e de saúde pública no Brasil a partir de 1993. Os estudos epidemiológicos, incluindo a fagotipagem e sonda complementar de rRNA, sugerem a entrada do sorovar Enteritidis no Brasil via importação de material genético avícola contaminado, provavelmente no final da década de 80, com a hipótese de que as primeiras cepas foram introduzidas dos Estados Unidos e rapidamente seguidas por cepas europeias. As taxas de crescimento da avicultura brasileira na década de 90 criaram condições favoráveis para a manutenção e proliferação da bactéria nos plantéis avícolas (SILVA; DUARTE, 2002).

A fagotipagem de cepas de *Salmonella* Enteritidis, utilizando padrões de lise obtidos com um conjunto definido de bacteriófagos, tem sido avaliada como potencial marcador epidemiológico. Estudo epidemiológico utilizando a fagotipagem feito com as cepas de *Salmonella* Enteritidis identificadas pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo mostrou que, até 1992, elas eram predominantemente pertencentes ao Fagotipo 8 (FT-8). Nos anos seguintes, 1993 a 1995, as amostras passaram a ser quase que exclusivamente do Fagotipo 4 (FT- 4) , sendo que FT- 4 predominava nos países europeus e o FT-8 e FT-13a nos Estados Unidos (IRINO et al., 1996).

O isolamento de *Salmonella* Enteritidis, seja em humanos ou em aves, aumentou sensivelmente atingindo índices superiores a 50% das ocorrências em muitos países (ANDREATTI FILHO, 2006).

Mesmo após alguns anos da normatização pelo Ministério da Agricultura do Brasil da utilização de vacinas em matrizes, ou seja, vacina inativada somente contra *Salmonella* Enteritidis, este sorovar continua sendo o mais prevalente no Brasil. De 2004 a 2010 a *Salmonella* Enteritidis foi o sorovar mais prevalente, representando 42% do total dos sorovares identificados em carne de frango (FREITAS, 2011).

A globalização, a abertura econômica e o crescimento da indústria avícola incrementaram o consumo e distribuição do frango, ovos e seus subprodutos e, portanto, também aumentou o risco de transmissão da Salmonelose produzida pela *Salmonella* Enteritidis, por isso, o controle desta zoonose adquire cada vez maior importância (SAGPyA, 2009).

#### 2.4 PATOGÊNESE DA INFECÇÃO E FATORES DE VIRULÊNCIA

Os eventos envolvidos na patogênese da salmonelose aviária são determinados por diversos fatores. A habilidade da bactéria em colonizar o trato gastrointestinal (TGI) parece estar relacionada com a imunidade inata da espécie hospedeira e a diversidade de genes de virulência codificados pelo patógeno (BARROW et al., 1994). Os quadros septicêmicos atribuídos a *Salmonella* estão intimamente relacionados aos efeitos da endotoxina (lipopolissacarídeo, LPS) liberada da membrana externa bacteriana. As infecções causadas por *Salmonella* apresentam uma patogênese complexa. O primeiro passo no processo da doença é a transmissão da bactéria para um hospedeiro suscetível, que ocorre geralmente, pela ingestão do micro-organismo, que atravessa o trato alimentar (KAUFMANN, 2001).

A patogenia da enterite por *Salmonella* pode ser dividida em 3 fases: a colonização

intestinal, a invasão do epitélio intestinal e a diarreia ou estímulo à exsoração de fluidos.

Na colonização intestinal após a infecção oral, as células bacterianas podem interagir com a superfície da mucosa, alcançar a lâmina própria, camada na qual as células epiteliais estão ancoradas, constituindo o primeiro passo para se estabelecer a infecção, pois é o local do organismo onde se proliferam (VAN IMMENSEEL et al., 2005). Após isso, os organismos invadem rapidamente os tecidos dos hospedeiros, através do tecido linfóide, inclusive as placas de Peyer e os enterócitos da mucosa intestinal. O primeiro passo para o desencadeamento da infecção é a aderência da *Salmonella* na mucosa intestinal.

Na invasão do epitélio intestinal os processos de aderência são fundamentais para o estabelecimento das infecções. Antes de invadir qualquer tipo de célula, as bactérias devem encontrar e aderir a um ou mais tipos de células do intestino. A adesão física foi sugerida como um mecanismo de colonização intestinal (SOEJARDI et al., 1982). Depois da invasão da *Salmonella* no epitélio intestinal, esta passa a se multiplicar intracelularmente e devido à inflamação da parede intestinal, macrófagos migram dos vasos sanguíneos para a lâmina própria. Leucócitos realizam a fagocitose. Posteriormente, os macrófagos retornam ao vaso sanguíneo e disseminam a bactéria pelos órgãos internos, estabelecendo um quadro de infecção sistêmica, decorrente da hiperatividade do sistema retículoendotelial (VAN IMMENSEEL et al., 2005).

O processo de internalização é mediado por um grupo de genes designados *inv* que são altamente conservados em *Salmonella* (DARWIN; MILLER, 1999). Os genes necessários para o fenótipo de invasão estão agrupados em uma região definida do cromossoma denominada ilhas de patogenicidade (SCHMIDT; HENSEL, 2004).

As ilhas de patogenicidade mais bem descritas e estudadas são SPI-1 e SPI-2, são as mais importantes para a virulência de *Salmonella* Enteritidis em galinhas, resultando em aumento significativo na colonização do fígado e baço por este sorovar (RYCHLIK et al., 2009). A SPI-1 está presente em *Salmonella bongori* e em todos os sorovares de *Salmonella enterica* analisados, sua principal função é conferir uma maior capacidade de invasão da célula hospedeira pela bactéria, visto que possui mais de 25 genes associados à invasão (HENSEL, 2004). A SPI-2 é composta por duas diferentes porções, uma delas presente apenas nos sorovares de *Salmonella enterica* e outra comum às espécies *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, é essencial para a infecção sistêmica e sobrevivência da bactéria dentro dos macrófagos (VIEIRA, 2009).

A resposta inflamatória na mucosa intestinal é importante fator no extravasamento de fluido intestinal. Prostaglandinas são liberadas como resultado a essa resposta ativa a

adenilatociclase que resulta na grande secreção de água, bicarbonatos e cloretos no lúmen intestinal. A resposta inflamatória também dispara a liberação de substâncias vaso ativas que, por sua vez, aumentam a permeabilidade dos vasos da mucosa intestinal levando-os a exsoração de fluído (TOZETTO, 2006). A invasão da mucosa é necessária, mas não suficiente para o acúmulo de líquido para causar a diarreia. É possível que enterotoxinas sejam responsáveis ou contribuam para a diarreia associada com *Salmonella* (DARWIN; MILLER, 1999).

Os microrganismos patogênicos se distinguem de outros da mesma espécie por possuírem e expressarem genes que codificam os fatores de virulência (VIEIRA et al., 2009), que conferem à bactéria a habilidade de causar doença no seu hospedeiro (VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005). Estes fatores de virulência propiciam a invasão e colonização das células do hospedeiro pelo microrganismo, levando à ocorrência de uma série de eventos que levam ao aparecimento da doença. Estes fatores podem ser mecanismos de invasão, que interfiram na resposta imune do hospedeiro ou mecanismos de resistência a antimicrobianos (VIEIRA et al, 2009). Os fatores de virulência podem estar localizados no próprio cromossomo da bactéria, como nas Ilhas de Patogenicidade, ou em elementos genéticos transmissíveis, como transposons, plasmídeos e bacteriófagos (VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005).

Os fatores de virulência estão envolvidos na adesão, invasão, citotoxicidade e persistência intracelular. Estruturas como flagelos, fímbrias, ilhas de patogenicidade, plasmídeos, lipopolissacarídeos da membrana externa estão sendo caracterizados como importantes fatores de virulência (MCGHIE et al., 2009).

## 2.5 HOMEOSTASE INTESTINAL EM AVES

Homeostase intestinal pode ser definida como a habilidade do intestino defender-se e prevenir-se da colonização de agentes patogênicos, ou ainda, como equilíbrio dinâmico entre a mucosa intestinal e o conteúdo luminal e preservação das características estruturais e funcionais da mucosa dentro dos padrões esperados para o tipo, espécie e linhagem de ave, para uma determinada fase de seu ciclo de vida (THOMPSON; APPLGATE; 2006).

O conceito de equilíbrio intestinal é um estado de plena integridade anatômica, adequada relação microbiológica e atividades fisiológicas e funcionais. A ausência de qualquer transtorno digestivo, indicativo da relação harmônica entre a microbiota dita benéfica e a patogênica do hospedeiro. Numa outra visão, este quadro encontra-se estabelecido quando dois processos citológicos estão ocorrendo simultaneamente sem

desvios: a renovação celular (proliferação e diferenciação), resultante das divisões mitóticas das células localizadas na cripta e ao longo dos vilos; e a perda de células (extrusão), que ocorre no ápice dos vilos. O balanço entre estes dois processos determina o *turnover* constante (síntese-migração-extrusão) que define o equilíbrio intestinal (SILVA, 2011).

Durante o desenvolvimento embrionário do pinto não há qualquer microbiota natural intestinal, que se forma a partir da ingestão de microrganismos durante o processo de nascimento, aumentando nas primeiras semanas de vida até se tornar uma população predominantemente de bactérias anaeróbicas. Alguns gêneros e espécies bacterianos que colonizam inicialmente o trato intestinal, geralmente persistem ao longo de toda a vida das aves, passando a compor a microbiota intestinal residente (PALERMO-NETO et al., 2005).

O número e a composição da microbiota intestinal em aves variam consideravelmente ao longo do trato gastrointestinal. O ceco é conhecido como o segmento de maior colonização de microrganismos, estando presente um grande número de bactérias Gram positivas e negativas. O processo de aderência das bactérias no intestino é realizado através de fímbrias. Considerando-se que os enterócitos no intestino delgado apresentam seu glicocálix composto por polissacarídeos, a colonização das bactérias nos diferentes segmentos esta na interação da fímbria de uma bactéria com o glicocálix do enterócito (MAIORKA, 2004).

O ceco é conhecido como reservatório de *Salmonella*, porém o íleo tem interesse particular por sua proximidade ao ceco, albergando grande população microbiota e também como porção do intestino frequentemente colonizada por *Salmonella* (THOMPSON; APPLGATE; 2006).

As projeções da mucosa intestinal denominadas vilosidades, são compostas por três tipos de células funcionalmente distintas: enterócitos, células caliciformes e células enteroendócrinas. Os enterócitos são células que respondem pela digestão final do alimento e pelo transporte trans-epitelial dos nutrientes. As células caliciformes são secretoras de glicoproteínas, que têm a função de proteger o epitélio intestinal contra ação de enzimas digestivas e efeitos abrasivos da digesta. As células enteroendócrinas, por sua vez, são produtoras de hormônios peptídicos (gastrina, secretina e colecistoquinina) e monoaminas biogênicas que participam na regulação da digestão, absorção e utilização dos nutrientes (MAIORKA, 2004).

O principal desafio da produção avícola hoje se refere à busca de um equilíbrio entre a microbiota intestinal e o hospedeiro. Esse equilíbrio baseia-se na presença de microrganismos benéficos ao animal e que não façam competição com o hospedeiro por nutrientes ou estejam envolvidos em toxinfecção em seres humanos (PICKLER et al., 2011).

Os acidificantes e os probióticos atuam no equilíbrio da microbiota intestinal diretamente e conseqüentemente na manutenção da homeostase intestinal. Os acidificantes possuem efeito bacteriostático ou bactericida sobre microrganismos prejudiciais, enquanto estimulam o crescimento de microrganismos benéficos como Lactobacilos e Bifidobactérias. Os probióticos são exatamente culturas vivas destes organismos benéficos, que são ministradas para promover uma colonização benéfica e excluir os agentes patogênicos (JÚNIOR, 2009).

## 2.6 IMUNIDADE INTESTINAL DAS AVES

O sistema imune pode ser separado em inato e adaptativo, que trabalham juntos no combate e eliminação dos possíveis agentes patogênicos. Geralmente a ativação do sistema imune diminui o desempenho das aves modernas e para maximizar a eficiência produtiva ele deve ser mantido vigilante e ativado apenas quando requerido. Uma vez ativado, a resolução rápida ou transição rápida do inato para o adaptativo é desejável para minimizar as perdas de produtividade (KORVER, 2006).

A maioria dos agentes invadem os animais através das mucosas. Têm sido amplamente demonstrado que a presença de anticorpos protetores nas superfícies mucosas protege o animal da entrada de microrganismos (OUWENHAND et al.,1999).

A figura 1 demonstra as rotas de infecção por *Salmonella* enterica, as barreiras do hospedeiro e os mecanismos de defesa imunológica em vários tecidos, onde após a ingestão, a *Salmonella* pode entrar no hospedeiro por invasão mediada-SPI1-T3SS de células não-fagocíticas, por absorção através de células M, nas placas de Peyer, ou por fagocitose pelas células dendríticas do lúmen intestinal. A subsequente disseminação do tecido linfático intestinal para outros órgãos linfáticos pode envolver o transporte pelas células imunes. Células dendríticas que internalizam, mas não conseguem eliminar a *Salmonella* são consideradas como “cavalos de Tróia” para a disseminação sistêmica do patógeno. Dentro de outros tecidos linfóides, tais como os nódulos linfáticos mesentéricos a *Salmonella* é encontrada intracelular e a sobrevivência e a replicação dentro das células hospedeiras é dependente da função de SPI2. Os mecanismos e potenciais veículos celulares para a disseminação para outros órgãos do hospedeiro infectado não são totalmente compreendidos e precisam de mais investigação.



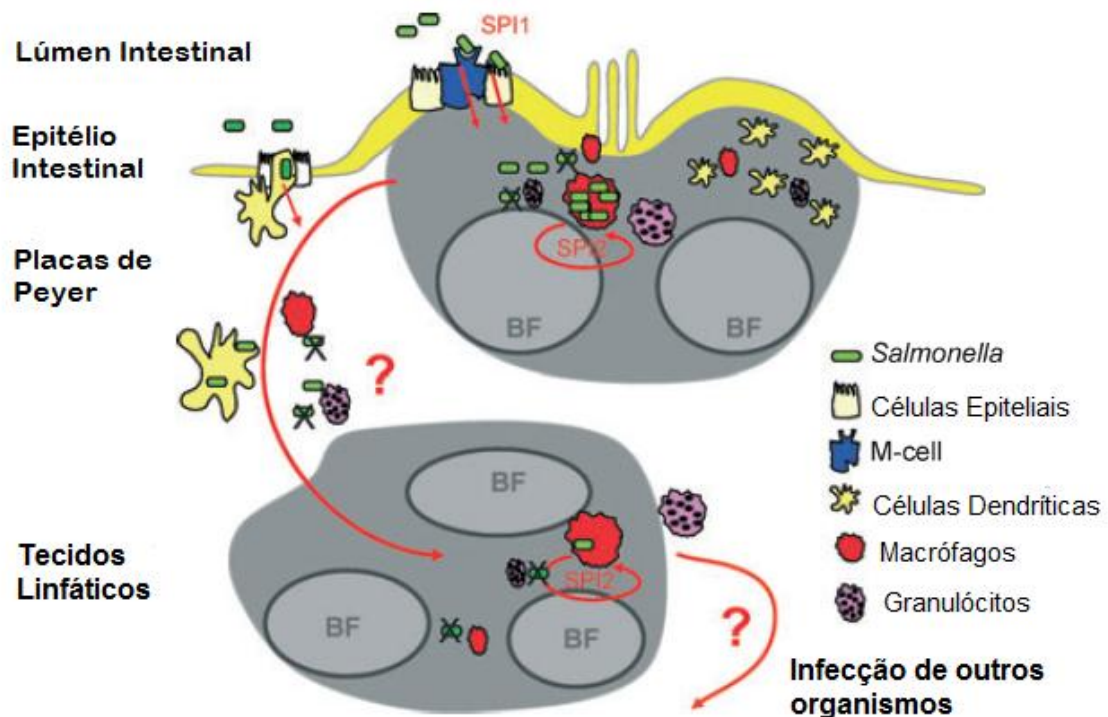


Figura 1 - Rotas de infecção por *Salmonella enterica*, barreiras do hospedeiro e os mecanismos de defesa imunológica em vários tecidos.

Fonte: Adaptado de Jantsch; Chikkaballi, Hensel (2011).

O mecanismo de defesa associado à mucosa intestinal é mediado pela IgA secretora (SIgA) (MUIR et al., 2000). Nas mucosas, o sistema imune pode agir por três mecanismos: a) “exclusão imune”, um termo utilizado para definir uma proteção não inflamatória de superfície em colaboração com os fatores de defesa inatos; b) regulação imune, com participação de células apresentadoras de antígeno (APC), ativação de linfócitos T e B, liberação de citocinas e c) eliminação pelo sistema imune, que envolve a estimulação de mediadores e células de defesa inata, assim como, a produção de imunoglobulinas (BRANDTZAEG et al., 1999).

As aves aumentam a concentração de células produtoras de imunoglobulinas no intestino com o aumento da idade, resposta à colonização do trato gastrointestinal, como resultado da atividade mitogênica dos lipopolissacarídeos bacterianos (PARRY et al., 1977). Isto pode também contribuir para o estabelecimento de infecção por *Salmonella* spp., devido à colonização lenta pela microbiota (NURMI; RANTALA, 1973; NURMI et al., 1992). A microbiota normal é importante para a estimulação precoce e o amadurecimento do sistema imune intestinal. Estas bactérias nativas modulam a resposta imune pelo aumento ou

diminuição de mediadores secretados pelas células imunocompetentes associadas com o intestino e pela estimulação de linfócitos T auxiliares e supressores (WEIR; BLACKWELL, 1983).

Alternativamente, os antígenos podem mover-se através ou entre os enterócitos (MADARA, 1997) ou pelas áreas especializadas do epitélio associado ao folículo, chamadas células M (JEURISSEN et al., 1999), que nas aves estão infiltradas com linfócitos e localizadas nas placas de Peyer e divertículo de Meckel.

A imunidade gerada nas mucosas é um fator importante no sistema imune, pois pode refletir na imunidade, em outros tecidos ou sistemas fisiológicos do organismo, contra agentes infecciosos.

O intestino possui o Tecido Linfóide Associado ao Intestino (GALT) que comporta grande parte de nossas células de defesa, é um importante regulador do crescimento bacteriano da luz intestinal, podendo impedir a adesão das bactérias na mucosa e diminuir a possibilidade de crescimento. As células de defesa da lamina própria controlam aqueles microrganismos que conseguiram romper a barreira epitelial, impedindo a translocação para outros órgãos. A resposta imune intestinal contra *Salmonella* spp. abrange uma série de interações complexas, que incluem as citocinas, os leucócitos, células epiteliais e outros fatores presentes no GALT (FUKUTOME et al., 2001). As citocinas apresentam um papel crítico na indução e expressão da resposta de IgA nas superfícies mucosas (HUSBAND, 2002).

A manipulação da microbiota intestinal, usando produtos de exclusão competitiva e probióticos é uma alternativa potencial para estimular a resposta imune nas aves tratadas, especialmente relacionado à ativação da SigA. Desde que a mucosa intestinal é modulada pela interação da microbiota com o sistema imune, é provável que mudanças durante o crescimento afetem este microambiente (CUNNINGHAM-RUNDLES, 2004).

A imunoestimulação é um dos maiores efeitos funcionais atribuídos ao consumo de probióticos (AMIT- ROMACH; UNI; REIFEN, 2010; FLINT; O'TOOLE; WALKER, 2010; FLORE, FRANCOIS; FELICITE, 2010; IBRAHIM et al., 2010; KLEIN et al., 2010; NAYAK, 2010). Muitos efeitos dos probióticos são mediados através da regulação do sistema imune, particularmente através do controle do balanço de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (LI; XIA; LI, 2009; FOLIGNE et al., 2010; JOBIN, 2010). Diversos estudos em animais e humanos têm demonstrado evidências de que culturas específicas de probióticos tem habilidade de estimular diversos aspectos da imunidade inata (FARNELL et al., 2006; BOIRIVANT; STROBER, 2007; BOIRIVANT et al., 2008; AMIT-ROMACH et al., 2010; ROMANIN et al., 2010; WEISS et al., 2010), como também aumentar a imunidade adaptativa

(LEBLANC; FLISS; MATAR, 2004; GALDEANO et al., 2009; NERMES et al., 2011).

## 2.7 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *SALMONELLA*

Na cadeia de produção avícola a detecção de *Salmonella* deve ser feita a partir de amostras de fezes, órgãos internos, ovos, embriões, rações e matérias primas. O monitoramento do ambiente em que as aves vivem serve para monitorar a infecção do lote (CHARLTON et al., 2005; KINDE et al., 2004). Na maioria dos casos as amostras contêm um grande número de outras bactérias, o que torna difícil isolar colônias de *Salmonella* através do plaqueamento direto em ágar. Assim é comum o uso de caldos de pré-enriquecimento, caldos de enriquecimento seletivo e ágar seletivos para diferenciação das bactérias. Uma vez isolada uma colônia morfológicamente compatível, uma bateria de testes bioquímicos é usada para a confirmação de *Salmonella*.

Os testes bioquímicos para *Salmonella* respondem com reação de indol negativo, Voges-Proskauer negativo, produção de urease negativa, produção de gás sulfídrico positivo e descarboxilação de lisina, dentre outros. O método convencional de isolamento e identificação de *Salmonella* usualmente requer de 3-5 dias. Na maioria dos casos, torna-se inviável uma rápida e estratégica tomada de decisão (MACIOROWSKI, 2005).

Em virtude desta necessidade, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tornou-se uma poderosa ferramenta no diagnóstico microbiológico na última década (KOERICH, 2007). A padronização dos métodos de detecção por PCR de agentes de importância para a cadeia produtiva deverá cumprir vários critérios desde a acurácia analítica e de diagnóstico, probabilidade de alta detecção, robustez, baixa contaminação, e aceitação por protocolos de fácil aplicação e interpretação (MALORNY et al., 2003). Atualmente, as ferramentas moleculares de diagnóstico, baseadas na análise de DNA, possuem grande importância no estudo epidemiológico de *Salmonella* spp. Diferentes técnicas moleculares vêm sendo utilizadas, tais como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas variações, perfil de plasmídeos, ribotipagem, perfil determinado por sequências de inserção e eletroforese em campo pulsado (PFGE) (BETANCOR et al., 2004).

Isolados de *Salmonella* também podem ser identificados ao nível de subrotipo através das técnicas de fagotipagem (uso de vírus ou “fagos”), eletroforese em campo pulsado (PFGE), polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), biotipagem (testes bioquímicos), resistência antimicrobiana e análise de perfil plasmidial. A

técnica de fagotipagem tem alto valor na caracterização de cepas, porém está limitada a poucos sorovares para os quais o esquema de tipificação foi desenvolvido até o momento, incluindo os sorovares Typhi, Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg e Schottmuelleri (LIBBY et al., 2004).

## 2.8 CONTROLE DE *SALMONELLA* EM FRANGOS DE CORTE

A Salmonelose apresenta prevalência diferenciada nas diversas regiões do país e sua epidemiologia e controle são bastante complexas. Isso decorre fundamentalmente da condição de criação dos animais, padrões de higiene e biossegurança, nível de contaminação do alimento, fatores socioeconômicos e fatores ambientais. Dessa forma, o controle representa um grande desafio ao setor Avícola, principalmente pela diversidade e emergência de novos sorovares e pela sua relação com a Saúde Pública (MUNIZ, 2012).

Para estratégias de controle de *Salmonella* em frangos de corte serem efetivas, alguns pontos devem ser conhecidos, como o conhecimento da localização destas bactérias, frequência de aparecimento, sorovares presentes e possíveis fontes de infecção. Deste modo a monitoria torna-se uma ferramenta importante para a avaliação do *status* dos plantéis (BACK et al., 2006).

A presença de *Salmonella* spp. em carcaças de aves está relacionada com a colonização intestinal por esta bactéria, que é maior durante os primeiros dias de vida das aves. *Salmonella* Enteritidis, além de colonizar o intestino das aves como muitos outros sorotipos, invade órgãos internos como folículos ovarianos, oviduto, fígado, pâncreas, baço e vesícula biliar.

O controle de *Salmonella* é complexo, pois inúmeras são as fontes de contaminação em um sistema de produção de frangos, incluindo granja de matrizes, incubatório, alimento, roedores, insetos, aves silvestres, transporte, meio ambiente da criação dos frangos, processo de abate e meio ambiente da planta de abate eo homem (BAILEY et al. 2001).

Os sorovares de *Salmonella* diagnosticados no incubatório e em pintos de um dia foram encontrados em carcaças, porém em baixa frequência (CORYY et al., 2002). Diferentemente, Byrd et al (1999) encontraram em seus estudos forte relação entre os sorovares encontrados no incubatório e carcaças.

O estresse causado durante o transporte ao abatedouro aumenta a contaminação de *Salmonella* das aves antes do abate. Pesquisas de *Salmonella* nas caixas de transporte de frangos demonstram que os sorovares identificados a campo e sorovares isolados das caixas

de transporte são frequentemente encontrados nas análises de carcaças após o processamento no frigorífico (CORRY et al., 2002, ROY et al., 2002).

Resultados laboratoriais de pesquisa de *Salmonella* respondem somente a questões definidas (como a presença ou ausência de um determinado sorovar de *Salmonella* em um tipo particular da amostra) e têm valor limitado para a previsão e resolução de problemas emergentes que envolvem, por exemplo, novos reservatórios. O tipo de amostra selecionada e tipo de ensaio são elementos críticos para determinar a utilidade dos resultados obtidos por meio dos testes (bacteriologia, sorologia ou análise de material genético). O número de amostras necessárias para estabelecer confiança e validar os resultados está diretamente relacionado ao tamanho do lote e inversamente relacionado à prevalência da infecção (AHO, 1992).

Como muitos sorovares de *Salmonella* têm algum nível de invasibilidade, uma variedade de tecidos internos (incluindo o fígado, o baço, ovário, oviduto, testículos, saco gema, coração, sangue do coração, rim, vesícula, pâncreas, líquido sinovial e olhos) são potencialmente úteis para a detecção de aves infectadas. Múltiplos órgãos (processados individualmente ou em *pool*) são normalmente coletados a partir de cada ave para maximizar a probabilidade de detecção (GAST et al., 1990).

*Swabs* cloacais ou amostra de fezes são materiais testados para a detecção de *Salmonella*, porém a intermitência de excreção fecal da bactéria por aves infectadas limita a confiabilidade das amostras selecionadas (VAN IMMERSSEEL et al., 2004). A excreção fecal de *Salmonella* pelas aves também pode ser indiretamente detectada testando amostras do ambiente de criação, sendo esta estratégia útil para o acompanhamento da entrada de *Salmonella* carregadas por vetores, trabalhadores, equipamentos e outras fontes. Deste modo, Kingston et al. (1981) sugeriram que a partir de *swabs* de arrasto, coletados do chão dos galpões de frangos, é possível detectar a presença de *Salmonella* com alta sensibilidade.

Por vários dias após a eclosão as aves são altamente sensíveis à infecção por *Salmonella* porém elas tornam-se mais resistentes durante as primeiras semanas de vida. Esta transição é principalmente devido à aquisição gradual, pelos pintos, de uma microflora intestinal completa a partir do meio ambiente. A capacidade das bactérias da microbiota normal do trato gastrointestinal dos frangos inibirem a colonização por patógenos entéricos, tal como *Salmonella*, tem sido estudada e aplicada para desenvolver tratamentos para modulação do trato gastrointestinal. Tais tratamentos geralmente envolvem a administração de culturas bacterianas definidas ou indefinidas, visando diminuir a colonização gastrointestinal por organismos como a *Salmonella*. O mecanismo pelo qual estas culturas

exercem um efeito protetor contra patógenos é muitas vezes caracterizado globalmente como exclusão competitiva (EC). Manipulações não microbianas da bioquímica gastrointestinal foram igualmente trabalhadas para conseguir modular colonização intestinal bacteriana. Quanto às *Salmonellas* tíficas, não é conhecido se existem variações entre os sorovares ou cepas na suscetibilidade à exclusão competitiva pela manipulação da flora ou bioquímica intestinal (GAST, 2007).

Aditivos alimentares para o controle de *Salmonella* incluem antimicrobianos de uso profilático e curativo, ácidos orgânicos, óleos essenciais, prebióticos, probióticos e simbióticos (VAN IMMENSEEL et al., 2003).

Com as proibições de uso de certos antimicrobianos na criação de frangos, os ácidos orgânicos e óleos essenciais de plantas tiveram pesquisas mais intensas nos últimos anos. Ácidos orgânicos são considerados todos os ácidos orgânicos carboxílicos, incluindo ácidos graxos e amino ácidos, com a estrutura geral R-COOH. Nem todos os ácidos têm ação antimicrobiana sobre a microbiota intestinal (DIBNER; BUTTIN, 2002). Os ácidos mais estudados no controle de *Salmonella* e no desempenho zootécnico das aves são os ácidos orgânicos de cadeia curta, com 1 a 7 carbonos (*short-chain fatty acids* - SCFA), representados pelos ácidos fórmico, acético, propiônico e butírico; e os triglicerídios de cadeia média, com 6 a 12 carbonos (*medium-chain fatty acids* - MCFA), representados pelos ácidos capríco, caprílico e cáprico (VAN IMMENSEEL et al., 2004).

Assim como os ácidos orgânicos, os óleos essenciais têm sido usados como melhoradores de desempenho e antimicrobianos. Os óleos constituem-se em complexas misturas de substâncias voláteis, geralmente lipofílicas, cujos componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos (óleo cítrico), álcoois simples (linalol), aldeídos (cinamaldeído), cetonas (óleo de cânfora), fenóis (timol, eugenol e carvacrol), ésteres (óleo de lavanda) dentre outros, em diferentes concentrações, nos quais um composto farmacologicamente ativo é majoritário (SANTURIO et al., 2007).

Dentre as medidas preventivas como probióticos e prebióticos adotadas para evitar a contaminação de lotes por *Salmonella* está o uso de vacinas. As vacinas contra *Salmonella* foram inicialmente utilizadas para controle dos quadros de Pulorose (*Salmonella Pullorum*) e Tifo aviário (*Salmonella Gallinarum*), com vacinas vivas feitas a partir de uma cepa rugosa de *Salmonella Gallinarum*, de baixa patogenicidade. Somente o uso desta ferramenta não foi suficiente para controlar os quadros clínicos. A eliminação de lotes positivos e adoção de medidas de vazio sanitário adequado e desinfecção também foram necessárias. Com o controle destas *Salmonellas* começaram a ter importância as *Salmonellas* paratíficas. Em

virtude do fato de que o uso de medidas de biossegurança e tratamentos com antimicrobianos não serem suficientes para controlar as *Salmonella* paratíficas, houve a necessidade de outras medidas de controle e o desenvolvimento de vacinas teve mais atenção (CARDOSO; ROCHA, 2006).

A versatilidade da *Salmonella*, durante a infecção e seus distintos mecanismos de evasão do sistema imune, requer uma resposta imune complexa, que resulta numa gama de vias e respostas muitas vezes não alcançadas completamente dependendo do tipo de vacina utilizada. O objetivo comum de qualquer vacina, seja viva atenuada ou inativada, será diminuir a possibilidade de infecção letal, principalmente no caso do tifo de transmissão vertical e contaminação do alimento, para a maioria dos sorovares, bem como minimizar o desafio do ambiente. Evitar a infecção das aves nem sempre é um objetivo viável, em médio prazo, e o conceito está associada a proteção local, nas mucosas, com IgA além de células citotóxicas, o que é alcançado com o uso de vacinas vivas via mucosa. As vacinas inativadas, que até o momento devem ser utilizadas por via parenteral, limitam a reação à geração de Linfócitos T CD4, quando se busca a resposta celular. Mas a resposta mediada por Linfócitos T CD8 (citotóxicos), que estão ligados ao “clearance” bacteriano (capacidade de eliminação da bactéria do organismo), é uma resposta característica de vacinas vivas por qualquer via de aplicação. A memória imunológica, importante para aves de ciclo longo, é alcançada mais eficientemente com vacinas vivas, devido a uma maior expressão dos epítomos protéicos. Proteção de longa duração e eficácia é atribuída à vacina viva de *Salmonella*, possivelmente como resultado de uma maior persistência na apresentação de antígenos ao sistema imune do hospedeiro (BABU et al., 2004).

Devido ao fato da eficácia das vacinas serem mais confiável quando o sorovar infectante dos lotes é o mesmo sorovar contido na vacina, esta estratégia é de valor questionável na prevenção da emergência de novos problemas associados à sorovares de aparecimento inconstante. A vacinação pode ser mais valiosa quando como de programa de redução de riscos, especialmente quando aplicada à lotes de aves muito suscetíveis ou lotes expostos à várias fontes de contaminação, quando evidências epidemiológicas direcionam a preocupação à um sorovar de *Salmonella* específico (GAST, 2007).

Para Gast (2007), sete características comuns entre os programas atuais de controle de *Salmonella* devem ser adotadas: aquisição de pintos de matrizes comprovadamente livres de *Salmonella*; desinfecção dos ovos e incubação em condições rigorosas de higiene; rigorosa limpeza dos galpões de aves entre cada lote; implantação e documentação do controle de pragas com monitoria periódica; aplicação de rígidas normas de biossegurança, com restrição

de pessoas e equipamentos dentro do galpão e entre galpões; peletização da ração e exclusão de proteínas de origem animal da formulação; tratamento adequado da água. Outra maneira de controlar a *Salmonella enterica* em frangos de corte é a exclusão competitiva usando misturas de microorganismos definidas ou indefinidas (STERZO et al., 2007).

As estratégias de controle como antibióticos, probióticos, prebióticos, simbióticos, ácidos orgânicos, biosseguridade e vacinas, são eficientes no controle de *Salmonella* quando usados em combinação. Diferentes estratégias têm sido utilizadas para controlar a infecção de *Salmonella* na carne de frango. No entanto, apesar da importância de cada uma dessas ferramentas e os mecanismos de ação diferentes, é importante ressaltar que nenhum deles é capaz de trabalhar eficazmente, por si só: cada um deles não é mais do que uma ferramenta, quando a sua utilização é de forma individual, mas é uma abordagem e solução fantástica quando usadas em combinação (BUITRAGO, 2011).

### 2.8.1 Probióticos

Várias definições de probióticos têm sido utilizadas nos últimos anos. Probióticos são produtos constituídos por microorganismos vivos que uma vez introduzidos no organismo animal influenciam benéficamente o hospedeiro através da melhoria do balanço microbiano intestinal (FULLER, 1989). O *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos define probióticos como uma fonte de microorganismos viáveis que ocorrem naturalmente, os quais podem ser utilizados diretamente na ração de animais (DFM: *direct-fed-microbial*). Os probióticos são constituídos por microorganismos vivos e viáveis (SCHREZENMEIR; DE VRESE, 2001), normalmente presentes no trato gastrointestinal ou por vezes, de vida exterior (ex. *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*). São culturas únicas ou mistas de microorganismos que, administrados a animais ou humanos, produzem efeitos benéficos no hospedeiro por incremento das propriedades da microbiota nativa (HAVENAAR; HUIS IN'T VELD, 1992).

A definição aceita internacionalmente: microorganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde (*FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION*, 2001).

Neste sentido, foram definidos como microorganismos vivos adicionados à alimentação humana ou animal, com o intuito de reforçar ou restabelecer o equilíbrio microbiano intestinal, conferindo, conseqüentemente, saúde ao hospedeiro. Previamente ao uso comercial, micro-organismos probióticos devem ser submetidos a diferentes testes para o



reconhecimento de sua segurança como aditivo alimentar para humanos e animais (O'TOOLE; COONEY, 2008).

A história dos probióticos é conhecida há centenas de anos, mas somente no início do século passado foi estudada racionalmente e pesquisada com bases científicas. O uso de organismos probióticos surgiu no Oriente Médio, onde médicos prescreviam iogurtes e outros leites fermentados como terapêutica para afecções do trato gastrointestinal e também como estimulante do apetite.

A primeira informação sobre leites fermentados, influenciando a saúde humana, foi publicada por Elie Metchnikoff's (1907), pesquisador do Instituto Pauster de Paris, após observar a longevidade de camponeses búlgaros e atribuir o fato à dieta constituída basicamente de leite fermentado. Pesquisando os componentes do leite, Metchnikoff isolou o *Bacillus bulgaricus*, identificado depois como *Lactobacillus bulgaricus*. No seu livro “*The prolongation of life*” Metchnikoff's (1907) especulou que microrganismos nocivos ao aparelho intestinal expõem substâncias prejudiciais ao hospedeiro. Então, por meio da ingestão de alimentos benéficos, no caso o leite fermentado, pode-se melhorar o ambiente intestinal (hoje referida como manipulação microbiana), fortalecendo a saúde e aumentando a expectativa de vida do indivíduo (MACARI; FURLAN, 2005).

Lilly e Stillwell (1965) foram os primeiros a utilizar o termo probiótico, verificando a ação de microrganismos como melhoradores de desempenho. Porém, Parker em 1974, foi o primeiro a utilizar o termo probiótico no sentido empregado atualmente: como organismos e substâncias que contribuem para o balanço microbiano intestinal.

O marco do uso de probióticos em aves foi dado por pesquisadores finlandeses (NURNI & RENTALA, 1973): em seus experimentos, os autores observaram que o conteúdo intestinal de aves adultas normais, administrados oralmente às aves com um dia de idade, alternava sua sensibilidade à infecção por *Salmonella* spp., prevenindo o estabelecimento desta no intestino. Esta ideia foi conceituada como “Exclusão Competitiva”, tornando-se conhecida como “conceito de Nurni”.

A década de 70 foi marcada pelo início do uso de um probiótico para fim animal, o *Lactobacillus acidophilus*. Este fato culminou com a preocupação, por parte das autoridades e órgãos de saúde animal internacionais, com as rações animais contendo antibióticos. A preocupação resultou na interdição do uso de algumas dessas substâncias alegando que a eficácia desses componentes poderia ser diminuída quando utilizados em humanos, se administradas continuamente em animais. A União Européia em 1997 proibiu o uso de Avoparcina e, em 1998, de Bacitracina de Zinco, Espiramicina, Virginiamicina e Tilosina. Os

produtores europeus atualmente podem recorrer a apenas quatro melhoradores de desempenho: monensina, salinomicina, avilamicina e flavomicina; os dois primeiros são ionóforos bastante utilizados como agentes anticoccidianos para aves, restando apenas os dois últimos como melhoradores de desempenho para frangos de corte e outras aves.

No Brasil, em 1992, a Portaria nº 159, do Ministério da Agricultura veda o uso de antimicrobianos para ação como aditivos sistêmicos, promotores de crescimento ou conservantes como tetracilinas, penicilinas, cloranfenicol e sulfonamidas. O Ofício circular 19/98 de 16/11/98 do Ministério da Agricultura, suspende o uso de Avoparcina e a Portaria 448 de 10/09/98 proíbe a fabricação, importação e uso de Cloranfenicol, Furazolidona e Nitrofurazona. Atualmente, os aditivos autorizados como melhoradores de desempenho de frangos de corte são: ácido 3-nitro, ácido arsanílico, avilamicina, nitrovim, olaquinox, tilosina, virginamicina, bacitracina de zinco, espiramicina e enramicina, de acordo com o Ministério da Agricultura. Pesquisadores sensibilizados com o problema procuraram alternativas ao uso de antibióticos na ração animal, pois a simples retirada desse produto provocaria grandes danos econômicos.

Os probióticos estão incluídos em um grupo grande de formulações denominadas “alimentos funcionais” para humanos, incluindo iogurte, bebidas, cápsulas, e suplementos alimentares, que visam restabelecer o equilíbrio da microbiota intestinal (O'TOOLE; COONEY, 2008).

A microbiota, em equilíbrio, atua como uma barreira de defesa, impedindo a fixação de patógenos no trato gastrointestinal. Ao contrário, condições de desequilíbrio microbiano como estresse e troca de alimentação podem criar um ambiente favorável à fixação de microrganismos patogênicos. Em resposta a essas modificações, ocorre redução no desempenho, normalmente associada a alterações histológicas e bioquímicas no intestino delgado, como atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas e, conseqüentemente, redução na capacidade de digerir e absorver nutrientes da dieta (PLUSKE et al., 1997).

Dentre as características desejáveis aos probióticos, destaca-se que estes não sejam destruídos pelo suco gástrico, sendo eficazes em diferentes segmentos do sistema digestório, estimule o sistema imune e que propiciem efeito benéfico na absorção de nutrientes (VASSALO et al., 1997). As bactérias mais comumente utilizadas em formulações probióticas são os *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Bacillus* e *Streptococcus*. Algumas espécies de leveduras também são usadas como o *Saccharomyces* (GUPTA; GARG, 2009). Vários microrganismos têm sido considerados ou utilizados como probióticos incluindo fungos particularmente cogumelo e leveduras como o cogumelo comestível

Shiitake, *Lentinula edodes*, que foi utilizado como probiótico para frangos de corte (WILLIS et al., 2011) e também bactérias e culturas mistas de microrganismos.

O uso de probióticos como melhoradores de desempenho em animais está aumentando, com resultados positivos na melhora do ganho de peso e na conversão alimentar (KABIR et al., 2004). Têm-se utilizado diferentes microrganismos tais como: varias espécies de *Lactobacillus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium bifidum* e outros. Nas poedeiras têm-se demonstrado além do ganho de peso e melhora na conversão alimentar, o aumento da resistência a doenças e na produção de ovos.

Os probióticos apresentam efeitos benéficos para o hospedeiro (FERREIRA et al., 1998). Entre os mais importantes podem ser mencionados os seguintes: a) influência positiva na microbiota intestinal: favorecem o crescimento de bactérias da microbiota normal do intestino, mantendo o equilíbrio do meio; b) prevenção de infecções do trato intestinal: interferem por diferentes mecanismos com as bactérias patogênicas, prevenindo a adesão e colonização do trato intestinal; c) estimulação da imunidade local: os probióticos estimulam a produção de IgA secretora no intestino, a qual previne a colonização de bactérias patogênicas, além disso estimulam a imunidade sistêmica pela estimulação da produção de IgG; d) redução de reações inflamatórias: devido à sua capacidade de proteger o intestino de agentes invasores, reduz de maneira significativa as enterites; e) regulação da motilidade intestinal: pelo balanço entre solutos e líquidos dentro do intestino, regulam a motilidade intestinal, favorecendo a absorção de nutrientes.

Os probióticos podem conter microrganismos definidos e em quantidade definida, adequada a cada espécie animal, ou não ter nem os microrganismos definidos em si, nem as suas quantidades. As espécies mais utilizadas no preparo de probióticos são: *Lactobacillus bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. lactis*, *L. salivarius*, *L. plantarium*, *L. reuteri*, *L. johonsii*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *Bifidobacterium* spp., *Bacillus subtilis* e *B. toyoi* (RAMOS, 2009). De acordo com Simon et al. (2001) espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* têm sido usadas mais extensivamente em humanos, enquanto espécies de *Bacillus*, *Enterococcus*, e levedura *Saccharomyces* foram os organismos mais comumente usados em animais de produção.

Na alimentação das aves, as espécies que pertencem aos probióticos *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Aspergillus*, *Cândida*, *Saccharomyces* e outros possuem um efeito benéfico sobre o desempenho de frangos de corte (ASHAYERIZADEH et al., 2009), a modulação da microbiota intestinal e inibição de patógenos (MOUNTZOURIS et al., 2007; HIGGINS et al., 2010), alterações histológicas

intestinais (KABIR et al., 2005; CHICHLAWSKI et al., 2007), imunomodulação (KHAKSEFIDI; GHOORCHI, 2006; APATA, 2008), parâmetros hematobioquímicos (MATHIVANAN; KALAIARASI, 2007; KAMRUZZAMAN et al, 2005), alterações nas características sensoriais da carne de frango de corte (PELICANO et al., 2003) e qualidade microbiológica de carne de frangos de corte (KABIR et al., 2005).

A eficácia ou ineficácia de um produto probiótico pode ser relacionada com a sua composição microbiana e viabilidade, método de administração e frequência, a idade das aves, higiene das instalações, composição alimentar (cereais e seu sinergismo ou antagonismo em relação a composição microbiana do produto), bem como fatores ambientais de estresse (SANTOS, 2010).

Na literatura encontram-se resultados controversos em relação à eficácia das diferentes constituições de probióticos. Alguns trabalhos demonstram que culturas indefinidas normalmente apresentaram melhor desempenho em comparação com um produto contendo uma cultura definida de microrganismos (HINTON, MEAD, 1991; WATERS et al., 2005), outros demonstram que uma cultura de microrganismos definida é indicada para evitar a colonização por *Salmonella enterica* ao invés de culturas indefinidas (STERZO et al., 2007; ESTRADA; HERNÁNDEZ; SOTO, 2010).

## REFERÊNCIAS

AHO, M. Problems of *Salmonella* sampling. **Journal of Food Microbiology**, v.15,p.2461-2468. 1992.

AMIT-ROMACH, E., UNI, Z., REIFEN, R.. Multistep mechanism of probiotic bacterium, the effect on innate immune system. **Molecular Nutrition & Food Research**, 54(2), 277–284. 2010.

AMSON, G.V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no estado do Pará – Brasil, no Período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 30, n.6, p.1139 – 45, nov./dez., 2006.

ANDREATTI FILHO, R. L. Alimentos funcionais na produção avícola. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Rocca Cap.6, p. 41-51, 2006.

APATA, D.F. Growth performance, nutrient digestibility and immune response of broiler chicks fed diets supplemented with a culture of *Lactobacillus bulgaricus*. **J. Sci. Food Agric.n.** 88, p.1253-1258. 2008.

ASHAYERIZADEH, A.; DABIRI, N.; ASHAYERIZADEH, O.; MIRZADEH, K.H.; ROSHANFEKR, H.; MAMOOEE, M. Effect of dietary antibiotic, probiotic and prebiotic as growth promoters, on growth performance, carcass characteristics and hematological indices of broiler chickens. **Pakis. J. Biol. Sci.**;12:52–57. 2009.

BABU, U.; TAJIMA, O.; WATARAI, M. et al. Effects of rearing conditions on the colonization of *Salmonella* Enteritidis in the cecum of chicks. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.101, p.251-257. 2004.

BACK, A.; BELTRÃO, N.; LEÃO, J.A. Monitoria e controle de *Salmonella*: aspectos práticos. VII SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. **Anais...** Chapecó, p.95 - 103.2006.

BACK, A.; ISHIZUKA, M. M. **Principais Doenças de notificação obrigatória da Organização Mundial de Saúde**. In: Salmonelose aviária.1ed. São Paulo: Fundação Cargill, p.120-189. 2010.

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

BARRETO, T.L.; STURION, G.L. Perfil epidemiológico dos surtos de toxinfecções alimentares em um município do estado de São Paulo. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.24, n.180/181, p.78-84, jan/fev. 2010.

BAILEY, L.B.; MOYERS, S.; GREGORY J.F.. Folate. In: Present Knowledge in Nutrition, Bowman, B.A. and R.M. Russell (Eds.). **International Life Sciences Institute**, Washington, DC., pp: 214-229. 2001.

BETANCOR, L.; SCHELOTTO, F.; MARTINEZ, A.; PEREIRA, M.; ALGORTA, G.; RODRÍGUEZ, A.; VIGNOLI, R.; CHABALGOITY, J.A. Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.3. p.1155-1162. 2004.

BOIRIVANT, M., AMENDOLA, A., BUTERA, A.. Intestinal microflora and immunoregulation. **Mucosal Immunology**, 1(Suppl 1), S47–S49. 2008.

BOIRIVANT, M., STROBER, W.. The mechanism of action of probiotics. **Current Opinion in Gastroenterology**, 23(6), 679–692. 2007.

BORSOI, A., SANTOS, L. R., RODRIGUES, L. B., MORAES, H. L. S., SALLE, C. T. P., NASCIMENTO, V. P.. Behavior of *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Enteritidis strains following Broiler Chick inoculation: Evaluation of cecal morphometry, liver and cecum bacterial counts and fecal excretion patterns. **Brazilian Journal of Microbiology**, 42: 266-273. 2011.

BRASIL, Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa SDA N.78 de 03 de 9 de novembro de 2003**. Aprova as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas, como Livres de *S. Gallinarum* e de *S. Pullorum* e Livres ou Controlados para *S. Enteritidis* e para *S. Typhimurium*. In:Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria da defesa Agropecuária. **Instrução Normativa n.70, de 06 de outubro de 2003**. Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação de Vigilância das doenças de transmissão hídrica e alimentar. **Análise epidemiológica de surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação de Vigilância das doenças de transmissão hídrica e alimentar. **Dados Epidemiológicos - DTA período de 2000 a 2011\***. Brasília, 2011.

BRANDTZAEG, P.; BAEKKEVOD, E. S.; FARSTAD, I. N.; JAHNSEN, F. L.; JOHANSEN, F. E.; NILSEN, E. M.; YAMANAKA, T. Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments. **Immunology Today**, v. 20, p. 141-151, 1999.

BUEHLER, D.M.. **Bottlenecks, budgets and immunity: The costs and benefits of immune function over the annual cycle of red knots (*Calidris canutus*)**. Tese de Doutorado, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Groningen, Groningen, NL. 248p. 2008.

BUITRAGO, L. Y. V.. Safe Management Model for the Use Of Killed Vaccines Against Salmonella. In: Seminário Internacional sobre Salmoneloses Aviárias. Rio de Janeiro. **Anais...** 2011.

BYRD, J.A.; DELOACH, J.R.; CORRIER, D.E.; NISBET, D.J.; STANKER, L.H.. Evaluation of *Salmonella* serotype distributions from commercial broiler hatcheries and grower houses. **Avian Diseases**, v. 43: 774–778. 1999.

CAFFER, M I, ALCAIN, A, PANGÓPULO, M., MORONI, M., BRENGI, S., TERRAGNO, R. "**Serovariedades de *Salmonella* spp. en Argentina, 2007-2009**" En: "XII Congreso Argentino de Microbiología - VI Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínica (SADEBAC) - I Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental (DiMAyA)", Buenos Aires, Argentina. 2010.

CARDOSO, B.; ROCHA, L. C. Controle de salmonelas em avicultura através do uso de vacinas. V Simpósio de Sanidade Avícola da UFSM. **Anais...** Santa Maria, RS, p. 95-98, 2006.

CARVALHO, A.C.F.B.; CORTEZ, A.L.L. *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, linguças e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.25, p.1465-1468, 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Estimates of foodborne illness in the United States. Published October 19, 2011. Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodborneburden>. Acesso em: Dezembro de 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Vital signs:** Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food—foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. sites, 1996-2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 60:749–755. 2011.

CHARLTON, B. R., WALKER, R. L., KINDE, H., BAUER, C. R., CHANNINGSANTIAGO, S.A., FARVER, T.B. Comparison of *Salmonella* Enteritidis-Specific Polymerase Chain Reaction Assay to Delayed Secondary Enrichment Culture for the Detection of *Salmonella* Enteritidis in Environmental Drag Swab Samples. *Avian Diseases* 49:418-422, 2005.

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*, 86, 1121-1132. 2007.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (CAC) 2007. **Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk management (MRM)** CAC/GL 63. 2007.

CORRY, J. L. E.; ALLEN, V. M.; HUDSON, W. R.; BRESLIN, M. F.; DAVIES, R. H. 2002. Sources of *Salmonella* on broiler carcasses during transportation and processing: modes of contamination and methods of control. *Journal of Applied Microbiology*, 92:424-432. 2002.

COX J.M.; PAVIC, A.. Advances in enteropathogen control in poultry production. *Journal of Applied Microbiology*, v. 108, p.745–755, 2010.

CRUMP ,J.A.; LUBY, S.P.; MINTZ, E.D. The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ*. 82:346–353. 2004.

CUNNINGHAM-RUNDLES, S. The effect of aging on mucosal host defense. *Journal of Nutrition, Health & Aging*. v. 8, p. 20-25, 2004.

DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular Basis of the Interaction of *Salmonella* with the Intestinal Mucosa. *Clinical and Microbiology Revision*, 12: 405-428, 1999.

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*. 11:453-463. 2002.



- DOYLE, M. P.; CLIVER, D. O. *Salmonella*. In: CLIVER, D. O. (Ed.). **Foodborne Disease**. San Diego: Academic Press, 1990.
- ESTRADA, M. A. J.; HERNÁNDEZ, Jessica Alejandra Molina; SOTO, Lourdes González. Un probiótico definido aumenta la exclusión de *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis durante la crianza de aves ligeras. **Vet. Méx.**, v.41 (1), 2010.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in broiler flocks of *Gallus gallus*, in the EU, 2005-2006. **EFSA Journal**, v. 98, p. 1-85, 2007a.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. **EFSA Journal** 10(3):2597. 2012.
- FARNELL, M. B.; DONOGHUE, A. M.; DE LOS SANTOS, F. S.; BLORE, P. J.; HARGIS, B.M.; TELLEZ, G.; DONOGHUE, D.J.. Upregulation of oxidative burst and degranulation in chicken heterophils stimulated with probiotic bacteria. **Poultry Science**, 85:1900-1906. 2006.
- FERREIRA, A. J. P.; FERREIRA, C. A.; PETRELLA NETO, R; OLIVEIRA, D. R.; NUREMBERGER JÚNIOR, R.; LOPES, V. C. B. A. Probiotics: benefits and efficiency in poultry production. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 65, p. 139-149, 1998.
- FLINT, H.J.; O'TOOLE, P.W.; WALKER, A.W. Special issue: The human intestinal microbiota. **Microbiology (Reading, England)**, 156:3203-3204. 2010.
- FLORE, T.N.; FRANCOIS, Z.N.; FELICITE, T.M. Immune system stimulation in rats by *Lactobacillus* sp. isolates from raffia wine (*raphia vinifera*). **Cellular Immunology**, 260:63-65. 2010.
- FLORES, F., VIVIAN, L.R., LOVATO, M., Os desafios da salmonelose na saúde pública – **Boletim Informativo** Ano 4 - Número 4. Centro de Ciências Rurais/DMPV, Universidade Federal de Santa Maria, 2010.
- FOLIGNE, B.; DEWULF, J.; BRETON, J.; CLAISSE, O.; LONVAUD-FUNEL, A.; POT, B. Probiotic properties of non-conventional lactic acid bacteria: Immunomodulation by *Oenococcus oeni*. **International Journal of Food Microbiology**, 140:136-145. 2010.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) AND WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Health and nutritional properties of

probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: FAO and WHO Joint and Expert Committee Report. 2001.

FORSHELL, L.P.; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal foods products. **Revue Scientifique Technique Office International des Epizooties**, Paris, v.25, n.2, p.541-554. 2006.

FREITAS NETO, O.C.; PENHA FILHO, R.A.C.; BARROW, P.; BERCHIERI JR, A.. Sources of human non-typhoid salmonellosis: a review. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, vol.12, n.1, p.01-11. 2010.

FREITAS, J. B.. Evolução de sorovares - Modelo de Banco de Cepas. In: Seminário Internacional sobre Salmoneloses Aviárias, Rio de Janeiro, RJ. **Anais...**, CD-ROM. 2011.

FUKUTOME, K., WATARI, S., MUKAMOTO, M., KODAMA, H.. Intestinal mucosal immune response in chickens following intraocular immunization with liposome-associated *Salmonella enterica* serovar Enteritidis antigen. **Dev. Comp. Immunol.** 25:475–484. 2001.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Microbiology**. Oxford, v. 66, p. 365-378, 1989.

GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B., Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, p. 515–528, 2010.

GALDEANO, C. M.; PERDIGON, G.. Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. **Journal of Applied Microbiology**. 97:673–681. 2004.

GAST, R. K.; BEARD, C. W.. Isolation of *Salmonella* Enteritidis from internal organs of experimentally infected hens. **Avian Disease**. 34:991–993.1990.

GAST, R.K. *Salmonella* infections. In: SAIF, Y.M. et al. **Diseases of poultry**. 11.ed. Ames: Iowa State University. Cap.16, p.567-599. 2003.

GAST, R.; GURAYA, R.; GUARD-BOULDIN J. et al. Colonization of specific regions of the reproductive tract and deposition at different locations inside eggs laid by hens infected with *Salmonella* Enteritidis or *Salmonella* Heidelberg. **Avian Disease**, v.51, p.40-44. 2007.

GOURBEYRE, P.; DENERY, S.; BODINIER, M.. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Impact on the gut immune system and allergic reactions. **Journal of Leukocyte Biology**. 2011.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEMÜHL, J.; GRIMONT, P. A. D.; WEIL, F.-X. Supplement 2003 – 2007 (No. 47) to the White – Kauffmann – Le Minor scheme. **Research in Microbiology**. v.161, p. 26 – 29, 2010.

GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F.X. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. **WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella**. France: Institute Pasteur, 2007.

GUPTA, V.; GARG, R.. Probiotics. **Indian Journal Med. Microbiol.** 27 (3): 202-209. 2009.

HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, M. J.H. Probiotics: a general view. In: WOOD, B.J.B. Lactic acid bacteria in health and disease 1. Amsterdam: **Elsevier Applied Science**, p.151-170.1992.

HENSEL, M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. **International Journal of Medical Microbiology**, v.294, p.95–102. 2004.

HIGGINS, J. P.; HIGGINS, S. E.; WOLFENDEN, A. D.; HENDERSON, S. N.; TORRES-RODRIGUEZ, A., VICENTE, J. L., HARGIS, B. M., TELLEZ, G.. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture treatment timing on *Salmonella* Enteritidis in neonatal broilers. **Poultry Science**. 89:243-247. 2010

HINTON, M.; MEAD, G.C. *Salmonella* control in poultry: the need for the satisfactory evaluation of probiotics for this purpose. **Lett. Applied Microbiology**., v.13, p.49-50, 1991.

HUSBAND, A. J. Mucosal memory – maintenance and recruitment. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 87, p. 131-136, 2002.

IBRAHIM, F.; RUVIO, S.; GRANLUND, L.; SALMINEN, S.; VIITANEN, M.; OUWEHAND, A. C. Probiotics and immunosenescence: Cheese as a carrier. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 59(1), 53–59. 2010.

IRINO, K, FERNANDES, S.A, TAVECHIO, A.T, NEVES, B.C, DIAS, A.M.G. Progression of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**; 38: 193-196.1996.

JANTSCH, J.; CHIKKABALLI, D., HENSEL, M.. Cellular aspects of immunity to intracellular *Salmonella enterica*. **Immunological Reviews**. Vol. 240: 185–195. 2011.

JEURISSEN, S. H. M; VERVELDE, L.; JANSE, E. M. Structure and function of lymphoid tissues of the chicken. **Poultry Science**, v. 5, p. 183-207, 1994.

JOBIN, C.. Probiotics and ileitis: Could augmentation of TNF/NFkappaB activity be the answer? **Gut Microbes**, 1(3), 196–199. 2010.

JÚNIOR, A. S.. Interações químico-fisiológicas entre acidificantes, probióticos, enzimas e lisofosfolípidios na digestão de leitões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.238-245, 2009.

KABIR, S.M.L.; RAHMAN, M.M.; RAHMAN, M.B.; RAHMAN, M.M.; AHMED, S.U. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. **International Journal Poultry. Science**, v.3, p.361-364. 2004.

KABIR, S.M.L.; RAHMAN, M.M.; RAHMAN, M.B. Potentiation of probiotics in promoting microbiological meat quality of broilers. **Journal Bangladesh Soc. Agric. Science Technology**, v 2, p. 93-96. 2005.

KABIR, S.M.L.. The Role of Probiotics in the Poultry Industry. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, p. 3531-3546, 2009.

KAMRUZZAMAN, S.M.; KABIR, S.M.L.; RAHMAN, M.M.; ISLAM, M.W.; REZA, M.A. Effect of probiotics and antibiotic supplementation on body weight and haemato-biochemical parameters in broilers. **Bangladesh Journal Vet. Med.**, v.3, p.100-104. 2005.

KHAKSEFIDI, A.; GHOORCHI, T. Effect of probiotic on performance and immunocompetence in broiler chicks. **Journal Poultry Science**,v.43, p.296-300. 2006.

KINDE, H.; CASTELLAN, D.M.; KASS, P.H.; ARDANS, A.; CUTLER, G.; BREITMEYER, R.E.; BELL, D.D.; ERNST, R.A.; KERR, D.C.; LITTLE, H.E.; WILLOUGHBY, D.; RIEMANN, H.P.; SNOWDON, J.A.; KUNEY, D.R. The Occurrence and Distribution of *Salmonella Enteritidis* and others serovars on California Egg Laying Premises: A Comparison of Two Sampling Methods and Two Culturing Techniques. **Avian Diseases** 48:590-594, 2004.

KINGSTON, D.J. A comparison of culturing drag swabs and litter for identification of infectious with *Salmonella* sp. in commercial chicken flocks. **Avian Diseases**. v.25, p.513-516, 1981.

KLEIN, M.; SANDERS, M. E.; DUONG, T.; YOUNG, H. A.. Probiotics: From bench to market. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1212 (Suppl 1). 2010.

KOERICH, P.K.V. **Detecção de *Salmonella* em Reprodutoras de Frango: Comparação entre Real Time PCR e dois Métodos Microbiológicos (Semi-Sólido Rappaport-Vassiliadis e Duplo Enriquecimento)**. 2007. 42 folhas. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Genético e Molecular), Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, RS, 2007.

KORVER, D. R. Overview of the Immune Dynamics of the Digestive System. **The Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 15, p. 123-135, 2006.

KOTTWITZ, L.B.M.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; ALCOGER, I.; FARAH, S.M.S.S.; ABRAHÃO, W.S.M.; RODRIGUES, D.P.. Avaliação epidemiológica de surtos de Salmoneloses ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v.32, p.9-15. 2010.

LEBLANC, J.; FLISS, I.; MATAR, C.. Induction of a humoral immune response following an *Escherichia coli* O157:H7 infection with an immunomodulatory peptidic fraction derived from *Lactobacillus helveticus* - fermented milk. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 11(6), 1171–1181. 2004.

Li, X.; Xia, C.; Li, Y.. Induced expression of alpha-toxin gene of *Clostridium perfringens* in recombinant *Lactobacillus casei* and their immunoprotective in mice. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. **Acta Microbiologica Sinica**, 49(8), 1115–1120. 2009.

LIBBY, S.J.; HALSEY, T.A.; ALTIER, C. et al. *Salmonella*. In: **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 3 ed. Blackwell Publishing. USA. 2004.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, Washington/United States of America. v. 147; p. 747-748. 1965.

MACARI, M.; FURLAN, R.L.. Probióticos. Conferência de Ciência e Tecnologia Avícolas, Santos, SP. **Anais... Facta**, v. 1, p.53-72. 2005.

MACIOROWSKI, K.G.; PILLAI, S.D.; JONES, F.T.; RICKE, S.C. Polymerase chain reaction detection of foodborne *Salmonella* spp. in animal feeds. **Crit. Rev. Microbiology**., v. 31, n. 1, p. 45-53, 2005.

MADARA, J. L. The chameleon within: improving antigen delivery. **Science**, v. 277, p.910-911, 1997.

MAJOWICZ, S.E.; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F.J.; KIRK, M.; O'BRIEN, S.J.; JONES, T.F.; FAZIL, A.; HOEKSTRA, R.M.. International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness' Studies. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clin Infect Disease**. 50:882–889. 2010.

MAIORKA, A.. Impacto da saúde intestinal na produtividade avícola. In: V SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. **Anais**. Chapecó, p.26-41. 2004.

MALORNY, B.; HOORFAR, J.; BUNGE, C.; HELMUTH, R.. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Applied Environment Microbiology*, v.69, p.290–296. 2003.

MATHIVANAN, R.; KALAIARASI, K. *Panchagavya* and *Andrographis paniculata* as alternative to antibiotic growth promoters on haematological, serum biochemical parameters and immune status of broilers. **Journal Poultry Science**, 44, 198-204. 2007.

MCGHIE, E.J.; BRAUN, L.C.; HUME, P.J.; HUMPHREYS, D.; KORONAKIS, V. *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. **Curr Opin Microbiology**, v.12, p.117-124. 2009.

MEAD, G.; LAMMERDING, A.M; COX, N.; DOYLE, M.P.; HUMBERT, F.; KULIKOVSKIY, A.; PANIN, A.; NASCIMENTO, V.P.; WIERUP, M. The *Salmonella* on Raw Poultry Writing Committee. Scientific and Technical Factors Affecting the Setting of *Salmonella* Criteria for Raw Poultry: A Global Perspective. **Journal of Food Protection**, 73(8):1566–1590. 2010.

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

MUNIZ, E. C.. Atualidades no Estudo das Salmoneloses Aviárias. In: Simpósio Brasil Sul de Avicultura, Chapecó, SC. **Anais...** 2012.

NASCIMENTO, V. P.; SANTOS, L. R.; RODRIGUES, L. B.; LANDINEZ, M. P.; PERDONCINI, G.; SIERRA, Y. M.; BORSOI, A.. Exigências Internacionais na qualidade

microbiológica da carne de frangos para exportação. In: Simpósio Brasil Sul de Avicultura, Chapecó, SC. **Anais...** 2012.

NAYAK, S.K. Probiotics and immunity: A fish perspective. **Fish & Shellfish Immunology**, 29:2-14. 2010.

NERMES, M.; KANTELE, J.M.; ATOSUO, T.J.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E.. Interaction of orally administered *Lactobacillus rhamnosus* GG with skin and gut microbiota and humoral immunity in infants with atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 41:370-377. 2011.

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

NURMI, E.; NUOTIO, L.; SCHNCITZ, C.. The competitive exclusion concept: Development and future. **International Journal Food Microbiology**. 15:237–240. 1992.

O'TOOLE, P.W.; COONEY, J. Review Article: Probiotic bacteria influence the composition and function of the intestinal microflora. **Interdisciplinary perspectives on infectious disease**, 9p, 2008.

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

PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, H.S.; GÓRNIAC, S.L. **Farmacologia aplicada à avicultura**: Boas Práticas no Manejo de Medicamentos. Editora Roca Ltda, 2005.

PARKER, R. B.. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Animal Nutrition Health**, London/United Kingdom, v. 29, p.4-8. 1974.

PARRY, S. M.; ALLEN, W. D.; PORTER, P. Intestinal immune response to *Escherichia coli* antigens in germ-free chicken. **Immunology**, v. 32, p. 731-741, 1977.

PARRY, C.M. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella enterica*. **Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, p. 467–472, 2003.

PELICANO, E.R.L.; SOUZA, P.A. de; SOUZA, H.B.A. de; OBA, A.; NORKUS, E.A.; KODAWARA, L.M.; LIMA, T.M.A. Effect of different probiotics on broiler carcass and meat quality. **British Journal Poultry Science**, 5, 207-214. 2003.

PICKLER, L.; SANTIN, E.; SILVA, A. V. F.. Alternativas aos antibióticos para equilibrar a microbiota gastrointestinal de frangos. **Archives of Veterinary Science**, v.16, n.3, p.1-13. 2011.

PLUSKE, J.R.; HAMPSON, D.J.; WILLIAMS, I.H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Production Science**, v.51, p.215-236, 1997.

RAMOS, L.S.N. **Aditivos alternativos a antibióticos em rações para frangos de corte**. 2009. 86 folhas. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agrárias/Universidade Federal do Piauí. 2009.

RYCHLIK, I.; KARASOVA, D.; SEBKOVA, A.; VOLF, J.; SISAK, F.; HAVLICKOVA, H.; KUMMER, V.; IMRE, A.; SZMOLKA, A.; NAGY, B. Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for chickens. **BMC Microbiology**, v.9, n.268, p.1-9. 2009.

RODRIGUES, D. P.. Perspectivas atuais e falhas no diagnóstico antigênico de *Salmonella* spp: importância no reconhecimento dos sorovares circulantes, emergentes e exóticos In: Seminário Internacional Sobre Salmoneloses Aviárias, 2011, Rio de Janeiro, RJ. **Anais...**, 1 CD-ROM.

ROLAND, K.; TINGE.S.; WARNWER, E.; SIZEMORE, D. Comparison of different attenuation strategies in development a *Salmonella* Hadar vaccine. **Avian Disease**, v.48, p.445-452. 2004.

ROMANIN, D.; SERRADELL, M.; GONZALEZ MACIEL, D.; LAUSADA, N.; GARROTE, G.L.; RUMBO, M.. Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. **International Journal of Food Microbiology**, 140:102-108. 2010.

ROSSI JUNIOR, O. D; BERCHIERI JÚNIOR, A.; FELIPE, L. M. 2009. Agentes de interesse em saúde pública associados a produtos de origem avícola. p.1039-1053. In: **Doenças das Aves**. Berchieri Júnior, A., Silva, E.N.; Di Fábio, J., Sesti, L.; Zuanaze, M.A.F. (eds.). Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. Campinas, SP, Brasil. 2009.

ROY, P.; DHILLON, A.S.; LAUERMAN, L.H.; SCHABERG, D.M.; BANDLI, D.; JOHNSON, S. Results of *Salmonella* isolation from poultry products, poultry, poultry environment, and other characteristics. **Avian Diseases**, v.47, p.17-24, 2002.



SAGPyA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación). Área avícola-Dirección de Animales Menores y Granja. 2009.

SANTOS, I. I. Efeitos de probiótico, óleos essenciais, e enzimas em parâmetros produtivos e sanitários de frangos de corte. 2010. 207f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2010.

SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; FRANCHIN, P. R.; POZZATTI, P.; ALVES, S. H.; MORAES, C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela, frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, n.3, p. 803-808, 2007.

SCHREZENMEIR, J.; DEVRESE, M. Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. **Am J Clin Nutr**. V. 73, n.2, Suppl. (361-64), 2001.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **Clinical Microbiology Revision**, v. 17, p.14-56, 2004.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, vol. 4, núm. 2, maio-agosto, pp. 85-100. 2002.

SILVA, C. A.. Equilíbrio intestinal: Um desafio para a promoção do desempenho. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/MA-suinocultura/saude/artigos/equilibrio-intestinal-desafio-promocao-t809/165-p0.htm>>. Acesso em: 15 de Novembro 2011.

SIMON, O.; JADAMUS, A., VAHJEN, W.. Probiotic feed additives - effectiveness and expected modes of action. **Journal Animal Feed Science**. 10:51–67. 2001.

SOEJARDI, A. S.; RUFNER, R.; SNOEYENBOS, G. H.; WEINACK, O. M. Adherence of *Salmonellae* and native gut microflora to the gastrointestinal mucosa of chicks. **Avian Diseases**, v. 26, p. 576-584, 1982.

STERZO, E. V.; PAIVA, J. B.; MESQUITA, A. L.; FREITAS NETO, O. C.; BERCHIERI, Jr A. Organic acids and/or compound with defined microorganisms to control *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* experimental infection in chickens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 9, n.1 p. 69 – 73, 2007.

TAUXE, R. V.; DOYLE, M.P.; KUCHENMÜLLER, T.; SCHLUNDT, J.; STEIN, C.E. Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infection. **International Journal of Food Microbiology**, v.139, p.16-28. 2010.

THOMPSON, K. L.; APPLGATE, T.J. Feed withdrawal alters small-intestinal morphology and mucus of broiler. **Poultry Science**, v.85, p.1535-1540. 2006.

TOZETTO, S. M. **Sorotipos e tipagem molecular de isolados de *Salmonella enterica* no Paraná no período de outubro de 2002 a maio de 2004**. 83 folhas. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

VAN IMMERSEEL, F.; METHNER, U.; RYCHLIK, I.; NAGY, B.; VELGE, P.; MARTIN, G.; FOSTER, N.; DUCATELLE, R.; BARROW, P.A. Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity. **Epidemiology Infectious**, v. 133, n. 6, p. 959-978, 2005.

VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; PASMANS, F.; HUYGHEBAERT, G.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. **Avian Pathology**, v.33, p.537-549. 2004.

VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J., MEULEMANS, G.; PASMANS, F.; VELGE, P.; BOTTREAU, E.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.. Invasion of *Salmonella* Enteritidis in avian intestinal epithelial cells in vitro is influenced by short-chain fatty acids, **International Journal of Food Microbiology**, 85, 237 – 248. 2003.

VAN ASTEN, A.J.A.M.; VAN DIJK, J.E. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v.44, n.3, p.251-259. 2005.

VASSALO, M.; FIALHO, E.T.; OLIVEIRA, A.I.G. Probióticos para leitões dos 10 a 30 Kg de peso vivo. **Revista Sociedade Brasileira Zootecnia**, Viçosa, v.26, n.1, p.131-138, 1997.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de Patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, v.33, n.4, p.406-414. 2009.

WATERS, S. M.; MURPHY, R. A.; POWER, R. F. G. Assessment of the effects of nurmi-type cultures and a defined probiotics preparation on a *Salmonella Typhimurium* 29E challenge in vivo. **Journal of Food Protection**, v. 68 p. 1222-1227, 2005.

WEIR, D. M.; BLACKWELL, C. C. Interaction of bacteria with the immune system. **Journal of Clinical Immunology**, v. 10, p. 1-2, 1983.

WEISS, G.; RASMUSSEN, S.; ZEUTHEN, L. H.; NIELSEN, B. N.; JARMER, H.; JESPERSEN, L.; FROKIAER, H.. *Lactobacillus acidophilus* induces virus immune defence genes in murine dendritic cells by a toll-like receptor-2-dependent mechanism. **Immunology**, 131(2), 268–281. 2010.

WILLIS, W.L.; ISIKHUEMHEN, O.S.; HURLEY, S.; OHIMAIN, E.I.. Effect of phase feeding of fungus Myceliated grain on oocyst excretion and performance of boiler chicken. *International Journal Poultry Science*,10(1): 1-3. 2011.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). “One World, One Health”. VALLAT, B. Editorials. Disponível em: <http://www.oie.int/for-the-media/editorials/detail/article/one-world-one-health/>. Acesso em: 25 nov. 2012.

YAO, CHI, SU., et al., Emergence of *Salmonella enteric* Serovar Potsdam as a Major Serovar in Waterfowl Hatcheries and chicken eggs. *Avian diseases*, v. 55(2), p. 217 -222, 2011.

## **CAPÍTULO 1**

### **PROBIÓTICOS DE CULTURAS DEFINIDAS E INDEFINIDAS NO CONTROLE DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS EM FRANGOS DE CORTE**

O Capítulo foi elaborado conforme as normas para publicação no

*Journal of Applied Poultry Research.*

## PROBIÓTICOS DE CULTURAS DEFINIDAS E INDEFINIDAS NO CONTROLE DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS EM FRANGOS DE CORTE

Carvalho, Erich Helfer; Mendes, Angélica Signor; Takahashi, Sabrina Endo; Assumpção, Rosângela; Santos, José Rodolfo dos; Tagliari, Vinicius Zancanaro; Oldoni, Ivomar; Assayag Jr, Mario Sérgio; Bonamigo, Douglas Vanderlei; Souza, Cleison de.

Laboratório de Inovações Avícolas, Departamento de Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.

### RESUMO

Em saúde pública, as *Salmonellas* destacam-se com grande importância pela sua ampla e variada ocorrência no homem e em animais, sendo que as aves ocupam o ponto central na epidemiologia das Salmoneloses entéricas. A *Salmonella* Enteritidis é um dos principais sorovares encontrados em aves que estão relacionados com Salmoneloses em humanos. Portanto, há o interesse contínuo de encontrar as ferramentas mais eficazes para prevenir os plantéis da infecção e da contaminação de produtos de aves. As culturas probióticas têm demonstrado sucesso no controle de *Salmonella*. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia dos probióticos de diferentes constituições: de culturas definidas e de culturas indefinidas no controle de *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte, identificando qual a constituição e qual ou quais probióticos testados é mais eficaz. Foram avaliados o desempenho zootécnico e a contagem e o isolamento de *Salmonella* Enteritidis. Probióticos de culturas definidas e probióticos de culturas indefinidas demonstraram sua eficácia na redução de células de *Salmonella* Enteritidis, mas não houve diferenças ( $p \geq 0,05$ ) entre as constituições de probióticos. Dois dos quatro probióticos utilizados neste experimento, T2 (cultura definida) e T5 (cultura indefinida) destacaram-se como os mais eficazes no controle de *Salmonella* Enteritidis.

**Palavras-Chave:** Saúde das aves, segurança alimentar, probióticos.

## INTRODUÇÃO

Em saúde pública, as *Salmonellas* destacam-se com grande importância pela sua ampla e variada ocorrência no homem e em animais (mamíferos, répteis e aves), sendo que as aves ocupam o ponto central na epidemiologia das Salmoneloses entéricas, representando um reservatório de grande importância sanitária e de difícil controle [1].

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e compreende as espécies *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *Salmonella enterica* está dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* [2] onde se incluem a *Salmonella enterica enterica* sorovar Enteritidis [3]. A *Salmonella* Enteritidis e a *Salmonella* Typhimurium são os principais sorovares encontrados em aves que estão relacionados com Salmoneloses em humanos [4].

Atualmente, o gênero *Salmonella* spp. é composto por 2.610 sorovares, baseados em reações bioquímicas e sorológicas [5]. Somente cerca de 10% destes sorovares já foram isolados de aves e apenas uma pequena parcela é comum em granjas de frangos de corte. Sorovares prevalentes em seres humanos como Typhimurium e Enteritidis também são comuns em frangos de corte [6].

A *Salmonella* Enteritidis é o patógeno entérico, pertencente à família Enterobacteriaceae, de origem alimentar, mais frequentemente descrito na literatura nas ocorrências de toxiinfecções em seres humanos. A importância deste microrganismo decorre de sua prevalência significativa com distribuição mundial nos lotes de frango de corte e suas implicações na saúde pública [7].

Nos últimos anos, a utilização de antimicrobianos e vacinas inativadas e atenuadas para limitar ou prevenir as infecções com a *Salmonella* spp. em medicina veterinária tem sido questionada devido ao desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos, como

também aos riscos potenciais dos resíduos dos antibióticos e dos adjuvantes das vacinas em produtos alimentares derivados de animais para o consumo humano [8]. Por este motivo, o seu uso foi sendo gradualmente restrito e foram exploradas outras ferramentas para o controle desta doença, assim como a exclusão competitiva, administrando prebióticos e probióticos [9].

Culturas probióticas têm sido avaliadas para esta finalidade com algum sucesso [10]. Os probióticos são constituídos por microrganismos vivos e viáveis normalmente presentes no trato gastrointestinal ou de vida exterior (ex. *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*). Estes podem ser constituídos por culturas indefinidas em que nem todos os seus microrganismos são conhecidos, ou culturas definidas, nas quais a sua composição é conhecida [11].

Neste contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia dos probióticos de diferentes constituições: de culturas definidas e de culturas indefinidas no controle de *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte, identificando qual a constituição e qual ou quais probióticos testados é mais eficaz.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no aviário experimental do Laboratório de Inovações Avícolas/LINAV da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Dois Vizinhos. Os procedimentos da pesquisa foram submetidos e aprovados pelo Comitê de ética e pesquisa animal da referida universidade, seguindo as determinações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### **Animais, Ambiente e Dieta do Experimento**

Utilizaram-se 390 frangos de corte com peso médio inicial de  $47,37 \pm 0,31$ g, fêmeas, da linhagem Cobb 500 vacinados no incubatório contra doença de Marek, Bouda Aviária e Bronquite Infeciosa.

As aves foram mantidas do 1° ao 31° dia de vida em temperatura ideal de conforto em função da idade, com fornecimento de água e ração à vontade, sendo a dieta balanceada a base de milho e farelo de soja e utilizadas quatro fases de rações experimentais: fase pré-inicial (1 a 8 dias), a fase inicial (9 a 18 dias de idade), fase de crescimento (19 a 26 dias de idade) e fase final (27 a 31 dias de idade). Com exceção da ração final todas as demais dietas continham coccidiostático e melhorador de desempenho (Nicarbazina, Narasina e Enramicina na ração pré-inicial e inicial; Salinomicina e Enramicina na ração de crescimento e na ração final sem coccidiostático e promotor de crescimento). As dietas foram formuladas de acordo com as exigências nutricionais indicadas por Rostagno et al. [12].

### **Delineamento Experimental**

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com 5 tratamentos e 6 repetições cada, totalizando 30 boxes com 13 aves/boxe (densidade de 13 aves/m<sup>2</sup>). As 390 aves foram distribuídas aleatoriamente nas unidades experimentais. Os cinco tratamentos foram: T1 - Controle sem probiótico; T2 - Probiótico A (cultura definida, forma liofilizada, 7 cepas: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*); T3 - Probiótico B (cultura definida, forma liofilizada, 11 cepas: *Lactobacillus bulgaricus* (3 cepas), *Lactobacillus casei* (2 cepas), *Lactobacillus cellobiosus* (2 cepas), *Lactobacillus fermentum* (3 cepas) e *Lactobacillus helveticus* (1 cepa); T4 - Probiótico C (cultura indefinida, forma líquida, microflora intestinal de aves SPF (*Specific Pathogen Free*) bactérias anaeróbicas, bactérias do gênero *Enterococcus* e bactérias produtoras de ácido láctico); T5 - Probiótico D (cultura indefinida, forma liofilizada, microflora intestinal de aves SPF (*Specific Pathogen Free*)).



Todos os probióticos são produtos comerciais disponíveis no mercado brasileiro e registrados no Ministério da Agricultura. A via de aplicação foi a água de bebida das aves. Os probióticos foram fornecidos 1 hora após a inoculação de *Salmonella* Enteritidis, com 12 horas de tratamento com probióticos por dia, durante 3 dias consecutivos (1º, 2º e 3º dia de idade das aves).

### **Preparação do inóculo de *Salmonella* Enteritidis e desafio das aves**

A cepa de *Salmonella* Enteritidis, isolada de uma amostra de campo resistente ao ácido nalidíxico (100µg/mL de meio), foi recuperada a partir de culturas liofilizadas. A cultura foi semeada em xilose ágar desoxicolato lisina (XLD) e incubadas a 37° C durante 24 horas. Para o preparo do inóculo uma colônia foi retirada do ágar estoque e incubada em solução de BHI (*Brain Heart Infusion*) por 24h a 37°C. Em seguida, semeou-se em uma placa de Ágar Mueller Hinton por 24h a 37°C. A placa foi lavada, com solução fisiológica estéril, e retirou-se o líquido que foi diluído até a concentração 4 da escala de MacFarland, que corresponde a concentração de  $1,2 \times 10^9$  de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Salmonella* Enteritidis/ml. Foram realizadas diluições seriadas para a determinação das UFC.

No momento do alojamento todas as aves foram inoculadas com 1 ml de uma solução contendo  $1,2 \times 10^9$  UFC de *Salmonella* Enteritidis/ml, através de uma pipeta estéril de 3 ml por via oroesofágica.

### **Desempenho zootécnico**

As variáveis zootécnicas analisadas foram: peso médio ao 1º, 5º, 7º, 14º, 21º, 28º e 31º dias de idade, mortalidade e conversão alimentar total conforme metodologia proposta por Miragliotta [13].

## **Análises Microbiológicas**

Aos 5 dias de idade (120 horas após inoculação ) e aos 31 dias de idade (ao abate das aves), 12 aves por tratamento por idade (2 aves escolhidas aleatoriamente de cada repetição) foram eutanasiadas por deslocamento cervical e necropsiadas para a coleta de forma asséptica dos órgãos. Aos 12 dias de idade foi realizada coleta de *swab* de cama em todos os 30 boxes para isolamento de *Salmonella* Enteritidis.

Para avaliar a eficácia dos tratamentos em relação à colonização de *Salmonella* Enteritidis no trato gastrointestinal realizaram-se culturas de amostras de *poll* de íleo, tonsilas cecais e cecos. Em relação à invasão nos órgãos internos, foram realizadas culturas de amostras de *poll* de fígado, coração e baço. Na avaliação da colonização do trato gastrointestinal e invasão dos órgãos internos foi realizado a técnica do Número Mais Provável de células bacterianas por grama, expresso em NMP/g, para contagem de células bacterianas e a técnica do enriquecimento seletivo no meio Semi-sólido Modificado *Rapapport Vassiliadis* (MSRV) para isolamento da *Salmonella* Enteritidis, expresso em % positividade. As análises microbiológicas foram realizadas em Laboratório de Saúde Animal reconhecido pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA) de uma empresa avícola do Brasil.

## **Contagem de *Salmonella* Enteritidis**

Foi utilizada a técnica do Número Mais Provável (NMP) de células bacterianas por grama, adaptado do protocolo recomendado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) [14], sendo realizada através dos seguintes procedimentos: pré-enriquecimento em água peptonada 1% na proporção 1:10 (amostra incubada em saco tipo Nasco a  $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/18\text{-}24\text{h}$ ); enriquecimento seletivo em caldo *Rapapport Vassiliadis* (RV) ( $42^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/18\text{-}24\text{h}$ ) utilizados 6 tubos de 9ml para cada amostra, inoculado 1ml de água

peptonada em 5 tubos (diluição  $10^{-2}$ ) e inoculado 1 ml de uma diluição na proporção 1:10 a partir da água peptonada (diluição  $10^{-3}$ ) no 6º tubo da série; plaqueamento a partir dos tubos de caldo *Rapaport Vassiliadis* (RV), retirado uma alçada e semeado os 6 tubos da série em ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) ( $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/18\text{-}24\text{h}$ ). Após foi observada a presença ou ausência de colônias com características fenotípicas de *Salmonella* spp. nas placas e tubos e submetidas à análise bioquímica em ágar tríplice de açúcar e ferro (TSI - *Triple Sugar Iron*), ágar lisina-ferro (LIA - *Lysine Iron Agar*), meio sulfeto-indol-motilidade (SIM - *Sulphur Indol Motility*), caldo de uréia e agar nutriente. ( $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/24\text{h}$ ) e análise sorológica.

Após confirmação dos tubos que apresentaram crescimento de colônias positivas para *Salmonella* spp. registrou-se o número de tubos positivos para a série de 5 tubos, e se houve positividade no 6º tubo. A composição final das séries de leitura foi comparada à tabela de DeMAN [15], na qual o NMP por grama está estabelecido com diferentes limites de confiança, sendo 95% o limite adotado nesta pesquisa.

### **Isolamento de *Salmonella* Enteritidis**

Foi realizada através dos seguintes procedimentos: pré-enriquecimento em água peptonada 1% na proporção 1:10 (amostra incubada em saco tipo Nasco a  $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/18\text{-}24\text{h}$ ), enriquecimento seletivo no meio Semi-sólido Modificado *Rapaport Vassiliadis* (MSRV) ( $41^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/24\text{h}\pm 3\text{h}$ ), isolamento e seleção através da semeadura em ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) ( $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/24\text{h}$ ). Após foi observada a presença ou ausência de colônias com características fenotípicas de *Salmonella* spp., e submetidas à análise bioquímica em ágar tríplice de açúcar e ferro (TSI - *Triple Sugar Iron*), ágar lisina-ferro (LIA - *Lysine Iron Agar*), meio sulfeto-indol-motilidade (SIM - *Sulphur Indol Motility*), caldo de uréia e agar nutriente. ( $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}/24\text{h}$ ).

## **Análise Estatística**

Os resultados de desempenho zootécnico (peso médio, mortalidade e conversão alimentar) foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias de contagem do Número Mais Provável (NMP) de *Salmonella* Enteritidis foram transformadas aplicando-se a transformação de boxcox (lâmbda), realizada ANOVA e comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade para tratamentos com o mesmo número de parcelas e teste de médias de Scheffé a 5% para tratamentos com diferente número de parcelas. Os resultados de isolamento de *Salmonella* Enteritidis foram comparados utilizando o teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) a 5%. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico *R Development Core Team* [16].

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Desempenho Zootécnico**

Nas Tabelas 1 e 2 encontram-se os resultados de desempenho zootécnico de frangos de corte do 1º ao 31º dia de idade. A Tabela 1 apresenta os resultados de peso médio das aves nas diferentes idades submetidas aos tratamentos experimentais. Não foram observadas diferenças ( $p \geq 0,05$ ) em nenhuma das idades avaliadas. A Tabela 2 apresenta os resultados de conversão alimentar e mortalidade no período de 1 a 31 dias de idade, em que igualmente não foram observadas diferenças ( $p \geq 0,05$ ) em nenhuma das variáveis analisadas.

Os resultados encontrados para o desempenho zootécnico em relação a outros experimentos com probióticos remetem a uma observação descrita por Rossi et al. [17] que relata que a maioria das publicações existentes onde foi realizado um desafio com *Salmonella* patogênica, não apresentam diferenças nos resultados de desempenho zootécnico dos animais, e os que apresentam, não submetem os animais a um desafio sanitário. Esta dicotomia, entre

os dados zootécnicos e sanitários, dificulta a comparação dos resultados obtidos, com os dados de outros autores.

Fato este que acontece também nos estudos de outras ferramentas de controle de *Salmonella* como os ácidos orgânicos onde segundo Pickler et al [18] em avaliação do uso de ácidos orgânicos no desempenho de frangos de corte apresentam resultados controversos, provavelmente devido aos diferentes mecanismos de ação, condições ambientais, dose e produto utilizado e parâmetros avaliados.

Analisando estudos presentes na literatura observa-se que os resultados obtidos pela utilização de probióticos de culturas definidas e indefinidas são controversos em relação ao desempenho produtivo. Resumindo as observações de alguns autores sobre a influência de vários probióticos no desempenho produtivo dos animais, observam-se que autores verificam um efeito positivo, principalmente os que utilizam probióticos de culturas definidas [19, 20, 21].

Segundo Tellez et al. [22] ensaios em escalas comerciais indicaram que a administração apropriada de probióticos de culturas definidas para perus e frangos melhorou o desempenho zootécnico e reduziu os custos de produção [23]. De acordo com estes autores os dados demonstram claramente que a seleção de culturas de probióticos com eficácia terapêutica promove benefícios marcantes no desempenho das aves, e que as culturas definidas podem fornecer uma alternativa atraente para a terapia antimicrobiana convencional. Appelt et al. [24] verificaram melhor conversão alimentar de frangos de corte no período inicial (1-21 dia) quando alimentados com probiótico na ração, embora para a fase pré-inicial (1-7 dias de idade) não houve efeito do probiótico sobre o desempenho das aves.

Enquanto outros não observam qualquer efeito [25, 26]. Em relação a probióticos de culturas não definidas a bibliografia não indica quaisquer melhorias no desempenho zootécnico [27]. Bittencourt et al. [28] avaliando a adição do produto probiótico contendo

*Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium* e *Bifidobacterium bifidum* de 1 a 42 dias de idade para frangos de corte não encontraram influência sobre o desempenho. Silva et al. [29] utilizaram o mesmo produto probiótico nas mesmas concentrações mas encontraram melhor desempenho zootécnico no período de 0 - 21 dias nos frangos alimentados com probiótico.

Esta variabilidade dos dados pode ser devida a fatores relacionados com o produto e seu fabrico, o tipo de organismo que se utiliza, o método de produção do probiótico e viabilidade após a preparação, fatores de manejo ou ambientais, via de administração, forma de apresentação (líquida ou liofilizada), precocidade da administração, condições higiênicas da exploração, utilização de antibióticos, da combinação com prebióticos, visto que alguns possuem um efeito sinérgico [30].

### **Isolamento de *Salmonella* Enteritidis**

Os meios de enriquecimento seletivo recomendados pela “*Association of Official Analytical Chemist*” (AOAC) e pela “*Food and Drug Administration*” (FDA) são os caldos selenito cistina (SC) e tetrionato (TT), enquanto que, a “*International Organization for Standardization*” (ISO) recomenda TT e *Rappaport Vassiliadis* (RV) [31]. No Brasil a portaria nº 126 de, 03 de novembro de 1995 recomenda o uso dos caldos Tetrionato (TT) e *Rappaport Vassiliadis* [33]. Um método bastante utilizado no enriquecimento seletivo é o uso de meios semi-sólidos seletivos como o Semi-sólido Modificado *Rapapport Vassiliadis* (MSRV) [32]. O desempenho do MSRV foi significativamente maior quando comparado com o RV para a detecção de *Salmonella* em amostras de fezes em poedeiras e frangos comerciais [33].

Com relação ao isolamento de *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte, verifica-se que todos os grupos desafiados apresentaram alguma presença de *Salmonella* Enteritidis nas

diferentes idades avaliadas (5 e 31 dias) e materiais analisados (*pool* de órgãos e *swabs* de cama).

Conforme a Tabela 3, não foram encontradas diferenças significativas para o isolamento de *Salmonella* Enteritidis no que se refere à colonização do trato gastrointestinal (*poll* de íleo, tonsilas cecais e cecos) e em relação à invasão nos órgãos internos (*poll* de fígado, coração e baço) aos 5 dias e 31 dias de idade em nenhum dos probióticos utilizados em relação ao grupo controle.

Mesmo sendo observadas diferenças numéricas na frequência de amostras positivas entre os tratamentos, demonstrando uma redução numérica no isolamento de *Salmonella* Enteritidis aos 5 dias de idade em *pool* de íleo, tonsilas cecais e cecos por todos os probióticos utilizados em comparação ao controle, sendo que o T5 (cultura indefinida liofilizada) reduziu 50%, T2 e T3 (culturas definidas) reduziram 42% e T4 (cultura indefinida líquida) reduziu 25%, não apresentaram diferença estatística ( $p \geq 0,05$ ).

Estes resultados podem estar baseados primeiramente no fato da *Salmonella* Enteritidis possuir alta capacidade invasiva e que podem facilmente ser encontrada nas células da lâmina própria e entrarem na mucosa cecal [34]. Também pelo fato de que a pré-exposição à *Salmonella* antes de um tratamento com probióticos de culturas indefinidas pode reduzir substancialmente a proteção de culturas eficazes [35], conceito este evidenciado por Higgins et al [36] também para probióticos de culturas definidas que ao avaliar o efeito de um probiótico de cultura definida administrado 24 horas antes e 24 horas após desafio com *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte, observou diferença significativa na redução de *Salmonella* Enteritidis (redução de 76%) quando o probiótico foi administrado 24 h antes do desafio e não ocorreu redução significativa (somente 8%) 24 h após desafio. Borsoi et al [37] analisando o comportamento da *Salmonella* Enteritidis após inoculação de  $10^5$  UFC/ml em

frangos de corte com um dia de idade demonstraram a presença de *Salmonella* Enteritidis no fígado e ceco em 6 horas após inoculação.

A alta concentração bacteriana utilizada no desafio das aves ( $1,2 \times 10^9$  UFC/ml) e o uso dos probióticos de forma individualizada também podem ter contribuído por esta menor redução da colonização intestinal e invasão dos órgãos. Revolledo et al [38] utilizando  $10^7$  UFC/ml de *Salmonella* Typhimurium, avaliaram o efeito de um probiótico de cultura definida (12 cepas), um abiótico  $\beta$ -glucano (GoldCell-Biorigin<sup>®</sup>) e um probiótico de cultura indefinida (Aviguard<sup>®</sup>) administrado isoladamente ou em associação. Evidenciaram que o probiótico de cultura indefinida, probiótico de cultura definida e glucanos não foram eficientes na prevenção da colonização e invasão dos órgãos em aves com um alto desafio mas foram eficazes quando os tratamentos foram associados de probióticos de culturas indefinidas com o probiótico de cultura definida e/ou glucano. Estrada et al [39] avaliando os efeitos de um probiótico de cultura definida (Broilact<sup>®</sup>) e um probiótico de cultura indefinida (Aviguard<sup>®</sup>), fornecidos com 1 dia de idade, sobre a invasão e colonização de *Salmonella* Enteritidis ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) não encontraram diferenças significativas aos 12 dias de idade sobre a invasão de *Salmonella* Enteritidis no fígado e baço e na colonização de tonsilas cecais. Somente aos 20 dias de idade o probiótico de cultura definida apresentou uma redução de 15% a mais no fígado e baço da invasão por *Salmonella* que o probiótico de flora indefinida.

Em contrapartida Vicente et al [40] avaliando um probiótico de cultura definida (Floramax<sup>®</sup>B11) de forma líquida e liofilizada via água de bebida durante três dias consecutivos (1 a 3 dias de idade), desafiando as aves com  $10^4$  UFC/ave de *Salmonella* Enteritidis 1 hora antes do início do tratamento, evidenciaram redução significativa da colonização de *Salmonella* Enteritidis em aves jovens. Segundo Vilà et al [41] avaliando o probiótico de cultura definida *Bacillus cereus* var Toyoi (Toyocerin<sup>®</sup>) com inoculação de  $2 \times 10^6$  UFC/ml foi capaz de reduzir o isolamento de *Salmonella* Enteritidis de frangos de corte.



Os resultados encontrados em relação ao isolamento de *Salmonella* Enteritidis na colonização do trato gastrointestinal e na invasão dos órgãos internos e a análise da literatura sobre a utilização de probióticos reforçam os conceitos de que o sucesso ou fracasso do tratamento com probióticos em frangos recém-nascidos depende de bactérias de rápido estabelecimento, no entanto, ainda não é conhecido exatamente o tempo ideal para atingir esse objetivo [42]. Para uma maior eficácia dos probióticos os pintos têm de ser livres de *Salmonella* antes do tratamento e criados em boas condições de biossegurança, especialmente durante os primeiros 2 dias após o tratamento, tempo este necessário para estabelecimento dos microorganismos administrados e algumas vantagens do tratamento de probióticos que incluem a facilidade de aplicação e antecipação da proteção (geralmente por spray no incubatório podendo ser associado à vacina de Bronquite Infecciosa com gota grossa). Wolfenden et al [43] também sugere que a aplicação via spray no incubatório é efetiva para a proteção dos pintos contra a infecção por *Salmonella* Enteritidis.

### **Contagem de *Salmonella* Enteritidis**

O uso de medidas de prevenção e controle para as doenças transmitidas por alimentos baseadas em risco tem se firmado como tendência de diretrizes internacionais. Este conceito de gestão vem sendo consolidado nos últimos dez anos pelo *Codex Alimentarius* e pelo *International Commission of Microbiological Specification for Foods* (ICMSF) com o desenvolvimento de métricas para mensurar e estipular metas de inocuidade, considerando a inter-relação entre a presença de um determinado perigo em um alimento em diferentes etapas da cadeia produtiva até o consumo e a probabilidade de ocorrência da doença na população [44]. Ao aplicarmos o conceito de análise quantitativa de risco é desejável que sejam realizadas análises quantitativas para uma informação mais precisa isto porque o nível de contaminação

do alimento, assim como o sorovar relacionado, estará diretamente relacionado ao risco de ocorrência da doença [45].

A disponibilidade de uma metodologia oficial para enumeração representa o fator limitante de maior impacto no caso da *Salmonella* spp. Atualmente são poucos os trabalhos publicados que utilizaram análises quantitativas em seus experimentos. Espera-se que esta limitação seja minimizada em médio prazo, visto que tramita em fase final a incorporação na ISO 6579:2002 do método de Número Mais Provável (NMP) Miniaturizado para enumeração de *Salmonella* spp. em alimentos baseado em Fravallo et al [46] [47]. Baseado nestas indicações de que a técnica do NMP poderá ser uma metodologia oficial para quantificação de *Salmonella* foi utilizada esta técnica para mensurar o quanto os probióticos podem reduzir a pressão de infecção de *Salmonella*, também com o objetivo de comparar os resultados deste trabalho com os futuros dados epidemiológicos que serão gerados após implementação desta técnica.

Na Tabela 4 apresentam-se a média e o desvio padrão da contagem de células de *Salmonella* Enteritidis (NMP/g) para cada tratamento.

Não foram encontradas diferenças ( $p \geq 0,05$ ) para a contagem de *Salmonella* Enteritidis no que se refere à invasão nos órgãos internos (*poll* de fígado, coração e baço) aos 5 dias em nenhum dos probióticos utilizados em relação ao grupo controle. Aos 31 dias foram encontradas diferenças ( $p \leq 0,05$ ) entre o controle e os demais probióticos, mas o grupo controle com menor contagem. Estes resultados não caracterizam eficácia no controle de *Salmonella* Enteritidis pelos probióticos utilizados frente à invasão nos órgãos internos aos 5 dias e 31 dias de idade. Estes resultados estão de acordo com Revollo et al [48] que avaliou o efeito de um probiótico de cultura definida (12 cepas) , um abiótico  $\beta$ -glucano (GoldCell-Biorigin<sup>®</sup>) e um probiótico de cultura indefinida (Aviguard<sup>®</sup>) administrado isoladamente ou em associação e demonstrou que a invasão do baço nos grupos tratados com probióticos

isoladamente foi maior que o grupo controle e que também não preveniram a invasão no fígado.

Em contrapartida, foi encontrado diferença ( $p \leq 0,05$ ) para a contagem de *Salmonella* Enteritidis no que se refere à colonização do trato gastrointestinal (*poll* de íleo, tonsilas cecais e cecos) aos 5 e 31 dias de idade. A diferença entre os níveis de colonização do ceco e invasão do fígado pode ser devido à fatores de virulência da colonização de *Salmonella* que são baseados em duas ilhas de patogenicidade da *Salmonella* (SPI 1 e 2) responsável pela infecção intestinal (SPI 1) e infecção sistêmica do hospedeiro (SPI 2) [49].

Na contagem de *Salmonella* Enteritidis referente à colonização do trato gastrointestinal (*poll* de íleo, tonsilas cecais e cecos) aos 5 dias de idade foram encontradas diferenças ( $p \leq 0,01$ ) entre o tratamento 1 (sem probióticos) com os demais tratamentos com probióticos (T2, T3, T4 e T5), mas sem diferenças ( $p \geq 0,05$ ) entre os tratamentos com probióticos. Foi obtida uma redução média de 126 NMP/g (57,5%) de *Salmonella* Enteritidis com a utilização de probióticos, comprovando a eficácia de todos os probióticos utilizados na redução da colonização do trato gastrointestinal por *Salmonella* Enteritidis. Resultados estes que estão de acordo com os resultados descritos inicialmente por Nurmi & Rantala [50] que comprovaram a eficácia de probióticos no controle de *Salmonella*, sendo que estes foram posteriormente suportados por vários estudos realizados em todo o mundo [51, 52].

Os resultados encontrados por [53] com probiótico oferecido na água de bebida dos animais no 1º, 19º, 20º e 21º dias de vida das aves indicam que o probiótico foi capaz de reduzir a excreção de *Salmonella* Minnesota no papo e ceco de frangos de corte, sendo essa redução de 56% e 51,1% respectivamente em comparação com as aves do controle positivo. Os probióticos que induzem regulação diferencial dos genes envolvidos com a apoptose celular podem resultar em aumento da apoptose no ceco das aves e devido ao fato de *Salmonella* ser um patógeno intracelular, sugere-se que este aumento pode ser um mecanismo pelo qual os

probióticos reduzem a colonização por *Salmonella* [54]. Higgins et al [55] defendem a hipótese de que o sistema imune inato de frangos de corte, especificamente macrófagos, desempenha um papel importante na redução da colonização de *Salmonella* Enteritidis com tratamento de probióticos.

Na contagem de *Salmonella* Enteritidis referente à colonização do trato gastrointestinal (*poll* de íleo, tonsilas cecais e cecos) aos 31 dias de idade foram encontradas diferenças ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos. O tratamento T2 com contagem de 17,5 NMP/g e o T5 com 30,8 NMP/g obtiveram diferenças ( $p \leq 0,05$ ) entre o grupo controle T1 e o probiótico do T3 e do T4, sendo os probióticos mais eficazes no controle da colonização do trato gastrointestinal por *Salmonella* Enteritidis. O T2 (probiótico cultura definida) e o T5 (probiótico cultura indefinida) reduziram em média 82,5 NMP/g e 69,2 NMP/g, respectivamente, em relação ao tratamento sem probiótico. Borsoi et al [56] verificando a presença e estimando o número mais provável de células de *Salmonella* utilizando o método do Número Mais Provável (NMP/carcaça) em 180 carcaças de frangos resfriadas a partir de três diferentes marcas comerciais adquiridas em varejos encontraram 64,7% das amostras entre 11 a 100 células e 35,3% entre 101 a 1100 células. Estes dados auxiliam na determinação do risco para sua própria redução, além do controle de *Salmonella* nas indústrias de alimentos, sendo que a quantificação de patógenos é apresentada pela FAO e OMS como controle de *Salmonella* e *Campylobacter* em carne de frangos, sendo necessário para reduzir riscos à saúde do consumidor.

A contaminação por *Salmonella* em carne de frango aparece como um problema em potencial e o risco de contaminação cruzada gerado podem ser proporcionais ao número de células presentes na carne de frango *in natura* [57]. Mesmo com a comprovação da eficácia dos probióticos no controle da colonização do trato gastrointestinal por *Salmonella* Enteritidis, os resultados encontrados pelo probióticos mais eficazes (T2 e T5) ainda não foram

suficientes para eliminar todos os riscos, sendo que em humanos há evidências de que a dose infectante de 10 a 1000 células de *Salmonella* já possam causar doenças alimentares [58], sugerindo que outras medidas de controle devam ser utilizadas em associação aos probióticos como prebióticos, simbióticos, ácidos orgânicos, biossegurança e vacinas.

### **Comparação das diferentes composições de probióticos: cultura definida versus cultura indefinida**

Na Tabela 5 apresentam-se os resultados da comparação das diferentes composições de probióticos: cultura definida e cultura indefinida, separando-os em três grupos analisados: sem probióticos (T1), probióticos de cultura definida (T2+T3) e probióticos de cultura indefinida (T4+T5) em relação à colonização do trato gastrointestinal (*poll* de íleo, tonsilas cecais e cecos), apresentando os resultados através da contagem de células de *Salmonella* Enteritidis (NMP/g) aos 5 dias e 31 dias de idade.

Diferenças ( $p \leq 0,01$ ) foram encontradas aos 5 dias de idade entre os grupos de probióticos de cultura definida e cultura indefinida e o tratamento sem probiótico, mas sem diferença ( $p \geq 0,05$ ) entre as constituições de probióticos. Os resultados encontrados demonstram que não há diferença na constituição dos probióticos no que diz respeito a culturas definidas e indefinidas, mas ambas são eficazes no controle de *Salmonella* Enteritidis. Resultado diferente foi encontrado por Waters et al [59] que demonstraram que culturas indefinidas são mais eficazes e Estrada et al [60] que demonstraram que probióticos de cultura definida são mais eficazes que probióticos de cultura indefinida. Estes resultados sugerem que as variações na eficácia dos probióticos podem ser devido às diferenças nas espécies microbianas, linhagens de microrganismos utilizados, aos métodos de preparação dos probióticos e, sobretudo a diferença na tecnologia utilizada na elaboração dos probióticos pelas empresas que os desenvolveram, pois ainda não se conhece a total e perfeita combinação entre as diversas cepas de microrganismos para a atuação “in vivo”,

não podendo afirmar quais das constituições de probióticos, culturas definidas ou indefinidas, são mais eficazes no controle de *Salmonella* Enteritidis. Não foram encontradas diferenças ( $p \geq 0,05$ ) para a contagem no que se refere à colonização do trato gastrointestinal aos 31 dias de idade.

## CONCLUSÕES

1. Não foram observadas diferenças ( $p \geq 0,05$ ) entre os tratamentos para desempenho zootécnico (conversão alimentar, mortalidade e peso médio) das aves e em nenhum dos *pools* de órgãos e idades avaliadas quando do isolamento de *Salmonella* Enteritidis.
2. Na contagem de *Salmonella* Enteritidis (NMP/g) foi comprovada a eficácia na redução da colonização do trato gastrointestinal de *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte de todos os probióticos testados.
3. Somente os probióticos do T2 e T5 obtiveram contagens de *Salmonella* Enteritidis menores que o controle aos 31 dias de idade. Sendo considerados, dos probióticos testados, os mais eficazes no controle de *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte.
4. Probióticos de Flora Definida (T2+T3) e Probióticos de Flora Indefinida (T4+T5) aos 5 dias foram eficazes na redução de células de *Salmonella* Enteritidis mas não houve diferenças ( $p \geq 0,05$ ) entre as constituições de probióticos, não podendo afirmar quais das constituições de probióticos, culturas definidas ou indefinidas, são mais eficazes no controle de *Salmonella* Enteritidis.

## REFERÊNCIAS

1. Borsoi, A., L. L. S. Moraes, C. T. P. Salle, and V. P. Nascimento. 2010. Número mais provável de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango resfriadas. *Ciência Rural*. 40(11):2338-2342.
2. Bopp, C.A., F. W. Brenner, J. G. Wells, and N. A. Strockbine. 2003. *Escherichia coli*, *Shigella* and *Salmonella*. Pages 459-474. In: *Manual of Clinical Microbiology*. P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F.C.Tenover, and R. H. Tenover, ed. ASM, Washington.
3. Pickler, L., E. Santin, and A. V. F. Silva. 2011. Alternativas aos antibióticos para equilibrar a microbiota gastrointestinal de frangos. *Archives of Veterinary Science*.16(3):1-13.
4. Borsoi, A., L. R. Santos, L. B. Rodrigues, H. L. S. Moraes, C. T. P. Salle, and V. P. Nascimento. 2011. Behavior of *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Enteritidis strains following Broiler Chick inoculation: Evaluation of cecal morphometry, liver and cecum bacterial counts and fecal excretion patterns. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42: 266-273.
5. Guibourdenche, M., P. Roggentin, M. Mikoleit, P. I. Fields, J. Bockemühl, P. A. D. Grimont, and F.-X. Weil. 2010. Supplement 2003 – 2007 (No. 47) to the White – Kauffmann – Le Minor scheme. *Research in Microbiology*. 161:26-29.
6. Gast, R., R. Guraya, J. Guard-bouldin, P. S. Holt, and P. S. Moore. 2007. Colonization of specific regions of the reproductive tract and deposition at different locations inside eggs laid by hens infected with *Salmonella* Enteritidis or *Salmonella* Heidelberg. *Avian Disease*. 51:40-44.
7. Gast, R. K.. 2003. *Salmonella* infections. Pages 567-599. In: *Diseases of poultry*. Y. M. Saif et al., 11th ed. Ames: Iowa State University.

8. Hasenstein, J.R., G. Zhang, and S.J. Lamont. 2006. Analyses of five gallinacin genes and the *Salmonella enterica* serovar Enteritidis response in poultry. *Infect. Immun.* 74:3375-3380
9. Rahimi, S., Z. M. Shiraz, T. Z. Salehi, M. A. K. Torshizi, and J. L. Grimes. 2007. Prevention of *Salmonella* infection in poultry by specific egg-derived antibody. *International Journal Poultry Science.* 6:230-235.
10. Higgins, S., A. Torres-Rodriguez, J. Vicente, C. Sartor, C. Pixley, G. Nava, G. Tellez, J. Barton, and B. M. Hargis. 2005. Evaluation of intervention strategies for idiopathic diarrhea in commercial turkey brooding houses. *Journal of Applied Poultry Research.* 14:345–348.
11. Schrezenmeir, J., and M. DeVrese. 2001. Probiotics, prebiotics and symbiotics – approaching a definition. *Am J Clin Nutr.* 73(2):361-64).
12. Rostagno, H. S., L. F. T. Albino, J. L. Donzele, P. C. Gomes, R. F. Oliveira, D. C. Lopes, A. S. Ferreira, and S. L. T. Barreto. 2005. Tabelas brasileiras para aves e suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais. 2th ed. Viçosa: UFV.
13. Miragliotta, M. Y. 2005. Avaliação das condições do ambiente interno em dois galpões de produção comercial de frangos de corte, com ventilação e densidade populacional diferenciados. PhD Diss. Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
14. BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2003. Secretaria da defesa Agropecuária. Instrução Normativa SDA N.62, de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. In: Diário da República Federativa do Brasil. Brasília.
15. Deman, J. C. 1983. MNP tables corrected. *European Journal of Applied Microbiology.* 17:301-305.



16. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation Stat. Computing, ISBN 3-900051-07-0. Available at: <http://www.r-project.org>.
17. Rossi, A. A., M. T. S. Padilha, I. I. Santos, and J. C. F. Padilha. 2007. Uso de Probiótico na prevenção de Salmoneloses em Frangos de Corte. *Ciência Agrotécnica*, Lavras. 31(4):1207-1211.
18. Pickler, L., R. M. Hayashi, M. C. Lourenço, L. B. Miglino, L. F. Caron, B. C. B. Beirão, A. V. F. Silva, and E. Santin. 2012. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 32(1):27-36.
19. Mountzouris, K. C., P. Tsirtsikos, E. Kalamara, S. Nitsch, G. Schatzmayr, and K. Fegeros. 2007. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. *Poultry Science*, 86(2), 309-317.
20. Vila, B., A. Fontgibell, I. Badiola, E. Esteve-Garcia, G. Jimenez, M. Castillo et al.. 2009. Reduction of *Salmonella enterica* var. Enteritidis colonization and invasion by *Bacillus cereus* var. *toyoi* inclusion in poultry feeds. *Poultry Science*. 88(5):975-979.
21. Mountzouris, K. C. et al. 2010. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. *Poultry Science*. 89:58-67.
22. Tellez, G., C. Pixley, R. E. Wolfenden, S. L. Layton, and B. M. Hargis. 2012. Probiotics/direct fed microbials for *Salmonella* control in poultry. *Food Research International*. 45:628–633.
23. Appelt, M. D., R. V. Nunes, P. C. Pozza, W. T. M. Silva, I. Venturi, and C. G. V. Nunes. 2010. Níveis de probiótico em rações de origem animal e vegetal para frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 39(4):765-771.

24. Ribeiro, A. M. L., L. K. Vogt, C. W. Canal, M. R. Cardoso, R. V. Labres, A. F. Streck, and M. C. Bessa. 2007. Effects of prebiotics and probiotics on the colonization and immune response of broiler chickens challenged with *Salmonella* Enteritidis. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 9(3):193-200.
25. Fonseca, B. B., M. E. Beletti, M. S. Silva, P. L. Silva, I. V. Duarte, and D.A. Rossi. 2010. Microbiota of the cecum, ileum morphometry, pH of the crop and performance of broiler chickens supplemented with probiotics. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 39(8):1756-1760.
26. Al-Zenki, S. F., A. Y. Al-Nasser, A. E. Al-Saffar, F. K. Abdullah, M. E. Al-Bahouh, A. S. Al-Haddad et al.. 2009. Effects of using a chicken-origin competitive exclusion culture and probiotic cultures on reducing *Salmonella* in broilers. *Journal of Applied Poultry Research*. 18(1):23-29.
27. Bitterncourt, L. C., C. C. Silva, P. D. S. R. Garcia, D. C. Z. Donato, R. Albuquerque, and L. F. Araújo. 2011. Influence of a probiotic on broiler performance. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 40(12):2739-2743.
28. Silva, W.T.M., R. V. Nunes, P.C. Pozza, M. S. S. Pozza, M. D. Appelt, and C. Eyng. 2011. Avaliação de inulina e probiótico para frangos de corte. *Acta Scientiarum Animal Science*.33(1):19-24.
29. Vicente, J., S. Higgins, L. Bilke, G. Tellez, D. Donoghue, A. Donoghue, and B. M. Hargis. 2007. Effect of probiotic culture candidates on *Salmonella* prevalence in commercial turkey houses. *Journal Applied Poultry Research*. 16(1):471–476.
30. Ripabell, G., M. L. Sammarco, A. Ruberto, G. Lannitto, and G. M. Grasso. 1997. Immunomagnetic separation and conventional culture procedure for detection of naturally occurring *Salmonella* in raw pork sausages and chicken meat. *Letters in Applied Microbiology, Oxford*. 24:493-497.
31. Brasil. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. 1995. Instrução Normativa 126 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). In: Diário da República Federativa do Brasil. Brasília.
32. Koerich, P. K. V. 2007. Detecção de *Salmonella* em Reprodutoras de Frango: Comparação entre Real Time PCR e dois Métodos Microbiológicos (Semi-Sólido Rappaport-Vassiliadis e Duplo Enriquecimento). 2007. PhD Diss. Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, RS.
  33. Voogt, N., M. Raes, W. J. B. Wannet, A. M. Henken, and A. W. Van de Giessen. 2001. Comparison of selective enrichment media for the detection of *Salmonella* in poultry faeces. Letters in Applied Microbiology. 32:89-92.
  34. Berndt, A., J. Pieper, and U. Methner. 2006. Circulating gamma delta t cells in response to *Salmonella* enterica serovar Enteritidis exposure in chickens. Infect. Immun. 74(7):3967-3978.
  35. Revolledo, L., A. J. P. Ferreira, G. C. Mead. 2006. Prospects in *Salmonella* control: Competitive exclusion, probiotics, and enhancement of avian intestinal immunity. Journal Applied Poultry Research. 15:341-351.
  36. Higgins, J. P., S. E. Higgins, A. D. Wolfenden, S. N. Henderson, A. Torres-Rodriguez, J. L. Vicente, B. M. Hargis, and G. Tellez. 2010. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture treatment timing on *Salmonella* Enteritidis in neonatal broilers. Poultry Science. 89:243-247.
  37. Borsoi, A., L. R. Santos, L. B. Rodrigues, H. L. S. Moraes, C. T. P. Salle, V. P. Nascimento. 2011. Behavior of *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Enteritidis strains following Broiler Chick inoculation: Evaluation of cecal morphometry, liver and cecum bacterial counts and fecal excretion patterns. Brazilian Journal of Microbiology. 42:266-273.
  38. Revolledo, L., C. S. A. Ferreira, A. J. P. Ferreira. 2009. Prevention of *Salmonella* Typhimurium colonization and organ invasion by combination treatment in broiler chicks. Poultry Science. 88:734-743.

39. Estrada, M. A. J., J. A. M. Hernández, L. G. Soto. 2010. Un probiótico definido aumenta la exclusión de *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis durante la crianza de aves ligeras. Vet. México. 41(1).
40. Vicente, J., A. Torres-Rodriguez, S. Higgins, C. Pixley, G. Tellez, A. M. Donoghue, and B. M. Hargis. 2008. Effect of a selected *Lactobacillus* spp-based probiotic on *Salmonella* Enteritidis-infected broiler chicks. Avian Diseases. 52:143–146.
41. Vila, B., A. Fontgibell, I. Badiola, E. Esteve-Garcia, G. Jimenez, M. Castillo, and J. Brufau. 2009. Reduction of *Salmonella enterica* var. Enteritidis colonization and invasion by *Bacillus cereus* var. *toyoi* inclusion in poultry feeds. Poultry Science. 88(5):975–979.
42. Revolledo, L., A. J. P. Ferreira, and G. C. Mead. 2006. Prospects in *Salmonella* control: Competitive exclusion, probiotics, and enhancement of avian intestinal immunity. Journal Applied Poultry Research. 15:341-351.
43. Wolfenden, A. D., C. M. Pixley, J. P. Higgins, S. E. Higgins, A. Torres, J. L. Vicente, B. M. Hargis, G. Tellez. 2007. Evaluation of spray application of a *Lactobacillus*-based probiotic on *Salmonella* Enteritidis colonization in broiler chickens. International Journal of Poultry Science. 6(7):493–496.
44. Machado, S. C. A. 2012. Aplicação de Métricas de Gerenciamento de Risco Microbiológico (Mrm) na Gestão da Cadeia Produtiva e a Importância de Dados Quantitativos. In: Simpósio Brasil Sul de Avicultura, Chapecó, SC. Anais...
45. Sanchez-Vargas, F. M., A. Maisam, B. Abu-El-Haija , and G. Gomez-Duarte. 2011. *Salmonella* infections: An update on epidemiology, management, and prevention. Travel Medicine and Infectious Disease. 9: 263-277.
46. Fravallo, P. et al.. 2003. Convenient method for rapid and quantitative assessment of *Salmonella enterica* contamination : the mini-MSRV MPN Technique. J Rapid Methods Automation Microbiol. 11:81-88.

47. Cox, N. A., J. A. Cason, and L. J. Richardson. 2011. Minimization of *Salmonella* contamination on raw poultry. *Annu. Rev. Food Science Technololy*. Accessed julho 2012. <http://www.annualreviews.org.usda>.
48. Revollo, L., C. S. A. Ferreira, and A. J. P. Ferreira. 2009. Prevention of *Salmonella* Typhimurium colonization and organ invasion by combination treatment in broiler chicks. *Poultry Science*. 88:734-743.
49. Borsoi, A., L. R. Santos, L. B. Rodrigues, H. L. S. Moraes, C. T. P. Salle, V. P. Nascimento. 2011. Behavior of *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Enteritidis strains following Broiler Chick inoculation: Evaluation of cecal morphometry, liver and cecum bacterial counts and fecal excretion patterns. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42:266-273.
50. Nurmi, E., M. Rantala. 1973. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature*. 241:210-211.
51. Williams, L. D., G. A. Burdock, G. Jimenez, and M. Castillo. 2009. Literature review on the safety of toyocerin, a non-toxigenic and non-pathogenic *Bacillus cereus* var. *toyoi* preparation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology : RTP*. 55(2):236–246.
52. Menconi, A., A.D. Wolfenden, S. Shivaramaiah, J. C. Terraes, T. Urbano, J. Kuttel, C. Kremer, B. M. Hargis, and G. Tellez. 2011. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture for the treatment of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in neonatal broiler chickens and turkey poults. *Poultry Science*. 90:561-565.
53. Westphal, P., E. C. Muniz, L. B. Miglino, L. N. Kuritza, M. C. Lourenço, and A.L. Kraieski. 2011. Utilização de produto probiótico à base de *Lactobacillus* adicionado na água para o controle de *Salmonella* Minnesota em frangos de corte. In: XXII Congresso Latino Americano de Avicultura. Anais..., Buenos Aires.
54. Higgins, S. E., A. D. Wolfenden, G. Tellez, B. M. Hargis, and T. Porter. 2011. Transcriptional profiling of cecal gene expression in probiótico and *Salmonella* challenged neonatal chicks. *Poultry Science* “in press”.

55. Higgins, J. P., S. E. Higgins, J. L. Vicente, A. D. Wolfenden, G. Tellez, and B. M. Hargis. 2007. Temporal effects of lactic acid bacteria probiotic culture on *Salmonella* in neonatal broilers. *Poultry Science*. 86:1662-1666.
56. Borsoi, A., L. L. S. Moraes, C. T. P. Salle, and V. P. Nascimento. 2010. Número mais provável de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango resfriadas. *Ciência Rural*. 40(11):2338-2342.
57. Jorgensen, F. et al. Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. *International Journal of Food Microbiology*. 76:151-164.
58. Poope, C. 1994. *Salmonella* Enteritidis in Canada. *International Journal of Food Microbiology*. 21:1-5.
59. Waters, S. M., R. A. Murphy, R. F. G. Power. 2005. Assessment of the effects of nurmi-type cultures and a defined probiotics preparation on a *Salmonella Typhimurium* 29E challenge in vivo. *Journal of Food Protection*. 68:1222-1227.
60. Estrada, M. A. J., J. A. M. Hernández, L. G. Soto. 2010. Un probiótico definido aumenta la exclusión de *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis durante la crianza de aves ligeras. *Vet. México*. 41(1).

## TABELAS

Tabela 1 - Médias e desvio padrão de peso corporal (g) de frangos de corte nas diferentes idades submetidos aos tratamentos experimentais.

<b>Idade</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>Anova: p-valor</b>
<b>1 dia</b>	47,68±0,74	47,50±0,88	47,18±0,95	47,23±0,46	47,25±1,10	0,86ns
<b>5 dias</b>	108,83±9,62	106,72±4,65	104,58±9,45	100,45±12,98	101,53±6,65	0,50ns
<b>7 dias</b>	146,71±10,98	150,48±7,25	152,17±10,44	146,61±14,86	139,47±13,71	0,35ns
<b>14 dias</b>	399,50±49,19	408,83±21,75	415,50±46,92	374,17±48,05	381,50±23,18	0,27ns
<b>21 dias</b>	833,67±90,12	843,83±52,30	872,17±71,61	772,33±71,72	829,67±60,86	0,18ns
<b>28 dias</b>	1328,83±152,14	1393,50±78,28	1400,83±99,35	1243,33±127,97	1428,67±147,55	0,10ns
<b>31 dias</b>	1451,83±87,03	1498,17±90,22	1503,00±119,94	1386,33±84,16	1472,83±85,32	0,12ns

ns= não significativo pela análise de variância ( $p \geq 0,05$ ).

Tabela 2 – Média e desvio padrão de conversão alimentar e mortalidade no período de 1 a 31 dias de idade nos diferentes tratamentos.

<b>Tratamentos</b>	<b>Conversão Alimentar (kg/kg)</b>	<b>Mortalidade (%)</b>
T1	1,620±0,138	26±16,62
T2	1,543±0,072	12±8,07
T3	1,518±0,055	15±18,84
T4	1,664±0,216	15±9,73
T5	1,594±0,121	18±15,13
<b>Anova: p-valor</b>	0,36ns	0,08ns

ns= não significativo pela análise de variância ( $p \geq 0,05$ ).



Tabela 3 - Número de amostras positivas em relação ao total de amostras analisadas (positivas/total (% positividade)) para *Salmonella* Enteritidis em *pool* de íleo, tonsilas cecais e cecos e *pool* de coração, fígado e baço aos 5 dias e 31 dias de idade e *swabs* de cama aos 12 dias de idade nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	<i>Pool</i> Íleo, Tonsilas Cecais, Cecos		<i>Pool</i> Coração, Fígado e Baço		<i>Swabs</i> de cama
	5 dias	31 dias	5 dias	31 dias	12 dias
<b>T1</b>	12/12 (100%)	9/12 (75%)	4/12 (33%)	8/12 (67%)	6/6 (100%)
<b>T2</b>	7/12 (58%)	6/12 (50%)	6/12 (50%)	9/12 (75%)	6/6 (100%)
<b>T3</b>	7/12 (58%)	11/12 (92%)	7/12 (58%)	10/12 (83%)	6/6 (100%)
<b>T4</b>	9/12 (75%)	9/12 (75%)	10/12 (83%)	10/12 (83%)	6/6 (100%)
<b>T5</b>	6/12 (50%)	8/12 (67%)	5/12 (42%)	6/12 (50%)	6/6 (100%)
<b>p-valor</b>	0,595ns	0,820ns	0,507ns	0,861ns	1ns

ns: não significativo ( $p \geq 0,05$ ) ao teste de Qui-quadrado.

Tabela 4 - Média e desvio padrão da contagem de células de *Salmonella* Enteritidis (NMP/g) em *pool* de íleo, tonsilas cecais e cecos e *pool* de coração, fígado e baço aos 5 dias e 31 dias de idade nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	NMP/g <i>Poll</i> Íleo, Tonsilas Cecais e Cecos		NMP/g <i>Poll</i> Coração, Fígado e baço.	
	5 dias	31 dias	5 dias	31 dias
T1	219,2±102,8 a	100,0±138,2 ab	100,0±162,5	45,0 ± 102,3 b
T2	85,8 ± 98,9 b	17,5 ±37,2 b	151,7±164,4	126,7 ±133,8 a
T3	110,0±141,6 b	143,3±147,8 ab	165,8±157,3	165,8±126,0 a
T4	122,5±133,8 b	220,0±162,5 a	248,3±131,1	145,0±126,6 a
T5	54,2 ± 61,3 b	30,8 ± 94,9 b	137,5±169,9	98,3 ± 129,5 ab
<b>Anova:</b>				
<b>p-valor</b>	0,001**	0,024*	0,058 ns	0,016*
<b>lâmbda</b>	0,22	-0,10	0,03	0,12

ns: não significativo;

\*\*significativo a 1% de probabilidade;

\*significativo a 5% de probabilidade.

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo Teste de Duncan a 5%.

Tabela 5 - Comparação das médias da contagem de *Salmonella* Enteritidis, pelo método do Número mais Provável de células bacterianas por grama (NMP/g), em pool de íleo, tonsilas cecais e cecos aos 5 dias e 31 dias de idade entre os tratamentos sem probióticos (T1), probióticos de culturas definidas (T2 + T3) e probióticos de culturas indefinidas (T4 + T5).

Tratamentos	NMP - Íleo, Tonsilas Cecais e Cecos	
	5 dias	31 dias
T1 (Sem probióticos)	219,2±102,8 a	100,0±138,2
Cultura definida	97,9 ± 120,1 b	80,4 ± 123,5
Cultura indefinida	88,3 ± 107,6 b	125,4 ± 80,4
Anova: p-valor	0,002**	0,996 ns
lâmbda	0,20	-0,10

ns: não significativo;

\*\*significativo a 1% de probabilidade

\*significativo a 5% de probabilidade

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo Teste de Scheffé a 5%.