

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
LEANDRO NAGAE KURITZA



Enterococcus faecium ATUANDO NA DINÂMICA DE
INFILTRAÇÃO CELULAR DA LÂMINA PRÓPRIA DE ÍLEO
E CECO DE FRANGOS DESAFIADOS COM *Salmonella*
Minnesota

CURITIBA
2012

LEANDRO NAGAE KURITZA



***Enterococcus faecium* ATUANDO NA DINÂMICA DE
INFILTRAÇÃO CELULAR DA LÂMINA PRÓPRIA DE ÍLEO
E CECO DE FRANGOS DESAFIADOS COM *Salmonella*
Minnesota**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias, Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, Área de Concentração:
Ciências Veterinárias, Setor de Ciências
Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientação: Prof.^a Dr.^a Elizabeth Santin

CURITIBA
2012


PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada "*Enterococcus faecium* ATUANDO NA DINÂMICA DE INFILTRAÇÃO CELULAR DA LÂMINA PRÓPRIA DE ÍLEO E CECO DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM *Salmonella minnesota*" apresentada pelo Mestrando LEANDRO NAGAE KURITZA declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09-CEPE/UFPR, que considerou o candidato *Apto* para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 27 de fevereiro de 2012


Professora Dra. Elizabeth Santin
Presidente/Orientadora


Dr. Alberto Back
Membro


Dr. Mario Sergio Assayag
Membro

Dedicatória

Dedico este trabalho a meus pais que me apoiaram em todas as minhas decisões durante toda a graduação e mestrado. A todos os meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando sempre e não me deixando desistir. Também a todos os amigos do LABMOR, que me ajudaram, não somente no experimento, foram parceiros para toda hora e por fim a minha orientadora Elizabeth Santin, com quem aprendi muitas coisas, no lado profissional como no pessoal. Muito obrigado a TODOS!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter permitido me deixar chegar aonde cheguei.

A minha família, por ter me ensinado a viver e por sempre acreditar em meus sonhos.

A Prof^ª. Dra. Elizabeth Santin, pela oportunidade de me ajudar a aprender e crescer, me tornando uma pessoa melhor.

A todos os integrantes do LABMOR da UFPR, que me ajudaram durante todo o experimento. A Mariana, Maristela e Larissa, que além de companheiras de laboratório, foram importantes para que eu chegasse ao final desta etapa. Gostaria de agradecer especialmente ao Léo e ao Patrick, que além de companheiros de mestrado foram amigos para todas as horas.

Aos meus amigos da faculdade e mestrado, Hayashi, Pelego, Fujita, e demais pessoas, que foram parceiros não apenas de mestrado, mas também amigos fora da universidade, e a todos mais que por um acaso eu esqueci. Muito obrigado pelo apoio em todas as horas.

Aos meus amigos de longa data que me incentivaram nestes anos todos, Caio e Diego.

A DSM Produtos Nutricionais Brasil Ltda. pelo suporte financeiro.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para que este mestrado tenha sido possível.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	11
PROBIÓTICOS NA AVICULTURA.....	16
RESUMO	16
ABSTRACT	17
INTRODUÇÃO	18
PROBIÓTICOS.....	19
Forma de ação dos probióticos.....	23
Probióticos e imunidade	24
Ação dos probióticos sobre a <i>Salmonella</i> spp.....	26
Considerações finais.....	28
Referências Bibliográficas	29
CAPÍTULO 2.....	33
ENTEROCOCCUS FAECIUM ATUANDO NA DINÂMICA DE INFILTRAÇÃO CELULAR DA LÂMINA PRÓPRIA DE ÍLEO E CECO DE FRANGOS DESAFIADOS COM <i>SALMONELLA</i> MINNESOTA.....	34
RESUMO	34
ABSTRACT	35
INTRODUÇÃO	36
MATERIAL E MÉTODOS.....	37
Animais e Instalações.....	37
Probiótico	38
Cepa de <i>Salmonella</i>	38
Coleta de materiais para microbiologia.....	38

Processamento das amostras para análise microbiológica	39
Coleta de material para análises histopatológicas e imunoistoquímicas.....	40
Análise das lâminas de histopatologia e imunoistoquímica.....	40
Análise estatística	40
RESULTADOS.....	41
Análises microbiológicas	41
Análises de Histopatologia e Imunoistoquímica.....	42
DISCUSSÃO.....	46
CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	49

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 – Probióticos que favorecem o desempenho zootécnico dos animais.....	21
Tabela 2 – Microorganismos considerados como probióticos	22
Tabela 3 – Efeitos dos probióticos sobre o sistema imunológico dos animais	25
Tabela 4 – Ação dos probióticos sobre <i>Salmonella</i> spp.....	28

Capítulo 2

Tabela 1 – Média e desvio padrão da Contagem de colônias de <i>Salmonella</i> em suabe de cloaca 48 horas após inoculação, papo e ceco aos 35 dias de idade nos diferentes tratamentos (Resultados expressos em Log ₁₀ UFC/g).....	41
Tabela 2 – Média e desvio padrão da Contagem de colônias de <i>Salmonella</i> em cama dos animais nos diferentes tratamentos aos 21 e 35 dias de idade (Resultados expressos em Log ₁₀ UFC/g).....	42
Tabela 3 – Contagem de células caliciformes, CD4+, CD8+ e relação CD4+:CD8+ por campo em íleo de frangos de corte aos 7 dias de idade (aumento de 100X).	42
Tabela 4 – Contagem de células caliciformes, CD4+, CD8+ e relação CD4+:CD8+ por campo em ceco de frangos de corte aos 7 dias de idade (aumento de 100X).....	43
Tabela 5 – Contagem de células caliciformes, CD4+, CD8+ e relação CD4+:CD8+ por campo em íleo e ceco de frangos de corte aos 35 dias de idade (aumento de 100X).	44

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

- Figura 1. Micrografia de ceco e íleo aos 7 dias de idade comparando as contagens de linfócitos T CD4+ e CD8+ nos diferentes tratamentos. A. Ceco, grupo tratado com *Enterococcus faecium*, linfócito T CD4+, B. Ceco, grupo controle, linfócito T CD4+, C. Íleo, grupo tratado com *Enterococcus faecium*, linfócito T CD8+, D. Íleo, grupo controle, linfócito T CD8+ (Imunoistoquímica, 40x)..... 43
- Figura 2. Micrografia de ceco e íleo aos 7 dias de idade comparando as contagens de células caliciformes nos diferentes tratamentos. A. Íleo, grupo tratado com *Enterococcus faecium*, B. Íleo, grupo controle, C. Ceco, grupo tratado com *Enterococcus faecium*, D. Ceco, grupo controle (H.E e Alcian Blue, 40x)..... 44
- Figura 3. Micrografia de íleo e ceco aos 35 dias de idade comparando as contagens de linfócitos T CD4+ e CD8+ nos diferentes tratamentos. A. Íleo, grupo tratado com *Enterococcus faecium*, linfócito T CD4+, B. Íleo, grupo controle negativo, linfócito T CD4+, C. Íleo, grupo controle positivo, linfócito T CD4+, D. Ceco, grupo tratado com *Enterococcus faecium*, linfócito T CD8+, E. Ceco, grupo controle negativo, linfócito T CD8+, F. Ceco, grupo controle positivo, linfócito T CD8+ (Imunoistoquímica, 40x)..... 45
- Figura 4 – Diferença entre a contagem de células CD4+, CD8+ e caliciformes por campo em ceco de frangos de corte aos 35 dias de idade (aumento de 100X) associados aos resultados de contagem de *Salmonella* em ceco. 46

RESUMO

A cadeia produtiva avícola busca cada vez mais aprimorar a qualidade da produção utilizando produtos que possibilitem melhor desempenho zootécnico, prezando também pelo bem estar animal. Estas medidas têm como objetivo melhorar a qualidade da carne e de ovos, tornando esses alimentos mais seguros para o consumidor. Para obter tais melhorias, são utilizados produtos que reduzam a contaminação por patógenos e sejam capazes de auxiliar o animal a responder melhor aos desafios. Dentre estes produtos estão os denominados probióticos, bactérias benéficas fornecidas aos animais, com o objetivo de melhorar o desempenho zootécnico dos mesmos, regulando a microbiota intestinal e estimulando o sistema imunológico. A presente dissertação busca estudar os efeitos de um probiótico contendo *Enterococcus faecium* sobre o sistema imunológico de frangos de corte desafiados contra *Salmonella* Minnesota. Esta dissertação foi dividida em dois capítulos: Capítulo 1, revisão bibliográfica sobre “Probióticos na Avicultura” e Capítulo 2, trabalho experimental “*Enterococcus faecium* atuando na dinâmica de infiltração celular da lamina própria de íleo e ceco de frangos desafiados com *Salmonella* Minnesota”. No trabalho experimental foram utilizados 60 frangos de corte de 1 a 35 dias, divididos em três tratamentos, sendo o Tratamento 1 controle negativo, o Tratamento 2 controle Positivo e o Tratamento 3 o grupo tratado com *Enterococcus faecium* (EF). As aves foram desafiadas aos 15 dias com *Salmonella* Minnesota (SM) e foi observado redução na contagem de SM aos 17 dias (suabe) e aos 35 dias (cama e ceco) nas aves consumindo EF comparado com aves desafiadas. Foi também observado maior contagem de células caliciformes em íleo e ceco, menor contagem de CD8⁺ em íleo e maior contagem de CD4⁺ em ceco de aves que consumiram EF comparada com grupo controle antes do desafio. Após o desafio as aves que consumiram EF apresentaram menor contagem de CD4⁺ e CD8⁺ em ceco comparado com aves desafiadas.

Palavras-chaves: Imunidade celular, probióticos, saúde intestinal, Salmonella,

ABSTRACT

The poultry production chain aims to increasingly improve the quality of their production. For this reason, products are used to provide better performance, focusing on the animal welfare as well. These measures aim to improve poultry meat and eggs, making them safer for consumers. To obtain this improvement, some products are used to reduce contamination by pathogens and help animals to better respond to presented challenges. Among the products used, there are probiotics, beneficial bacteria that are fed to animals, aiming to improve the growth performance of these animals, regulating the intestinal microbiota and stimulating the immune system. This dissertation explores the effect of using *Enterococcus faecium* as probiotic in diet on immune system of broiler chickens challenged against *Salmonella* Minnesota. This dissertation is divided in 2 chapters: Chapter 1, a Review “Probiotics in Poultry”, and Chapter 2, experimental study “*Enterococcus faecium* operation in the dynamics of cell infiltration into intestinal lamina propria of broilers challenged against *Salmonella* Minnesota”. On the present study were used 60 broilers from 1 to 35 days, divided into three treatments, being the Treatment 1 negative control, Treatment 2 positive control and Treatment 3 group treated with *Enterococcus faecium* (EF). Birds were challenged at 15 days with *Salmonella* Minnesota (SM), at 17 days (cloacal swab) and 35 days (litter and cecum). One observed reduction on SM counts compared to challenged birds, higher counts of goblet cells in ileum and cecum, lower counts of CD8+ cells in ileum and higher counts of CD4+ cells in cecum of broilers consuming EF, when compared with control group before challenge. After the challenge, birds that consumed EF showed lower counts of CD4+ and CD8+ cells, when compared to challenged animals.

Key-words: Cell immunity, intestinal health, probiotic, *Salmonella*,

INTRODUÇÃO GERAL

A indústria avícola tem uma grande preocupação com o controle de bactérias patogênicas, dentre elas a *Salmonella* spp.. Salmoneloses representam um sério problema de saúde pública tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos (Cardoso e Carvalho, 2006). Para monitorar e prevenir esta disseminação de patógenos foram tomadas medidas para que houvesse o aumento da biossegurança nas granjas, como a intensificação das análises dos plantéis e dos frigoríficos buscando contaminações.

Segundo Shinohara et al. (2008) verifica-se a presença de vários sorotipos de *Salmonella* nos plantéis de suínos, dos quais a alguns anos atrás não havia sequer descrição. Em aves, um estudo realizado por Voss-Rech et al. (2011) demonstraram que o principal sorotipo isolado de frangos de corte de amostras analisadas no laboratório Mercolab entre os anos de 2009 e 2010 foi o Minnesota. Estes mesmos autores também constataram que de todas as amostras analisadas, nenhuma apresentou positividade para Enteritidis, sugerindo mudanças nos sorotipos presentes nas produções avícolas.

Visando melhorar o desempenho zootécnico e reduzir a contaminação de frangos de corte por bactérias patogênicas, são utilizados diversos produtos, com função de promotores de crescimento. Dentre eles podemos citar enzimas, extratos de plantas, óleos, ácidos orgânicos, prebióticos, probióticos e suas associações (Yang et al., 2009; Huyghebaert et al, 2011).

O uso dos probióticos já é conhecido de longa data. Desde a antiguidade, bactérias produtoras de ácido lático eram usadas para conservar vegetais (Ouwehand e Vesterlung, 2004). O termo probiótico foi usado pela primeira vez por Lilly e Stillwell (1965) para definir metabólitos produzidos por protozoários que favoreceram o

crescimento de outras bactérias. Esta definição passou por adaptações por Havenaar et al. (1992) sendo descrita como uma única ou mistura de culturas de microrganismos vivos que, quando aplicado a animais ou em seres humanos, afetam benéficamente o hospedeiro, melhorando as propriedades da microbiota endógena.

Para animais de produção, além de balancearem a flora intestinal, os probióticos podem ser usados como promotores de crescimento, melhorando o desempenho zootécnico dos mesmos e diminuindo a contaminação de carcaças no abate. Estes podem ser obtidos a partir de fezes de aves adultas, sendo isoladas as bactérias de interesse a serem testadas (Nazef et al., 2008). Segundo Holzapfel et al. (2001), é recomendado que as bactérias a serem utilizadas como probióticas sejam produtoras de ácido láctico, se enquadrando em alguns gêneros, previamente conhecidos como mais seguros.

Dentre as bactérias probióticas, a maioria pertence aos gêneros *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. e *Enterococcus* spp., com um maior número de *Lactobacillus* spp. (Ouweland et al., 2002). Do gênero *Enterococcus* spp., o *Enterococcus faecium* (EF) apresenta feitos inibitórios contra *Escherichia coli* e *Salmonella* (Lewenstein, et al, 1979). Recentemente, foi apresentado que EF foi capaz de melhorar o desempenho e conversão alimentar de leitões (Mallo et al., 2010). Outra característica do EF é a capacidade de estimular o sistema imunológico. O EF aumentou a concentração de IgG, interleucina 4, interleucina 6 e interferon gama em ratos (Sun et al., 2010), melhorando a resposta imunológica dos mesmos. Frangos suplementados com EF e desafiados contra *Salmonella* Enteritidis apresentaram aumento nas contagens de células CD3+, CD4+ e CD8+ e IgM no sangue (Levkut et al, 2011), demonstrando que o sistema imunológico destas aves estava mais ativo.

A presente dissertação objetivou buscar os efeitos do *Enterococcus faecium* em frangos de corte desafiados contra *Salmonella* Minnesota. O trabalho foi dividido em dois capítulos, sendo o capítulo I uma revisão bibliográfica sobre a utilização de probióticos na avicultura e o Capítulo II um trabalho científico com o objetivo de avaliar o “*Enterococcus faecium* atuando na dinâmica de infiltração celular da lamina própria de íleo e ceco de frangos desafiados com *Salmonella* Minnesota”.

REFERÊNCIAS

CARDOSO TG, CARVALHO VM. Toxinfecção por *Salmonella* spp. **Revista do Instituto Ciências da Saúde**, v.24, n.2, p.95-101, 2006.

HAVENAAR, R.; TEN BRINK, B.; HUIS IN'T VELD, J. H. J. In: R. Fuller **Probiotics, the scientific basis** (pp. 209–224). 1.Ed., London: Chapman & Hall. 1992.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinincal Nutrition**, v.73(suppl), p.365S–373S, 2001.

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

LEVKUT, M.; REVAJOVÁ, V.; LAUKOVÁ, A. et al. Leucocytic responses and intestinal mucin dynamics of broilers protected with *Enterococcus faecium* EF55 and challenged with *Salmonella* Enteritidis. **Research in veterinary science**, in press, 2011.

LEWENSTEIN, A.; FRIGERIO, G.; MORONI, M. Biological properties of sf68, a new approach for the treatment of diarrhoeal diseases. **Current Therapeutic Research**, v.26, p.967–981, 1979.

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

MALLO, J.J.; RIOPEREZ, J.; HONRUBIA, P. The addition of *Enterococcus faecium* to diet improves piglet's intestinal microbiota and performance. **Livestock Science**, v.133, p.176-178, 2010.

NAZEF, L.; BELGUESMIA, Y.; TANI, A. et al. Identification of Lactic Acid Bacteria from Poultry Feces: Evidence on Anti-*Campylobacter* and Anti-*Listeria* Activities. **Poultry Science**, v.87, p.329–334, 2008.

OUWEHAND, A. C.; VESTERLUND, S. Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic Acid**

Bacteria Microbiological and Functional Aspects 3.ed. New York: Marcel Dekker 2005, Cap. 11.

OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.82, p.279-289, 2002.

SHINOHARA, N.K.S., DE BARROS, V.B., JIMENES, S.M.C. et al. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência da Saúde Coletiva**, v.13, n.5, p.1675-1681, 2008.

SUN, P.; WANG, J.; JIANG, Y. Effects of *Enterococcus faecium* (SF68) on immune function in mice. **Food Chemistry**, v.123, p.63–68, 2010.

VOSS-RECH et al

YANG, Y.; IJI, P.A.; CHOCT, M. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. **World's Poultry Science Journal**, v.65, p.97-114, 2009.

CAPÍTULO 1

PROBIÓTICOS NA AVICULTURA – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigo redigido de acordo com as normas da
Revista Archives of Veterinary Science

CAPÍTULO 1
PROBIÓTICOS NA AVICULTURA

(Probiotics on poultry production)

Leandro Nagae Kuritza

RESUMO

Com a proibição do uso de antibióticos como promotores de crescimento, aumentaram as pesquisas para desenvolver produtos naturais que fossem eficientes para melhorar o desempenho zootécnico dos animais de produção e manter a saúde intestinal dos mesmos, por meio da redução de patógenos e da imuno modulação do trato gastrointestinal. O uso de probióticos já é conhecido há muito tempo, entretanto os mecanismos de ação destes produtos e a interação dos mesmos com o organismo animal hospedeiro estão sendo mais profundamente pesquisados agora. Sabe-se que os probióticos auxiliam no equilíbrio da microbiota intestinal, podendo, conseqüentemente, melhorar o desempenho dos animais. Esta atividade se dá pela produção de diferentes metabólitos com ação antimicrobiana e também por competir por sítios de ligação de bactérias patogênicas na mucosa do trato gastrointestinal ou através de imunomodulação no organismo animal. Devido a todas as ações dos probióticos, os mesmos são utilizados como melhoradores de desempenho animal e também podem ser uma ferramenta para controle de enterobactérias de importância em saúde pública.

Palavras chave: Imunidade, *Salmonella* spp., Desempenho zootécnico, *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp.

ABSTRACT

As antibiotics growth promoters have been banned from animal feed, probiotics have received special attention as natural products to enhance performance from livestock and keep their gastrointestinal health. Although Probiotics benefits are known a long time ago, only now the mechanisms of action of these products are being better researched. It is known that probiotics could balance intestinal microbiota, improving animal performance. This activity happens through the production of different metabolites with antimicrobial activity and competition by bind sites on gastrointestinal mucosal. Due to all this probiotic actions, they were recommended as animal growth promoters and also could be an important tool to control enterobacterias considered risky to public health.

Keywords: Immunity, *Salmonella* spp., performance, *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp.

INTRODUÇÃO

Por muito tempo os antibióticos foram amplamente utilizados na produção animal, seja como forma de tratamento, ou como promotor de crescimento para favorecer o desenvolvimento dos animais, melhorando seu desempenho zootécnico, visando níveis mais altos de produtividade.

Atualmente seu uso é mais restrito como promotor de crescimento, atuando principalmente sobre a microbiota intestinal, favorecendo o equilíbrio da mesma. Com isso há a redução da competição por nutrientes entre a microbiota e o animal e a redução da atividade de patógenos (Anderson et al, 1999). Entretanto, o uso dos antibióticos como promotores de crescimento levou a preocupação com a seleção de bactérias patogênicas que se tornassem resistentes aos antibióticos usados na terapia humana. Assim, em 2006 o seu uso como promotor de crescimento foi proibido na União Européia (*EC Regulation* No. 1831/2003).

Após a retirada dos promotores de crescimento foram observados alguns efeitos negativos na produção. Foi verificado aumento no uso de antibióticos da linha humana como terapêuticos, podendo também acarretar no surgimento de bactérias patogênicas resistentes (Casewell et al., 2003). Também foi observada uma síndrome, identificada como “Dysbacteriosis”, na qual houve aumento no índice de cama molhada, crescimento exagerado da flora intestinal, má absorção, paredes intestinais delgadas e abauladas e queda no desempenho (Huyghebaert et al., 2011).

Segundo Castanon (2007), os mercados exportadores tiveram que se adaptar à legislação da União Européia para continuar exportando para estes países. O Brasil como maior exportador de carne de frango do mundo (ABEF 2010) e tendo a União Européia como importante mercado, recebendo em 2009 quase 14% das exportações brasileiras, também teve que se adaptar a essas medidas.

Tendo em vista a necessidade da melhoria de índices de produtividade zootécnica, juntamente com a preocupação com quadros de toxinfecção causados por bactérias patogênicas, especialmente as do gênero *Salmonella* spp., houve a intensificação na busca de produtos naturais capazes de proporcionar melhor desempenho para os animais, diminuir a contaminação das aves e das carcaças por bactérias patogênicas, sem deixar resíduos nocivos que possam causar problemas de saúde aos consumidores finais da carne de frango. Como exemplo de promotores de crescimento alternativos cita-se enzimas, extratos de plantas, óleos, ácidos orgânicos, prebióticos, probióticos e suas associações (Huyghebaert et al, 2011).

A utilização de probióticos em humanos data do final do século 19 e início do século 20 (Fuller, 1991). Em animais, na união europeia, seu uso foi regulamentado a partir da década de 70 (Anadón et al., 2006), mas a restrição do uso de antibióticos estimulou o crescimento das pesquisas.

Frente a isso, o objetivo desta revisão é abordar a interação dos probióticos sobre a microbiota intestinal, sua relação com a resposta imunológica e a sua capacidade de controlar infecções causadas por bactérias do gênero *Salmonella* spp.

PROBIÓTICOS

O termo “probióticos” foi usado pela primeira vez por Lilly e Stillwell (1965), para descrever substâncias produzidas por protozoários que estimulavam o crescimento de outros microorganismos. A partir deste momento diversos trabalhos foram desenvolvidos objetivando verificar esta ação probiótica. Posteriormente, Fuller (1989) definiu os probióticos como suplementos compostos de microorganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro por meio do equilíbrio da microbiota intestinal. Mais tarde, Havenaar et al., (1992), complementando a definição de Fuller (1989), definiu os

probióticos como uma única ou mistura de culturas de microrganismos vivos que, quando aplicado a animais ou em seres humanos, afetam benéficamente o hospedeiro, melhorando as propriedades da microbiota endógena. Estas duas definições (Havenaar et al., 1992; Fuller, 1989) são as aceitas e mais comumente utilizadas pela comunidade científica.

Os probióticos podem ser definidos como espécies colonizadoras, como o *Lactobacillus* e *Enterococcus* spp., ou como não colonizadoras, de transito intestinal livre, como o *Bacillus* spp. e o *Saccharomyces cerevisiae* (Huyghebaert et al., 2011).

Segundo Salminen et al. (1996), existem alguns requerimentos para definir uma bactéria como um probiótico efetivo: a habilidade de aderir as células; excluir ou reduzir a aderência de bactérias patogênicas; persistir e se multiplicar; produzir ácidos, peróxido de hidrogênio e bacterocinas que impeçam o crescimento de bactérias patogênicas; ser seguro; não invasivo; não carcinogênico e não patogênico e possuir a capacidade de se agregar as outras bactérias, para formar uma microbiota balanceada. Embora existam diversas espécies de bactérias que possam apresentar características probióticas, apenas as cepas ácido lácticas são consideradas importantes com relação a nutrição e a alimentação (Holzapfel et al., 2001). A descrição geral das bactérias incluídas neste grupo é que são Gram-positivas, não esporulantes, cocos ou bastonetes “não respirantes”, que produzem ácido láctico como o principal produto final durante a fermentação de carboidratos (Axelsson, 2004).

O mecanismo de ação dos probióticos não está bem esclarecido ainda. Presume-se que são diversos processos que levam ao equilíbrio da microbiota intestinal e que proporcionam os demais efeitos desejáveis dos probióticos. O que se sabe é que o equilíbrio da microbiota é de extrema importância para a manutenção da saúde intestinal. Alguns dos métodos pelos quais os probióticos controlam a microbiota são a

produção de substâncias antimicrobianas, competição por sítios de ligação e o estímulo ao sistema imunológico. Segundo Lee et al. (2010) os probióticos fornecidos diretamente na ração melhoram a saúde e a produtividade das aves através do equilíbrio da microflora intestinal e da modulação do sistema imunológico.

Nos animais, os probióticos são usados para fins diferentes dos para seres humanos. A principal função do uso dos probióticos na produção animal é a obtenção de melhores índices de desempenho zootécnico (Tabela 1), visando melhores índices de produtividade com menores gastos.

Tabela 1 – Probióticos que favorecem o desempenho zootécnico dos animais

Probiótico	Efeito	Autor
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	- Aumento do Ganho de peso (GP) - Aumento do consumo de ração	Chen et al., 2009
<i>Bacillus cereus</i> var. toyoi	- Aumento do GP diário médio - Aumento do peso corporal - Redução do número de aves positivas para <i>S. Enteritidis</i>	Vilá et al., 2009
<i>Bacillus subtilis</i>	- Aumento do GP - Melhora da conversão alimentar (C.A.) - Aumento da resposta de Anticorpos (Ac) contra soro de cordeiro - Aumento de Ac contra o vírus da doença de Newcastle	Klaksefidi et al., 2006
<i>Bacillus subtilis</i>	- Aumento do peso corporal - Melhor CA de 21 a 42 dias	Fritts et al., 2000

O contato com o ambiente logo após o nascimento favorece o desenvolvimento mais rápido da microbiota. Esta, formada logo após a eclosão, interage com o trato digestório e com o sistema imunológico dos animais, podendo afetar de forma positiva ou negativa os mesmos. A colonização de diferentes porções do trato gastrointestinal por bactérias específicas, como *Lactobacillus*, *Streptococcus*, entre outras, pode ocorrer pela associação com a camada de muco ou pela adesão a superfície e células epiteliais.

Esta adesão atua como a primeira barreira de defesa contra os microorganismos nocivos e contra toxinas (Nousiainen et al., 2005).

Os probióticos devem ser usados para corrigir disfunções locais do sistema imunológico, estabilizar a função da barreira mucosa do intestino, para impedir a fixação de microorganismos patogênicos e influenciar o metabolismo intestinal (Holzapfel et al., 1998).

A seguir estão listados os microorganismos considerados como probióticos de acordo com Holzapfel et al. (1998) (Tabela 2).

Tabela 2 – Microorganismos considerados como probióticos

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Outras bactérias produtoras de ácido láctico	Não produtoras de ácido láctico
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> ²	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i> ^{2,3}
<i>L. amylovorus</i> ¹	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> strain nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ⁴	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ^{2,3}
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ³
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> ⁴	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i> ⁴	<i>Saccharomyces boulardii</i> ^{1,3}
<i>L. gallinarum</i> ²	<i>B. lactis</i> ⁵	<i>Sporolactobacillus inulinus</i> ²	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i> ⁴	
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Adaptado de Holzapfel et al. (1998)

¹ Holzapfel et al. (2002)

² Usado principalmente em animais

³ Usado principalmente em preparações farmacêuticas

⁴ Pouco se sabe sobre as propriedades probióticas

⁵ Provavelmente igual ao *B. animalis*.

Forma de ação dos probióticos

A principal forma de ação descrita para os probióticos se dá pela produção de alguns metabólitos que irão atuar como inibidoras do crescimento de outras bactérias, especialmente as patogênicas. Os metabólitos produzidos podem ser ácidos, principalmente o lático e o acético, dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio, bacterocinas e peptídios antimicrobianos. Além disso, a inibição da adesão das bactérias na mucosa também atua como inibidor de crescimento de bactérias patogênicas. Em estudo realizado por Todoriki et al. (2001), duas cepas diferentes de *Lactobacillus* (*L. reuteri* e *L. crispatus*) foram capazes de inibir a adesão de *Escherichia coli* enterotoxigênica, *Salmonella* Typhimurium e *Enterococcus faecalis*. Esta capacidade foi testada *in vitro* em células Caco-2, onde a adesão e a produção de bacterocinas pelas bactérias probióticas inibiu a adesão de bactérias patogênicas.

Por meio da fermentação de hexoses, algumas bactérias, especialmente as consideradas como probióticos, possuem a capacidade de produzir ácido lático, por homofermentação e ácido lático, acético/etanol e dióxido de carbono por meio da heterofermentação (Ouwehand e Vesterlund, 2005). Estes ácidos apresentam ação contra bactérias, fungos e leveduras. Sua ação vai depender do pH do ambiente e da capacidade de dissociação dos ácidos formados, proporcionando maior ou menor efetividade.

Bactérias produtoras de ácido lático, em presença de oxigênio, são capazes de produzir peróxido de hidrogênio, que também atua inibindo o crescimento de bactérias. Ito et al. (2003) conseguiram estimular a produção de peróxido de hidrogênio por algumas cepas de *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis*. Uma destas cepas foi testada contra *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* Enterotoxigênica,

Listeria ivanovii, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* e *Aeromonas hydrophila* e foi eficaz na redução da contagem destas bactérias.

Com relação a produção de dióxido de carbono, esta pode atuar de duas formas na inibição do crescimento das bactérias. Ele pode gerar anaerobiose ou agir diretamente sobre as bactérias (Lindgren e Dobrogosz, 1990).

Apesar de se conhecer que alguns probióticos são capazes de produzir compostos antimicrobianos, nem sempre é conhecida a natureza destes antimicrobianos. Nazef et al. (2008) demonstraram que o *Enterococcus faecalis* apresentou atividade anti *Listeria* e, de forma mais fraca, anti *Campylobacter*. Segundo os autores, o efeito do *E. faecalis* é atribuído a um composto de natureza protéica, que atua tanto como uma bacteriocina ou como peptídeos antimicrobianos.

Probióticos e imunidade

Sabe-se que uma das características dos probióticos é o estímulo do sistema imunológico. Os probióticos podem atuar tanto modulando a resposta imune inata como a adquirida, favorecendo o combate aos microorganismos (Fleige et al., 2009). Segundo Lee et al. (2010) os probióticos fornecidos na ração são capazes de modular a resposta humoral e celular para aumentar a proteção através do sistema imunológico. Entretanto não se sabe precisamente como ocorre esta interação.

Os estímulos produzidos pela colonização dos probióticos são essenciais para o desenvolvimento de um sistema imunológico funcional e balanceado, incluindo a presença de linfócitos T e B na lâmina própria, assim como a expansão e maturação de IgA e indução de tolerância por parte dos antígenos presentes (Borchers et al., 2009). O uso dos probióticos favorece a resposta contra algumas vacinas, aumenta as imunoglobulinas tanto no sangue como na mucosa e estimula a maturação de linfócitos

T e B (Haghighi et al., 2006). Os resultados demonstrados na tabela 3 ilustram os diferentes efeitos dos probióticos sobre a imunidade dos animais (Tabela 3).

Tabela 3 – Efeitos dos probióticos sobre o sistema imunológico dos animais

Probiótico	Desafio	Efeito	Autor
<i>Lactobacillus</i> sp. + <i>B. cereus</i> + <i>Astragalus</i> polysaccaride (preb)	Vacina contra o vírus da doença de Newcastle (NDV)	- Aumento de Ac contra NDV; - Aumento de linfócito T - Aumento de <i>Lactobacillus</i> e <i>Bifidobacterium</i>	Li et al., 2009
<i>B. subtilis</i>	Glóbulos vermelhos de ovinos e vacina contra NVD	- Aumento de Ac contra glóbulos vermelhos de cordeiro; - Aumento de Ac contra NDV.	Khaksefidi et al., 2006
<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Eimeria acervulina</i>	- Aumento de CD3+, CD4+, CD8+ e β TCR - Diminuição da excreção de oocistos	Dallou et al., 2003
<i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> e Flora cecal	<i>Salmonella</i> Enteritidis	- Aumento de CD3+, CD4+ e CD8+ no trato gastrointestinal	Noujaim et al., 2008
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Streptococcus faecalis</i>	Toxoide tetânico, α toxina do <i>C.</i> <i>perfringens</i> e Albumina bovina	- Aumento de IgA, IgG e IgM contra os desafios	Haghighi, 2006
<i>Bacillus subtilis</i> (varias cepas)	Sem desafio	- Aumento de óxido nítrico; - Aumento da fagocitose pelos macrófagos	Lee et al., 2011
<i>Enterococcus faecium</i>	Vacina contra cinomose	- Aumento de IgA fecal; - Aumento de IgA e IgG contra cinomose; - Aumento de células B maduras	Benyacoub et al., 2003
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Giardia intestinalis</i>	- Aumento de IgA contra Giárdia; - Aumento de IgG contra Giárdia no soro; - Aumento de CD4+ no soro; - Diminuição da presença de giárdia	Benyacoub et al., 2005
<i>Enterococcus faecium</i>	Sem desafio	- Diminuição de CD8+ na mucosa jejunal; - Diminuição de <i>E. coli</i> no intestino	Scharek et al., 2005

Outro dado interessante é a grande variedade de probióticos que podem ser utilizados para estimular tanto a imunidade inata como a imunidade adquirida dos animais. O fornecimento de *Bacillus subtilis* como probiótico foi capaz de estimular a atividade de macrófagos através do aumento da produção de óxido nítrico e do aumento da atividade fagocítica dos macrófagos (Lee et al., 2011). Este aumento proporciona ao animal resposta mais rápida frente a qualquer microorganismo desconhecido que passe pelo trato gastrointestinal.

Esta característica se torna cada vez mais interessante, pois favorece a saúde do trato gastrointestinal. A presença de bactérias comensais na microbiota é essencial para a produção de IgA intestinal em alguns animais, pois a mesma não é encontrada em animais livres de patógenos e a colonização do trato gastrointestinal por estas bactérias estimula o desenvolvimento de IgA (Bos et al., 2001). Alguns autores (Tabela 3) demonstraram aumento na produção de IgA no trato gastrointestinal e no soro, facilitando o combate a patógenos presentes no trato gastrointestinal. Esta ação sugere que probióticos podem atuar como adjuvantes, realizando estímulo prévio do sistema imunológico, acelerando a resposta específica dos animais.

No trabalho realizado por Scharek et al. (2005), o *Enterococcus faecium* foi capaz de reduzir a contagem de CD8+ na mucosa do jejuno, e os autores sugerem que isso ocorra devido a redução da presença de patógenos na mucosa, por meio de mecanismos de exclusão competitiva.

Ação dos probióticos sobre a *Salmonella* spp

As infecções por *Salmonella* spp. são muito preocupantes na avicultura. As aves são consideradas os maiores reservatórios desta bactéria, e, segundo Morse & Duncan (1974), podem ser fonte de infecção para outros animais e seres humanos. O maior

problema desta transmissão ocorre quando as infecções são por *Salmonella* paratíficas, que geralmente não apresentam sinais clínicos aparentes nas aves (Hofer et al., 1997) e são as mais nocivas quando se trata de saúde pública.

Como se sabe, os probióticos podem atuar inibindo o desenvolvimento de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal dos animais. Esta característica torna-se importante, pois com menores índices de contaminação do trato gastrointestinal por bactérias patogênicas, mais especificamente contra bactérias do gênero *Salmonella* spp., menores serão as chances de ocorrer contaminação das carcaças no interior do abatedouro (Rasschaert et al., 2006). Diversos autores estão listados na Tabela 4, os quais vêm demonstrando a importância dos probióticos como inibidores do crescimento de *Salmonella* spp..

A redução de *Salmonella* spp. por meio do uso de probióticos pode ocorrer de diversas formas. Muitos trabalhos são realizados para testar a produção de bacterocinas e outras substâncias que possam ter efeito antimicrobiano. Além destas substâncias antimicrobianas, a redução pode acontecer através da competição por sítios de ligação. Outro ponto relevante a ser ressaltado é a redução da contaminação em carcaças no abatedouro. O trabalho realizado por Al-Zenki et al. (2009) comprova a capacidade da redução da contaminação de carcaças em abatedouro por diminuir a presença de *Salmonella* spp. no trato gastrointestinal das aves. Esta redução é de extrema importância, tendo em vista que a salmonelose é a principal fonte de toxiinfecções alimentares para seres humanos.

Tabela 4 – Ação dos probióticos sobre *Salmonella* spp.

Probiótico	Desafio	Efeito	Autor
<i>Bacillus cereus</i> var Toyoi	10 ⁴ <i>Salmonella</i> Enteritidis	- Aumento do ganho de peso e conversão - Redução de 100% na presença de SE	Vilà et al., 2009
<i>Lactobacillus</i> spp. (11 espécies)	10 ⁴ <i>Salmonella</i> Enteritidis	- Redução da recuperação de SE 24 horas pós tratamento; - Redução da presença de SE em tratamento via cloacal	Higgins et al., 2008
<i>Lactobacillus casei</i>	10 ⁸ <i>Salmonella</i> Typhimurium	- Redução da contagem de ST em baço, intestino e fígado; - Redução na infiltração de neutrófilos; - Aumento da atividade fagocítica de macrófagos; - Aumento de IgA no intestino	LeBlanc et al., 2010
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> e <i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium	- Redução de 99% da viabilidade de ST em pH 4,5 e microaerobiose; - Redução de 20% de ST em pH7,5 e microaerobiose	Marianelli et al., 2010
- <i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. fermentum</i> ; - <i>Lactobacillus</i> spp. (11 espécies)	10 ⁴ <i>Salmonella</i> Enteritidis	- Redução de SE em aves tratadas por 24 horas 1 hora pós-inoculação; - Redução de SE em aves tratadas 24 horas pré-inoculação	Higgins et al., 2010
Aviguard [®] , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Salmonella</i> spp. Proveniente do incubatório	- Redução da contaminação no corpo da ave, na carcaça e no ceco	Al-Zenki et al., 2009

Considerações finais

O uso de probióticos como promotores de crescimento é recomendado devido a sua capacidade de melhorar o desempenho zootécnico dos animais, seja por meio da redução da contaminação microbiana, ou pela modulação da resposta imunológica dos animais. Entretanto, existem alguns pontos não muito bem elucidados na ação dos probióticos como a natureza de bacterocinas e outras substâncias com função

antimicrobiana e também seu efeito imunomodulador no organismo animal. Esta falta de esclarecimento leva a necessidade de maiores pesquisas para obtenção de uma maior segurança no uso destes probióticos.

Referências Bibliográficas

AL-ZENKI, S. F.; AL-NASSER, A. Y.; AL-SAFFAR, A. E. et al. Effects of using a chicken-origin competitive exclusion culture and probiotic cultures on reducing *Salmonella* in broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, v.18, p.23–29, 2009

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R; MARTÍNEZ, M.A. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.45, p. 91–95, 2006.

AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects** 3.ed. New York: Marcel Dekker 2005, Cap. 1.

BENYACOUB, J.; CZARNECKI-MAULDEN, G. L.; CAVADINI, C. et al. Supplementation of Food with *Enterococcus faecium* (SF68) Stimulates Immune Functions in Young Dogs. **The journal of nutrition**, v.133, p.1158-1162, 2003.

BENYACOUB, J.; PÉREZ, P. F.; ROCHAT, F. et al. *Enterococcus faecium* SF68 Enhances the Immune Response to *Giardia intestinalis* in Mice. **The journal of nutrition**, v.135, p.1171-1176, 2005.

BORCHERS, A. T.; SELMI, C.; FREDERICK J. et al. Probiotics and immunity. **Journal of Gastroenterology**, v.44, p.26–46, 2009.

BOS, N. A.; JIANG, H. Q.; CEBRA, J. J. T cell control of the gut IgA response against commensal bacteria. **Gut**, v.48, p.762–764, 2001.

CASTANON, J. I. R. History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds. **Poultry Science**, v.86, p.2466–2471, 2007.

CHEN, K. L.; KHO, W. L.; YOU, S. H. et al. Effects of *Bacillus subtilis* var. *natto* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed fermented feed on the enhanced growth performance of broilers. **Poultry Science**, v.88, p.309–315, 2009.

CORTEZ, A.L.L.; de CARVALHO, A.C.F.B.; IKUNO, A.A. et al. Resistência Antimicrobiana de Cepas de *Salmonella* spp. Isoladas de Abatedouros de Aves. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.2, p.157-163, 2006.

DALLOUL, R. A.; LILLEHOJ, H. S.; SHELLEM, T. A. et al. Enhanced Mucosal Immunity Against *Eimeria acervulina* in Broilers Fed a *Lactobacillus*-Based Probiotic. **Poultry Science**, v.82, p.62–66, 2003.

FLEIGE, S.; PREIBINGER, W.; MEYER, H. H. D. et al. The immunomodulatory effect of lactulose on *Enterococcus faecium* fed preruminant calves. **Journal of Animal Science**, v.87, p.1731-1738, 2009.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, p.365–378, 1989.

FULLER, R. Probiotics in human medicine. **Gut**, v.32, p.439-442, 1991.

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

HAGHIGHI, H. R.; GONG, J.; GYLES, C.L. et al. Probiotics Stimulate Production of Natural Antibodies in Chickens. **Clinical and vaccine immunology**, v.13, n.9, p.975–980, 2008.

HAVENAAR, R.; TEN BRINK, B.; HUIS IN'T VELD, J. H. J. In: R. Fuller **Probiotics, the scientific basis** (pp. 209–224). 1.Ed., London: Chapman & Hall. 1992.

HIGGINS, S. E.; HIGGINS, J. P.; WOLFENDEN, A. D. et al. Evaluation of a *Lactobacillus*-Based Probiotic Culture for the Reduction of *Salmonella* Enteritidis in Neonatal Broiler Chicks. **Poultry Science**, v.87, p.27–31, 2008.

HIGGINS, J. P.; HIGGINS, S. E.; WOLFENDEN, A. D. et al. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture treatment timing on *Salmonella* Enteritidis in neonatal broilers. **Poultry Science**, v.89, p.243–247, 2010.

HOFER, E.; da SILVA FILHO, S.J.; dos REIS, E.M.F. Prevalência de Sorovares de *Salmonella* Isolados de Aves no Brasil, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17 n.2, 1997.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; SNELB, J. et al. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, p.85 –101, 1998.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73(suppl), p.365S–373S, 2001.

HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. 2002. **Food Research International**, v.35, p.109–116, 2002.

ITO, A.; SATO, Y.; KUDO, S. et al. The Screening of Hydrogen Peroxide-Producing Lactic Acid Bacteria and Their Application to Inactivating Psychrotrophic Food-Borne Pathogens. **Current microbiology**, v.47, p,231–236, 2003.

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

De LeBLANC, A. de M.; CASTILLO, N. A.; PERDIGON, G. Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. **International Journal of Food Microbiology**, v.138, p.223–231, 2010.

LEE, K.; LILLEHOJ, H.S.; SIRAGUSA, G.R. Direct-fed antimicrobials and their impact on the intestinal microflora and immune system of chickens. **The Journal of Poultry Science**, v.47, p.106-114, 2010.

LEE, K.W.; LI, G.; LILLEHOJ, H. S. et al. Bacillus subtilis-based direct-fed microbials augment macrophage function in broiler chickens. **Research in Veterinary Science**, Article in press, 2011.

LI, S. P.; ZHAO, X. J.; WANG, J. Y. Synergy of *Astragalus* polysaccharides and probiotics (*Lactobacillus* and *Bacillus cereus*) on immunity and intestinal microbiota in chicks. **Poultry Science**, v.88, p.519–525, 2009.

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

LINDGREN, S. E.; DOBROGOSZ, W. J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. **FEMS Microbiology Letters**, v.87, n.1-2, p.149-163, 1990.

MARIANELLI, C.; CIFANI, N.; PASQUALI, P. Evaluation of antimicrobial activity of probiotic bacteria against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium 1344 in a common medium under different environmental conditions. **Research in Microbiology**, v.161, p.673-680, 2010.

MORSE, E.V.; DUNCAN, M.A. Salmonellosis an environmental health problem. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.165, p.1015-1019, 1974.

NAZEF, L.; BELGUESMIA, Y.; TANI, A. et al. Identification of Lactic Acid Bacteria from Poultry Feces: Evidence on Anti-*Campylobacter* and Anti-*Listeria* Activities. **Poultry Science**, v.87, p.329–334, 2008.

NOUJAIM, J. C.; ANDREATTI FILHO, R. L.; LIMA, E. T. et al. Detection of T Lymphocytes in Intestine of Broiler Chicks Treated with *Lactobacillus* spp. and Challenged with *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. **Poultry Science**, v.87, p.927–933, 2008.

NOUSIAINEN, J.; JAVANAINEN, P.; SETÄLÄ, J. et al. Lactic Acid Bacteria as Animal Probiotics. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects** 3.ed. New York: Marcel Dekker 2005, Cap. 20

OUWEHAND, A. C.; VESTERLUND, S. Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic Acid**

Bacteria Microbiological and Functional Aspects 3.ed. New York: Marcel Dekker 2005, Cap. 11

RASSCHAERT, G.; HOUF, K.; DeZUTTER, L. Impact of the slaughter line contamination on the presence of Salmonella on broiler carcasses. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, n.2, p.333-341, 2007.

SCHAREK, L.; GUTH, J.; REITER, K. et al. Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.105, p.151–161, 2005.

TODORIKI, K.; MUKAI, T.; SATO, S. et al. Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by Lactobacillus strains. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.154–159, 2001.

VILA, B.; FONTGIBELL, A.; BADIOLA, I. et al. Reduction of *Salmonella enterica* var. Enteritidis colonization and invasion by *Bacillus cereus* var. *toyoi* inclusion in poultry feeds. **Poultry Science**, v.88, p.975–979, 2009.

CAPÍTULO 2

***Enterococcus faecium* ATUANDO NA DINÂMICA DE
INFILTRAÇÃO CELULAR DA LÂMINA PRÓPRIA DE ÍLEO E
CECO DE FRANGOS DESAFIADOS COM *Salmonella* Minnesota**

***Enterococcus faecium* ATUANDO NA DINÂMICA DE
INFILTRAÇÃO CELULAR DA LÂMINA PRÓPRIA DE ÍLEO E
CECO DE FRANGOS DESAFIADOS COM *Salmonella* Minnesota**

Leandro Nagaê Kuritza

Laboratório de Microbiologia e Ornitopatologia, Departamento de Medicina
Veterinária, Universidade Federal do Paraná Curitiba, Brasil.

RESUMO

No presente experimento foi estudado o uso de *Enterococcus faecium* (EF) como probiótico na ração de aves, avaliando seu efeito sobre infiltração de células imunológicas na mucosa de íleo e ceco de frangos desafiados com *Salmonella* Minnesota (SM). As aves foram divididas em três tratamentos, sendo tratamento 1 não desafiado, tratamento 2 controle positivo desafiado com SM e tratamento 3 grupo desafiado com SM alimentado com dieta contendo EF. Aves alimentadas com EF apresentaram, antes do desafio com SM, aumento na contagem de células caliciformes em íleo e ceco, redução de linfócitos T CD8⁺ no íleo e aumento de linfócitos T CD4⁺ no ceco comparadas as aves não alimentadas com EF. Após desafio com SM, aves alimentadas com EF apresentaram redução na contagem de *Salmonella* em suabe de cloaca 48h pós infecção e ceco e cama aos 35 dias de idade e redução de células T CD4⁺ no íleo e células T CD8⁺ no ceco, quando comparadas as aves desafiadas que não comeram EF. Com base nos resultados é possível concluir que o uso de probiótico EF é capaz de reduzir a contagem de SM, e com isso afetar a mobilização de células CD4⁺ e CD8⁺ na mucosa de íleo e ceco das aves.

Palavras-chave: *Enterococcus faecium*, probiótico, CD4⁺, CD8⁺, caliciformes

ABSTRACT

This experiment evaluated the use of *Enterococcus faecium* (EF) as a probiotic in the diet of broilers, measuring its effect on infiltration of immune cells in the mucosa of the ileum and cecum of chickens challenged with *Salmonella* Minnesota (SM). Birds were divided into three treatments. In treatment 1, birds weren't challenged with SM and didn't received probiotic. In treatment 2 birds were challenged with SM, acting as positive control and in treatment 3 birds were challenged with SM and fed with diet containing EF. Birds fed with EF had, before the challenge with SM, an increase in goblet cell count in ileum and cecum and reduced CD8+ T lymphocytes in the ileum and increased CD4+ T lymphocytes in the cecum compared with birds not fed EF. After challenge with SM, birds fed with EF showed a reduction in the count of SM from cloacal swabs 48h pi and cecum and litter at 35 days of age and reduced CD4+ T cells in the ileum and CD8+ T cells in the cecum compared the birds challenged that didn't received EF. Based on the results we conclude that the use of probiotic base EF is able to reduce the count of SM, and thus affect the mobilization of CD4+ and CD8+ cells in the mucosa of the ileum and cecum of birds.

Keywords: *Enterococcus faecium*, probiotic, CD4+, CD8+, goblet cells

INTRODUÇÃO

As salmoneloses representam sério problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento e vários mecanismos de controle deste patógeno têm sido empregados na produção avícola (Cardoso e Carvalho, 2006), dentre eles o uso de probióticos. Estes são definidos como uma única ou mistura de culturas de microrganismos vivos que, quando aplicado a animais ou em seres humanos, afetam benéficamente o hospedeiro, melhorando as propriedades da microbiota endógena (Havenaar et al., 1992). Alguns autores ainda citam que algumas bactérias usadas como probióticos podem atuar também sobre a resposta imunológica (Noujaim et al., 2008; Mouni et al., 2009; Lee et al., 2010).

O efeito inibitório de probióticos sobre a população de enterobactérias patogênicas como *Salmonella* através do mecanismo de exclusão competitiva (EC) é bastante documentado na literatura (Reid e Friendship, 2002; Hariharan et al., 2004; Dahiya et al., 2006; Callaway et al., 2008). Nurmi e Rantala (1973) foram pioneiros em descrever o uso de EC no controle de *Salmonella*, associando este mecanismo à produção, de ácidos voláteis e também a competição por sítios de ligação entre microorganismos benéficos e patogênicos (Soerjadi et al., 1981).

Enterococcus faecium (EF) é uma bactéria produtora de ácido láctico que apresenta efeitos inibitórios contra *Escherichia coli* e *Salmonella* spp (Lewenstein et al., 1979; Miteva e Boytcheva, 2007). Além disso, apresenta capacidade de sobreviver às condições gastrointestinais (Bhardwaj et al., 2010), o que favorece a sua ação. Tem sido demonstrado seu efeito probiótico na melhora do desempenho e conversão alimentar de leitões (Mallo et al., 2010) e modulador da imunidade em ratos (Peng Sun et al., 2010). Além disso, associado a prebióticos, foi demonstrado que também melhora o desempenho de frangos de corte (Awad, et al., 2008). Entretanto, pouco se sabe sobre o

verdadeiro mecanismo de ação destes probióticos como inibidores de bactérias patogênicas e/ou melhoradores de desempenho animal. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar um probiótico EF na dinâmica de infiltração de células imunológicas na mucosa intestinal de frangos desafiados com SM.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e Instalações

Foram utilizados 60 frangos de corte da linhagem Cobb[®] de 1 à 35 dias de idade, divididos igualmente em 3 tratamentos:

Tratamento 1 (T1) – Controle negativo sem inoculação de SM

Tratamento 2 (T2) – Controle positivo com inoculação de SM

Tratamento 3 (T3) – 50 g/ton de Probiotico a base de *Enterococcus faecium* (EF) na ração (Cylactin ME 20[®] (DSM Nutritional Products Ltd. Basel/Switzerland)) e inoculados com SM.

As aves de cada tratamento foram alojadas em sala separadas, mas idênticas, localizadas lado a lado, com pressão negativa, previamente limpas e desinfetadas, utilizando cama de maravalha previamente esterilizada em autoclave à 121°C por 15 minutos. Foi realizado teste de esterilidade nas salas, equipamentos e cama antes do início do experimento. Na chegada dos animais realizou-se eutanásia e necropsia de cinco animais para coleta de fígado e ceco e realização de análise de presença/ausência de *Salmonella* spp.

Os animais foram mantidos em temperatura ideal de conforto de acordo com a idade das aves, com fornecimento de água e ração à vontade, sendo alimentadas com dietas peletizadas e balanceadas em níveis iguais ou superiores recomendados pelo

NRC (1994). A ração, antes de ser fornecida, foi analisada e considerada negativa para a presença de *Salmonella* spp..

Probiótico

A cepa probiótica testada foi *Enterococcus faecium* NCIMB 10415, fornecida pela Empresa DSM[®]. Amostras em triplicata de rações antes e após peletização foram avaliadas pela Empresa DSM[®] quanto à quantidade de probiótico presente, no que foi verificado que a ração adicionada de probióticos apresentou média de 1×10^9 UFC/kg de ração.

Cepa de *Salmonella*

Aos 15 dias de idade os animais dos tratamentos 2 e 3 foram desafiados com uma solução de 1 mL *Salmonella* Minnesota na concentração 10^8 UFC/mL por via oral. Esta cepa foi obtida a partir de frangos de corte contaminados a campo. As aves do grupo controle foram inoculadas com 1 mL de solução salina, atuando como placebo.

Coleta de materiais para microbiologia

Foi realizada coleta de suabes de cloaca 48h após inoculação sendo cinco amostras por tratamento, cada amostra contendo três suabes (*pool* de três animais) para análise de contagem de *Salmonella*. Aos sete dias de idade (cinco animais por tratamento) e aos 35 dias de idade (10 animais por tratamento) foram eutanasiados e necropsiados para coleta de papo e ceco de forma asséptica e posterior análise de *Salmonella*. O papo foi coletado fechado, com conteúdo e aberto dentro do pacote designado para coleta do mesmo. Um dos cecos foi coletado fechado e também foi aberto dentro do pacote designado para coleta do mesmo.

Aos 21 e 35 dias de idade foram coletadas cinco alíquotas de 10g de cama de pontos distintos dos boxes nos quais os animais estavam alojados (cinco amostras por tratamento) para posterior análise de contagem de *Salmonella*.

Processamento das amostras para análise microbiológica

Para realização do procedimento de contagem de *Salmonella* os suabes de cloaca, os papos, os cecos e as camas foram diluídos em água peptonada 2% em proporção de 1:9. Retirou-se 1 mL da solução de água peptonada 2% para ser pipetado no tubo contendo 9 mL de água peptonada 0,1%. Deste tubo foi retirado 1 mL da solução de água peptonada 0,1% para ser pipetado no tubo seguinte contendo 9 mL de água peptonada 0,1% e assim sucessivamente até a diluição 10^{-3} . Posteriormente retirou-se 100 μ L de cada diluição, plaqueou-se em duplicata em meio XLD e com uma alça de Drigalsky estéril espalhou-se o líquido na placa. As placas foram incubadas em estufa regulada a 35°C por 24h e submetidas à posterior contagem das colônias típicas (Desmidt et al., 1998).

A solução inicial de água peptonada 2% foi incubada a 35°C por 24h, em caso de não ter ocorrido crescimento de colônias típicas de *Salmonella* após 24h de incubação, retirou-se 100 μ L da solução inicial em água peptonada 2% e acrescentou-se em um tubo contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis. Este tubo foi incubado em estufa regulada a 42°C por 24h para posteriormente ser plaqueado em Agar XLD para confirmação de negatividade/positividade das amostras.

Os resultados das contagens de colônias foram expressos de acordo com procedimentos de contagem de colônia de acordo com a Normativa nº 62 publicada em 26 de agosto de 2003 (BRASIL-MAPA, 2003). Os resultados da contagem de colônias de *Salmonella* foram transformados em Log 10 para análise estatística.

Coleta de material para análises histopatológicas e imunoistoquímicas

Aos sete e 35 dias de vida das aves foram também realizadas coletas de fragmentos de íleo e ceco de cinco animais por tratamento que foram acondicionados em formol tamponado 10% e processados de acordo com Smirnov et al. (2004) para análise de células caliciformes. As amostras de íleo e ceco foram processadas e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e Alcian Blue para análise histológica. Também foram coletados outros fragmentos dos mesmos segmentos, que foram congelados em nitrogênio líquido, para posterior análise de células CD4⁺ e CD8⁺ de acordo com Pickler et al (2011).

Análise das lâminas de histopatologia e imunoistoquímica

As análises histológicas e a quantificação de células CD4⁺ e CD8⁺ do epitélio intestinal foram realizadas em microscopia de luz, em sistema analisador de imagens (Motic Image Plus 2.0 – Motic China Group Co. 2006) acoplado ao microscópio (Olympus America INC., NY, USA). A quantificação de células caliciformes e os linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ foi realizada por campo (aumento de 100X) nos fragmentos de íleo e ceco. Foram contabilizados 10 campos por lâmina, sendo cada animal uma lâmina, totalizando cinco laminas e/ou 50 campos por tratamento por coleta.

Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa estatístico Statistix for Windows Copyright (C) 2008. Os resultados foram submetidos à ANOVA e teste de Fischer à 5% de probabilidade, quando apresentavam diferenças estatísticas no teste de ANOVA.

RESULTADOS

Análises microbiológicas

As amostras de fígado e ceco coletadas no primeiro dia e os papos e cecos coletados aos sete dias de idade foram todas negativas para análise de *Salmonella* spp. Amostras de *Salmonella* spp. isoladas no agar XLD foram enviadas à Fundação Oswaldo Cruz para sorotipagem. Todas as amostras enviadas foram diagnosticadas como pertencentes ao sorotipo Minnesota. Os resultados da Tabela 1 demonstram que o probiótico utilizado na dieta foi capaz de reduzir significativamente ($P < 0,05$) a excreção de SM em suabe de cloaca de aves 48 horas após inoculação (p.i) e ceco das aves aos 35 dias de vida em relação ao grupo controle positivo inoculado, porém não no papo de aves de 35 dias de idade.

Tabela 1 – Média e desvio padrão da contagem de colônias de *Salmonella* Minnesota em suabe de cloaca 48 horas após inoculação, papo e ceco aos 35 dias de idade nos diferentes tratamentos (Resultados expressos em Log₁₀ UFC/g).

Tratamento	Log UFC/g (Suabe 48h PI)	Log UFC/g (Papo)	Log UFC/g (Ceco)
Controle negativo	0,00±0,00 b	0,00±0,00 b	0,00±0,00 c
Controle positivo	3,95±2,24 a	0,87±0,50 a	4,30±4,28 a
<i>Enterococcus faecium</i> (1x10 ⁹ UFC/g)	1,51±1,14 b	0,67±0,80 a	1,12±1,20 b
Valor de P	0,002	0,025	0,001

Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes para $P \leq 0,05$

Os resultados da contagem de SM em cama (média ± desvio padrão) aos 21 e 35 dias de idade (Tabela 2), demonstraram que o tratamento recebendo EF na ração não reduziu a contagem de SM da cama das aves aos 21 dias, mas reduziu em 47,20% o isolamento de SM na cama aos 35 dias, em relação ao grupo controle inoculado.

Tabela 2 – Média e desvio padrão da Contagem de colônias de *Salmonella* em cama dos animais nos diferentes tratamentos aos 21 e 35 dias de idade (Resultados expressos em Log₁₀ UFC/g).

Tratamento	Log₁₀ UFC/g (Cama - 21 dias)	Log₁₀ UFC/g (Cama - 35 dias)
Controle negativo	0,00±0,00 b	0,00±0,00 c
Controle positivo	4,30±0,07 a	3,60±0,22 a
<i>Enterococcus faecium</i> (1x10 ⁹ UFC/g)	4,03±0,35 a	1,90±0,66 b
Valor de P	0,001	0,001

Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes para $P \leq 0,05$

Análises de Histopatologia e Imunoistoquímica

As Tabelas 3 e 4 expressam os resultados das contagens de células caliciformes, células CD4⁺ e CD8⁺ aos sete dias em íleo e ceco, respectivamente. É possível observar que aves alimentadas com rações com probiótico contendo EF mostraram aumento significativo no número de células caliciformes e redução no número de células CD8⁺ no íleo, quando comparadas às aves do grupo não tratado. Na contagem de células CD4⁺ e relação células CD4⁺:CD8⁺ no íleo de aves aos sete dias de idade, não foram observadas diferenças estatísticas ($P > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 3)

Tabela 3 – Contagem de células caliciformes, CD4⁺, CD8⁺e relação CD4⁺:CD8⁺ por campo em íleo de frangos de corte aos 7 dias de idade (aumento de 100X).

Tratamento	Íleo			
	CD4 ⁺	CD8 ⁺	Relação CD4 ⁺ :CD8 ⁺	Caliciformes
Controle Negativo	4,30±3,71	7,90±2,33 ^a	0,63±0,62	41,40±8,43 ^b
<i>Enterococcus faecium</i> (1x10 ⁹ UFC/g)	4,80±2,44	4,90±2,02 ^b	1,21±0,85	62,50±5,65 ^a
Valor de P	0,726	0,007	0,097	0,001

Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes para $P \leq 0,05$

No ceco observa-se aumento significativo no número de células caliciformes e CD4+ de aves alimentadas com EF quando comparadas às aves do grupo não tratado. Para relação CD4+:CD8+ no ceco observa-se quantidade significativamente ($P < 0,05$) menor de células CD4+ que de células CD8+ no grupo que não foi alimentado com EF comparado ao grupo alimento com EF (Tabela 4).

Tabela 4 – Contagem de células caliciformes, CD4+, CD8++ e relação CD4+:CD8+ por campo em ceco de frangos de corte aos 7 dias de idade (aumento de 100X).

Tratamento	Ceco			
	CD4+	CD8+	Relação CD4+:CD8+	Caliciformes
Controle Negativo	8,30±3,30 ^b	10,30±4,06	0,87±0,40 ^b	10,30±2,34 ^b
<i>Enterococcus faecium</i> (1×10^9 UFC/g)	18,40±3,56 ^a	11,70±2,87	1,70±0,70 ^a	12,80±2,53 ^a
Valor de P	0,001	0,385	0,005	0,002

Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes para $P \leq 0,05$

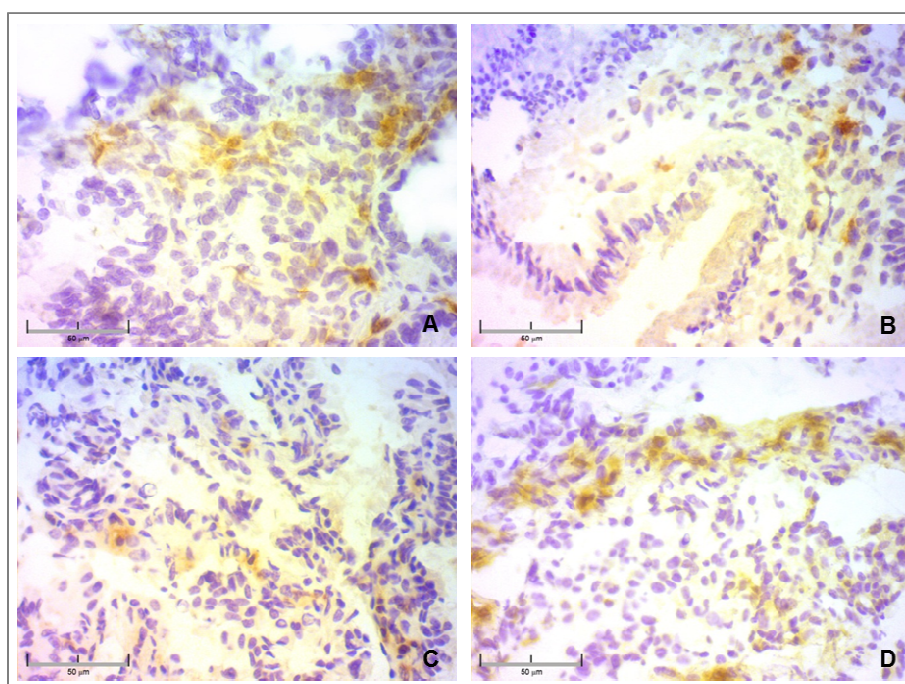


Figura 1. Micrografia de ceco e íleo aos 7 dias de idade comparando as contagens de linfócitos T CD4+ e CD8+ nos diferentes tratamentos. A. Ceco, grupo tratado com *Enterococcus faecium*, linfócito T CD4+, B. Ceco, grupo controle, linfócito T CD4+, C. Íleo, grupo tratado com *Enterococcus faecium*, linfócito T CD8+, D. Íleo, grupo controle, linfócito T CD8+ (Imunoistoquímica, 40x).

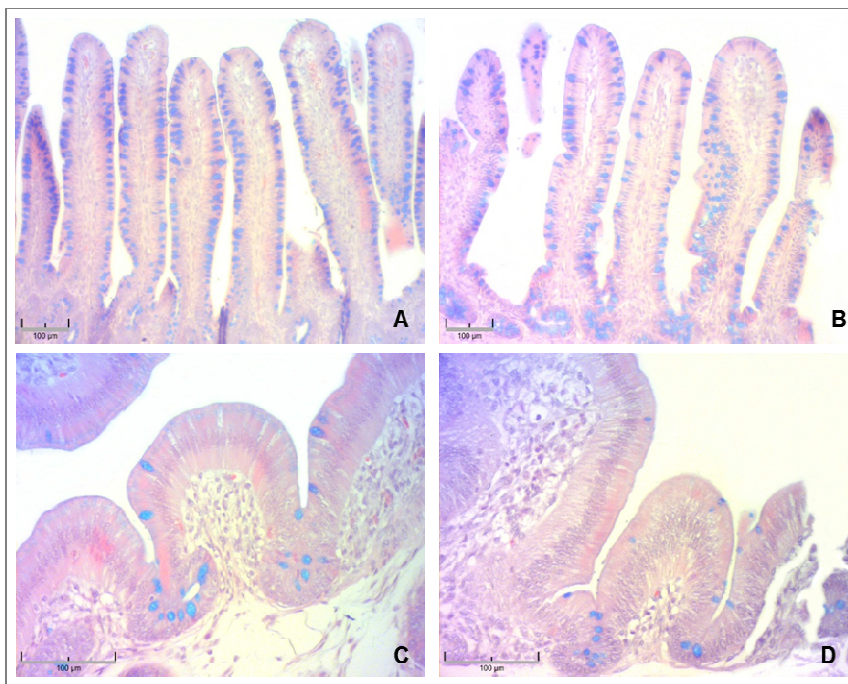


Figura 2. Micrografia de ceco e íleo aos 7 dias de idade comparando as contagens de células caliciformes nos diferentes tratamentos. **A.** Íleo, grupo tratado com *Enterococcus faecium* (H.E e Alcian Blue, 10x), **B.** Íleo, grupo controle (H.E e Alcian Blue, 10x), **C.** Ceco, grupo tratado com *Enterococcus faecium* (H.E e Alcian Blue, 20x), **D.** Ceco, grupo controle (H.E e Alcian Blue, 20x).

A Tabela 5 mostra os resultados da dinâmica celular na mucosa do íleo e ceco de frangos aos 35 dias de idade. Não são observadas diferenças significativas entre os grupos para células caliciformes. Entretanto observa-se menor quantidade de células CD4⁺ no íleo e CD8⁺ no ceco no grupo alimentado com EF na ração quando comparado ao grupo desafiado que não consumiu EF. Para relação CD4⁺:CD8⁺ no íleo observa-se significativamente ($P \leq 0,05$) menor quantidade de células CD4⁺ que CD8⁺ no grupo que consumiu EF em relação aos grupos inoculado e não inoculado com SM que não receberam probióticos na dieta. No ceco, o grupo inoculado com SM apresentou maior quantidade de células CD8⁺ que o grupo não inoculado, entretanto o grupo alimentado com EF foi estatisticamente semelhante a ambos os grupos (Tabela 5).

Tabela 5 – Contagem de células caliciformes, CD4+, CD8+ e relação CD4+:CD8+ por campo em íleo e ceco de frangos de corte aos 35 dias de idade (aumento de 100X).

Tratamento	Íleo			Ceco				
	CD4+	CD8+	Relação CD4:CD8	Caliciformes	CD4+	CD8+	Relação CD4+:CD8+	Caliciformes
Controle Negativo	16,20±6,48 a	6,90±4,79	3,77±3,08 a	64,50±14,95	19,60±6,10	11,50±3,57 b	2,02±1,31 b	10,85±6,09
Controle Positivo	15,50±5,58 a	11,40±6,36	1,89±1,74 a	60,95±12,76	23,70±8,35	21,90±5,68 a	1,12±0,40 a	13,70±5,36
<i>Enterococcus faecium</i> (2x10 ¹⁰ UFC/g)	7,90±3,96 b	9,20±4,69	1,07±0,83 b	62,00±9,56	21,80±3,12	14,50±4,65 b	1,72±0,89 ab	12,20±4,68
Valor de P	0,003	0,188	0,023	0,660	0,353	0,001	0,114	0,250

Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes para $P \leq 0,05$

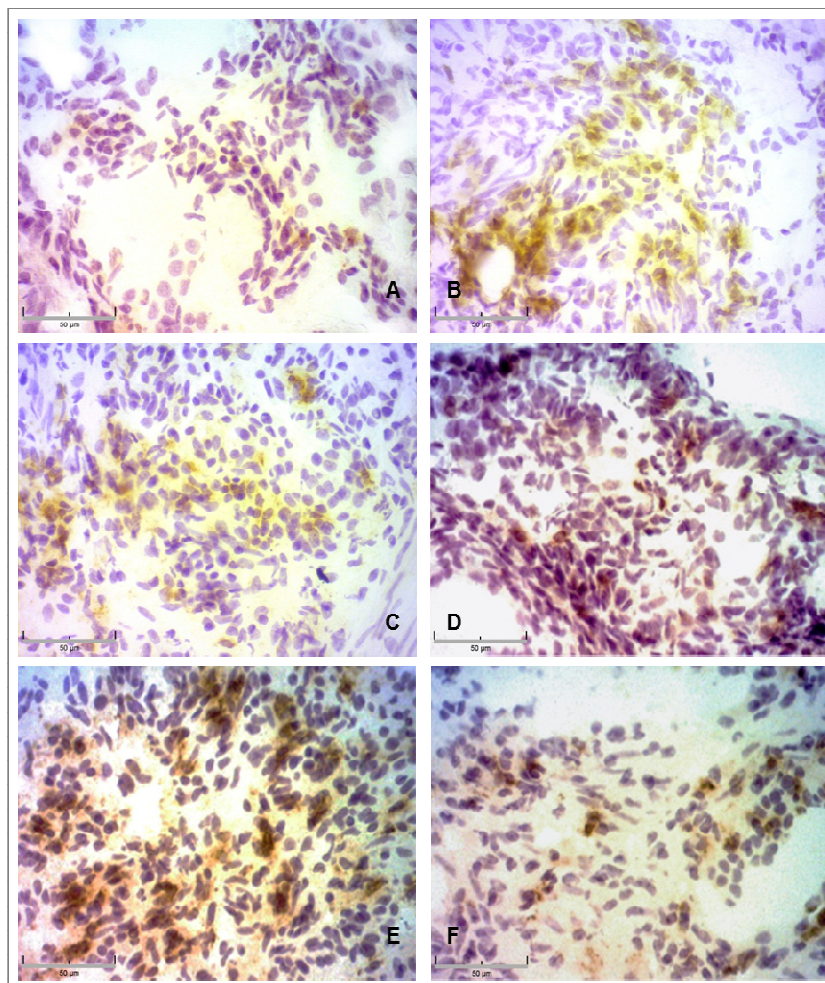


Figura 3. Micrografia de íleo e ceco aos 35 dias de idade comparando as contagens de linfócitos T CD4+ e CD8+ nos diferentes tratamentos. **A.** Íleo, grupo tratado com *Enterococcus faecium*, linfócito T CD4+, **B.** Íleo, grupo controle negativo, linfócito T CD4+, **C.** Íleo, grupo controle positivo, linfócito T CD4+, **D.** Ceco, grupo tratado com *Enterococcus faecium*, linfócito T CD8+, **E.** Ceco, grupo controle negativo, linfócito T CD8+, **F.** Ceco, grupo controle positivo, linfócito T CD8+ (Imunoistoquímica, 40x).

A figura 4 demonstra os resultados das contagens de células CD4+, CD8+, a sua relação, e células caliciformes em ceco, associada a contagem de *Salmonella*. É possível observar que as aves com maior contagem de células CD8+ apresentam maior contagem de *Salmonella*. A relação das células CD4+:CD8+ demonstra maior contagem de células CD4+ no grupo não inoculado com SM, comparado ao grupo inoculado com SM. O grupo tratado com EF obteve resultados semelhantes a ambos os grupos inoculado e não inoculado.

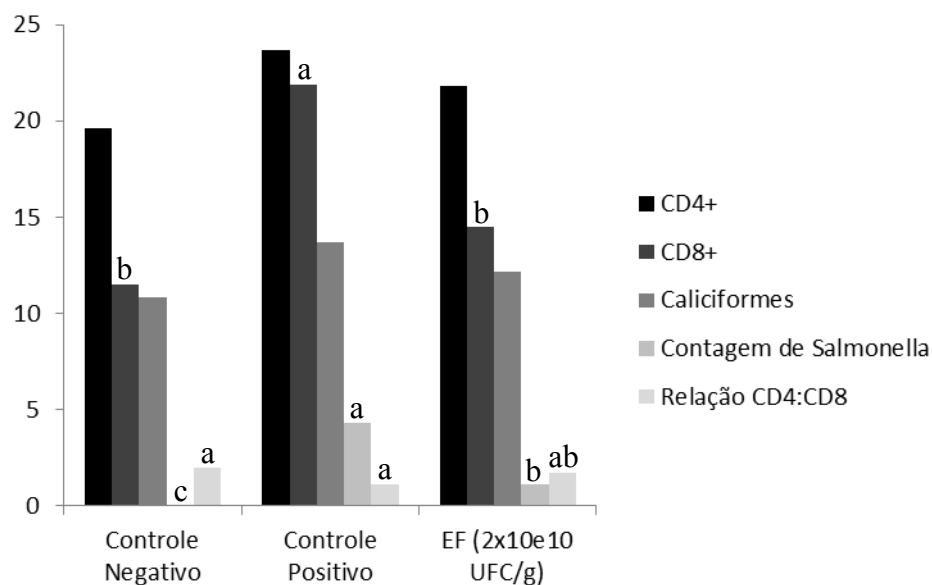


Figura 4 – Diferença entre a contagem de células CD4+, CD8+ e caliciformes por campo em ceco de frangos de corte aos 35 dias de idade (aumento de 100X) associados aos resultados de contagem de SM em ceco.

DISCUSSÃO

Segundo Lee (2010) os probióticos fornecidos diretamente na ração melhoram a saúde e a produtividade das aves através do equilíbrio da microflora intestinal e da modulação do sistema imunológico. Com isso os probióticos atuam principalmente de forma preventiva, tendo menor eficácia no tratamento de enfermidades em curso (Gaggia et al., 2010). O principal mecanismo de ação referente aos probióticos como competidor de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal de aves é pelo mecanismo de exclusão competitiva (Nurmi e Rantala, 1973). A ação de exclusão competitiva por parte das bactérias probióticas ocorre pela produção de metabólitos antimicrobianos e/ou por competição por sítios de ligação e nutrientes entre as espécies de microrganismos.

O EF tem sido empregado como probiótico apresentando melhora em desempenho (Mallo et al., 2010) e imunidade de animais (Peng Sun et al., 2010). Foi demonstrado que o EF produz enterocina A, uma bacterocina produzida, capaz de

reduzir a contagem de *Salmonella* Dusseldorf em fezes, íleo e ceco de aves (Laukova et al., 2004). No presente estudo foi observado que EF (1×10^9 UFC/g) na ração de frangos reduziu a contagem de *Salmonella* em suabes cloacais 48 horas p.i, ceco e cama das aves aos 35 dias em 61,77%, 47,20% e 73,45%, respectivamente, comparado ao controle positivo.

De acordo com Lund (2002) o EF é capaz de sobreviver ao trânsito intestinal, sendo isolado das fezes de pessoas que consumiram o mesmo na dieta. As bacterocinas produzidas pelo EF também são bastante resistentes, sendo resistentes à ácidos e sais biliares (Shin et al., 2008). Estas características, associado à produção de ácido láctico (Lewenstein et al., 1979) e a produção de bacterocinas contra *Salmonella* (Laukova et al., 2004) pode explicar em parte os resultados encontrados neste estudo. A atividade antimicrobiana do EF pode atuar não somente sobre a *Salmonella* sp., mas também sobre a flora autóctone do animal, regulando a mesma (Mareková et al., 2003; Bhardwaj et al., 2010), podendo assim dificultar a ação da *Salmonella* spp. No papo, não houve redução da contagem de SM, entretanto as contagens observadas foram baixas quando comparada a prévios estudos com o sorotipo Enteritidis onde esses valores são expressivamente mais altos. A não redução de SM no papo por parte do EF pode se dever a não fixação do mesmo. Há grande fixação de *Lactobacillus* spp. logo após a alimentação das aves (Fuller, 1997), o que pode impedir a colonização do EF no papo. Entretanto, a presença de *Lactobacillus* spp. pode não reduzir a contagem de *Salmonella* spp no papo. Segundo van der Wielen et al. (2002) o *Lactobacillus crispatus* não foi capaz de inibir o crescimento da *Salmonella* Enteritidis no papo de frangos de corte, o que poderia justificar a presença da SM no papo.

O EF afetou também a dinâmica celular na mucosa intestinal de aves aos sete dias, antes mesmo do contato com a SM. No íleo e ceco de aves alimentadas com EF

observou-se aumento de células caliciformes em relação a aves que não consumiram o probiótico. As células caliciformes são responsáveis pela manutenção da camada de muco que atua como proteção física e biológica, além de ser componente da resposta imune inata (Uni et al., 2003). A colonização de diferentes porções do trato gastrointestinal por bactérias específicas pode ocorrer pela associação com a camada de muco e imunoglobulinas no processo descrito como imune inclusão/exclusão (Everett et al., 2004). Esta adesão atua como a primeira barreira de defesa contra os microorganismos nocivos e contra toxinas (Nousiainen et al., 2005) o que pode também justificar a redução de SM isolada em aves alimentadas com este probiótico. Os estímulos produzidos pela colonização dos probióticos são essenciais para o desenvolvimento de um sistema imunológico funcional e balanceado, incluindo a presença de linfócitos T e B na lâmina própria, assim como a expansão e maturação de IgA e também na indução de tolerância por parte dos antígenos presentes (Borchers et al., 2009).

Após o desafio com SM, foi observado no ceco de aves alimentadas com probióticos aumento no número de células CD4+ em relação ao grupo controle, mas redução na presença de células CD8+. Segundo Van Immerseel (2009), o encontro de células epiteliais especializadas com microorganismos rapidamente estimula a liberação de quimiocinas pró-inflamatórias que atraem células imunológicas inatas, como granulócitos e macrófagos, capazes de desencadear um amplo leque de novas reações imunes, como o aparecimento de linfócitos T auxiliares (células CD4+).

Assim, a redução de células CD8+ na mucosa do ceco de aves alimentadas com EF em relação ao grupo controle pode ser associada a redução de bactérias patogênicas no lúmen intestinal como também apresentada em outros estudos. Scharek et al.(2005) associa a redução de células CD8+ a redução na contagem de *E. coli*. Assim pode-se

especular que outro mecanismo de ação dos probióticos, além da exclusão competitiva associada a produção de compostos inibidores de bactérias patogênicas e competição por sítios de ligação, esteja também relacionado com a melhora da imunocompetência da mucosa intestinal.

CONCLUSÃO

O uso do probiótico a base de *Enterococcus faecium* foi eficiente no aumento da resposta inespecífica aos sete dias. Também foi eficaz na redução da contagem de SM em suabes de cloaca e ceco de frangos de corte, assim como na cama sobre a qual os animais estavam sendo criadas. Aos 35 dias houve redução da resposta imunológica, correspondendo com a redução da contagem de SM observada em ceco e na cama. Os resultados obtidos no presente experimento sugerem ação inibitória contra SM, associada com habilidade imunomodulatória do trato gastrointestinal.

REFERÊNCIAS

- AWAD, W.; GHAREEB, K.; BÖHM, J. Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a symbiotic containing *Enterococcus faecium* and oligosaccharides. **International Journal of Molecular Sciences**, v.9, p.2205-2216, 2008.
- BHARDWAJ, A.; GUPTA, H.; KAPILA, S.; KAUR, G.; VIJ, S.; MALIK, R.K. Safety assessment and evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* KH 24 strain under *in vitro* and *in vivo* conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, p.156-164, 2010.
- BORCHERS, A.T.; SELMI, C.; MEYERS, F.J. et al. Probiotics and immunity. **Journal of Gastroenterology**, v.44, p.26-46, 2009.
- BRASIL. MAPA, Instrução Normativa nº62 publicada em 26 de agosto de 2003.
- CALLAWAY, T.R.; EDRINGTON, T.S.; ANDERSON, R.C. et al. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. **Animal Health Research Reviews**, v.9, p.217-225, 2008.

CARDOSO, T.G.; CARVALHO, V.M. Toxinfecção por *Salmonella* spp. **Revista do Instituto Ciências da Saúde**, v.24, n.2, p.95-101, 2006.

DAHIYA, J.P.; WILKIE, D.C.; VAN KESSEL, A.G. et al. Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. **Animal Feed Science and Technology**, v.129, p.60-88, 2006.

DESMIDT M, DUCATELLE R, HAESEBROUCK F. Serological and bacteriological observations on experimental infection with *Salmonella* Hadar in chickens. **Veterinary Microbiology**, v.60, p.259-269, 1998.

EVERETT, M. L.; PALESTRANT,D.; MILLER,S.E. et al. Immune exclusion and immune inclusion: A new mode of host-bacterial interactions in the gut. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v.4, p.321-332, 2004.

FULLER R. Introduction. In: FULLER R. editor Probiotics 2: Applications and Practical Aspects. London: Chapman & Hall, 1997. p 1-9.

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

HARIHARAN, H.; MURPHY, G.A. e KEMPF, I. *Campylobacter jejuni*: Public health hazards and potential control methods in poultry: a review. **Veterinary Medicine - Czech**, v.49, p.441-446, 2004.

HAVENAAR, R.; TEN BRINK, B.; HUIS IN 'T VELD, J.H.J. Selection of strains for probiotic use. In: FULLER R editor, Probiotics, The Scientific Basis. London: Chapman & Hall, 1992. p. 209–224.

LAUKOVÁ, A.; GUBA, P.; NEMCOVÁ, R. et al. Inhibition of *Salmonella enterica* serovar Düsseldorf by enterocin A in gnotobiotic Japanese quails. **Vet Med Czech**, v.49, p.47–51, 2004.

LEE, K.; LILLEHOJ, H.S.; SIRAGUSA, G.R. Direct-fed microbials and their impact on the intestinal microflora and immune system of chickens. **The Journal of Poultry Science**, v.47, p.106-114, 2010.

LEWENSTEIN, A.; FRIGERIO, G.; MORONI, M. Biological properties of sf68, a new approach for the treatment of diarrhoeal diseases. **Current Therapeutic Research**, v.26, p.967–981, 1979.

LUND, B.; ADMASSON, I.; EDLUND, C. Gastrointestinal transit survival of an *Enterococcus faecium* probiotic strain administered with or without vancomycin. **International Journal of Food Microbiology**, v.77, p.109–115, 2002.

MALLO, J.J.; RIOPEREZ, J.; HONRUBIA, P. The addition of *Enterococcus faecium* to diet improves piglet's intestinal microbiota and performance. **Livestock Science**, v.133, p.176-178, 2010.

MAREKOVÁ, M.; LAUKOVÁ, A.; DeVUYST, L.; SKAUGEN, M.; NES, I.F.; Partial characterization of bacteriocins produced by environmental strain *Enterococcus faecium* EK13. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.523-530.

MITEVA, T.; BOYTCHEVA, B. Investigation of inhibitory activity of Enterococci isolated from the digestive tract of chickens against some enteropathogenic bacteria. **Trakia Journal of Sciences**, v.6, s.1, p.41-44, 2008.

MOUNI, F; AISSI, E; HERNANDEZ, J; et al. Effect of Bifidobacterium bifidum DSM 20082 cytoplasmatic fraction on human imune cells. **Immunol. Invest.**, v.38, n.1, p.104-15, 2009.

NATIONAL RESEARCH CONCIL. 1994. Nutrient requirements of poultry. 9th rev. ed. National Academy Press: Washington, D.C.

NOUJAIM, J.C.; ANDREATTI FILHO, R.L., LIMA, E.T., et al. Detection of T Lymphocytes in Intestine of Broiler Chicks Treated with *Lactobacillus* spp. and Challenged with *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. **Poultry Science**, v.87, p.927–933, 2008.

NOUSIAINEN, J.; JAVANAINEN, P.; SETÄLÄ, J. et al. Lactic Acid Bacteria as Animal Probiotics. In: Salminen S, Von Wright A, Ouwehand A, editors. Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects. New York: Marcel Dekker, 2005. Cap. 20.

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

PICKLER, L.; HAYASHI, R.M.; LOURENÇO, M.C. et al. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, in press, 2011.

REID, G., FRIENDSHIP, R. Alternative to antibiotic use: probiotics for the gut. **Animal Biotechnology**, v.13, p.97-112, 2002.

SCHAREK, L.; GUTH, J.; REITER, K. et al. Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.105, p.151–161, 2005.

SHIN, M.S.; HAN, S.K.; JI, A.R.; KIM, K.S.; LEE, W.K. Isolation and characterization of bacteriocin-producing bacteria from the gastrointestinal tract of broiler chickens for probiotic use. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, p.2203-2212.

SMIRNOV A., SKLAN D., UNI Z. Mucin dynamics in the chick small intestines are altered by starvation. **Journal of Nutrition**, v.134, p.736-742, 2004.

SOERJADI, A. S., STEHMAN, S. M., SNOEYENBOS, G. H. et al. Some measurements of protection against paratyphoid *Salmonella* and *Escherichia coli* by competitive exclusion in chickens. **Avian Diseases**, v.24, p.706–712, 1981.

SUN, P.; WANG, J.; JIANG, Y. Effects of *Enterococcus faecium* (SF68) on immune function in mice. **Food Chemistry**, v.123, p.63–68, 2010.

UNI, Z.; SMIRNOV, A.; SKLAN, D. Pre- and Posthatch development of goblet cells in the broiler small intestine: effect of delayed access to feed. **Poultry Science**, v.82, p.320–327, 2003.

van der WIELEN, P.W.J.J.; LIPMAN, L.J.A.; van KNAPEN, F.; et al. Competitive Exclusion of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis by *Lactobacillus crispatus* and *Clostridium lactatifermentans* in a Sequencing Fed-Batch Culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.2, p.555-559, 2002.

van IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; DE SMET, I. et al. The effect of vaccination with a *Salmonella enteritidis* aroA mutant on early cellular responses in caecal lamina propria of newly-hatched chickens. **Vaccine**, v.20, p.3034–3041, 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Probióticos são importantes na avicultura industrial, pois podem atuar melhorando o desempenho zootécnico dos animais. Esta melhoria ocorre pela exclusão competitiva com bactérias patogênicas, mantendo o equilíbrio da microbiota intestinal. Há também o estímulo do sistema imunológico, melhorando a resposta imune frente a desafios.

No presente estudo, a utilização de *Enterococcus faecium* na dieta das aves alterou a dinâmica da infiltração de células imunológicas na mucosa intestinal de frangos de corte. Após o desafio contra *Salmonella* Minnesota, o grupo tratado com *Enterococcus faecium* apresentou menor colonização do intestino por essa bactéria e alterou o status de células imunológicas na mucosa intestinal das aves. Estes resultados demonstram que o *Enterococcus faecium* auxilia no controle da infecção por *Salmonella* Minnesota através de diversos mecanismos entre eles melhorando a imuno competência da mucosa intestinal.