

# Probiótico dietético em um modelo de infecção experimental de enterite necrótica em frangos de corte

*Dietary probiotic in an experimental infection model of necrotic enteritis in broilers*

Jovanir Inês Muller Fernandes<sup>[a]</sup>, Caio Tellini<sup>[b]</sup>, Jean Paulo Contini<sup>[b]</sup>, Raquel Cristina Kosmann<sup>[b]</sup>, Edna Tereza de Lima<sup>[c]</sup>, Luciana Kazue Otutumi<sup>[d]</sup>, Maira Rodrigues Dourado<sup>[e]</sup>

<sup>[a]</sup> Médica veterinária, Doutora em Zootecnia, Professora adjunta do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Palotina, PR, Brasil, e-mail: jimfernandes@ufpr.br

<sup>[b]</sup> Médicos veterinários, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Palotina, PR, Brasil, e-mails: caiotellini@gmail.com, jeancontini33@gmail.com, raquelkosmann@gmail.com

<sup>[c]</sup> Médica veterinária, Doutora em Patologia Aviária, Professora adjunta do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Palotina, PR, Brasil, e-mail: etlima@ufpr.br

<sup>[d]</sup> Médica veterinária, Doutora em Zootecnia, Professora do curso de Medicina Veterinária e do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Paranaense (Unipar), Umuarama, PR, Brasil, e-mail: otutumi@unipar.br

<sup>[e]</sup> Tecnóloga em Alimentos, Mestranda em Ciência Animal, Universidade Paranaense (Unipar), Umuarama, PR, Brasil, e-mail: mairadourado\_ta@hotmail.com

## Resumo

O controle da enterite necrótica é difícil devido ao número de fatores predisponentes envolvidos. O uso de estratégias de regeneração da mucosa intestinal pós infecção, como probióticos, podem fortalecer o sistema imune por meio da melhora das condições da microbiota intestinal e do aumento dos mecanismos de defesa das aves. O objetivo do experimento foi avaliar o efeito do probiótico em um modelo de infecção experimental de enterite necrótica sobre o desempenho, rendimento de carcaça, morfometria intestinal e a resposta imunológica de frangos de corte. Foram utilizados 200 pintainhos, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos, sendo T<sub>1</sub> – ração basal (controle); T<sub>2</sub> – ração basal suplementada com o probiótico; T<sub>3</sub> – ração basal suplementada com o probiótico e infecção experimental; T<sub>4</sub> – ração basal e infecção experimental, e cinco repetições de 10 aves cada. O protocolo de infecção consistiu na aplicação de dexametasona (colírio 2mg/mL), duas vezes ao dia (16<sup>o</sup>, 17<sup>o</sup> e 18<sup>o</sup> dias de idade), com o objetivo de causar imunossupressão; e a inoculação de *Clostridium* spp. no 19<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> de idade. No 25<sup>o</sup> dia e no 42<sup>o</sup>, duas aves de cada repetição foram eutanasiadas e a mucosa do intestino e o soro sanguíneo foram coletados para mensuração de IgA. A suplementação de probiótico não resultou em diferença significativa nos parâmetros avaliados. Nas condições em que o experimento foi realizado, conclui-se que a suplementação de probiótico não melhora os parâmetros avaliados.

**Palavras-chave:** *Clostridium* spp. Desempenho Produtivo. IgA. Mucosa Intestinal. Morfometria.



## Abstract

*The control of necrotic enteritis is difficult due to the number of risk factors that are involved. The use of strategies for the regeneration of intestinal mucosa after infection, such as probiotics, can strengthen the immune system by improving the conditions of the intestinal microbiota and increasing the defense mechanisms of poultry. The objective of the experiment was to evaluate the effect of probiotics on a model of experimental infection of necrotic enteritis on the performance, carcass yield, intestinal morphology, and immune response of broilers. Two hundred chicks were used, distributed in a completely randomized design with four treatments: T1 - basal diet (control); T2 - basal diet supplemented with probiotics; T3 - basal diet supplemented with the probiotic and experimental infection; T4 - basal diet and experimental infection, with five replicates of 10 birds each. The protocol consisted of infection in the application of dexamethasone (2mg/mL drops), twice daily (at 16, 17, and 18 days of age) with the aim of causing immunosuppression, and inoculation of *Clostridium* spp. at 19 and 20 days of age. On the 25th and the 42nd days, two birds per replicate were euthanized and the intestinal mucosa and serum were collected for measurement of IgA. The probiotic supplementation did not result in significant differences in the evaluated parameters. Considering the conditions in which the experiment was conducted, it can be concluded that probiotic supplementation does not improve the evaluated parameters.*

**Keywords:** *Clostridium* spp. Productive Performance. IgA. Intestinal Mucosa. Morphometry.

## Introdução

A produção de carne de frango no Brasil chegou a 13,146 milhões de toneladas em 2015. Com este desempenho, o país ultrapassou a China, terceiro produtor mundial hoje e cuja produção em 2015 teria somado 13,025 milhões de toneladas. O Brasil está abaixo apenas dos Estados Unidos, com 17,966 milhões de toneladas (ABPA, 2016).

A intensificação da produção de carne de frango justifica-se pelos avanços significativos nas áreas de genética, nutrição e ambiência. A nutrição, em especial, teve grande relevância neste processo pelo custo que representa, chegando a 70% da produção.

Além disso, o uso de antimicrobianos melhoradores de desempenho na ração foi fundamental para que se alcançasse tamanho volume de produção, trazendo grandes benefícios em termos de desempenho e eficiência alimentar quando utilizados em doses subterapêuticas. Desde 2006, no entanto, a União Europeia exige o fim do uso contínuo de antibióticos como melhorador de desempenho, uma vez que existe a possibilidade destes serem tóxicos ou cancerígenos, o que, por sua vez, poderia comprometer a saúde humana

quando seus resíduos estivessem presentes em produtos alimentícios de origem animal, além dos problemas de resistência bacteriana (Junqueira e Duarte, 2012).

Desta forma, a busca por alternativas que substituam os antibióticos, torna-se de grande importância, dentre as quais se destacam os probióticos. Esses são definidos como suplementos de microrganismos que afetam de modo benéfico o hospedeiro, por meio do balanço microbiano intestinal (Fuller, 1989).

Segundo Pedroso (2003), os probióticos se baseiam no princípio da simbiose em que há a associação de organismos superiores com a microbiota bacteriana, proporcionando aos envolvidos benefícios recíprocos, pela diminuição das chances de sobrevivência das bactérias patogênicas, melhoria da estabilidade da microbiota normal e aproveitamento dos nutrientes ingeridos.

Uma das doenças mais comuns na avicultura moderna e que gera grandes prejuízos econômicos devido a sua alta patogenicidade é a Enterite Necrótica (EN), causada pelo microrganismo *Clostridium perfringes* tipo A e C (Van Immerseel et al., 2004).

De acordo com Bannam et al. (2011), a forma aguda desta doença leva ao aumento da mortalidade das aves e, em sua forma subclínica, à diminuição do ganho de peso e consequente perda de produtividade, o que traz grandes prejuízos ao produtor. Além disso, sabe-se que o *C. perfringens* em aves constitui risco de transmissão aos humanos por meio dos alimentos (Van Immerseel et al., 2004).

Segundo Abildgaard et al. (2009), esta bactéria, um esporo gram-positivo e anaeróbico, tem seu mecanismo exato de ação sobre a EN pouco elucidado. No sistema de produção atual, o controle da EN é dificultado devido ao grande número de fatores predisponentes envolvidos, como ração, água e instalações contaminadas, além da presença de outros patógenos associados (Gil de los Santos et al., 2008).

Yegani e Korver (2008) relatam que a infecção subclínica por coccidiose é um fator importante que contribui para uma infecção por *Clostridium* spp., visto que os protozoários do gênero *Eimeria* multiplicam-se no trato intestinal, causando danos ao tecido, o que resulta na interrupção dos processos digestivos ou de absorção, e como consequência, a redução no ganho de peso e o aumento na susceptibilidade a outros agentes patogênicos.

Esses danos causados à mucosa intestinal influem diretamente sobre o sistema imune da ave, uma vez que as células B, presentes em toda sua superfície, são responsáveis pela produção de imunoglobulinas A (IgA). Esta classe de imunoglobulina inibe o ataque e penetração de bactérias no lúmen, aumenta a produção de muco e previne processos inflamatórios que poderiam causar lesões ao tecido (Kim, 2011).

Desta forma, o uso de estratégias que possam reduzir os impactos causados pelas infecções por *Clostridium perfringens*, tais como os probióticos são essenciais para a manutenção dos atuais índices de produção de frangos de corte.

Trabalhos desenvolvidos com o uso de probióticos em dietas de frangos de corte têm demonstrado melhoras no desempenho (Mountzouris et al., 2007; Rigobelo et al., 2011), rendimento de carcaça (Rocha et al., 2010) e morfometria intestinal (Pelicano et al., 2005). No entanto, há poucos relatos na literatura de trabalhos avaliando a eficácia de probióticos em condições de desafio por *Clostridium* spp.

Particularmente em relação ao desafio por *C. perfringens*, resultados promissores foram encontrados por Haghighi et al. (2006), os quais verificaram estímulo da produção de IgA anti-toxina  $\alpha$  de *C. perfringens* com uso de probiótico a base de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e *Streptococcus faecalis*.

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos da adição de um probiótico comercial na ração de frangos de corte, desafiados por meio de uma infecção experimental por *Clostridium* spp., sobre os parâmetros zootécnicos de rendimento de carcaça, morfo-quantitativos do intestino e imune no soro e mucosa intestinal.

## Materiais e Métodos

### Tratamentos e Delineamento Experimental

O experimento foi realizado no Laboratório de Experimentação Avícola (LEA) e no Aviário Experimental da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, estado do Paraná, no período de setembro a outubro de 2011, após aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor Palotina da UFPR (CEUA/Palotina), sob protocolo 13/2010.

Foram utilizados 200 pintinhos de corte, machos, da linhagem *Cobb* 500 provenientes de matrizes de cerca de 40 semanas. No alojamento, os pintos foram alocados aleatoriamente de acordo com um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições de 10 aves por unidade experimental, compondo 20 unidades experimentais. Os tratamentos foram definidos da seguinte forma: Tratamento 1 – Ração basal (controle), Tratamento 2 – Ração basal suplementada com o probiótico, Tratamento 3 – Ração basal suplementada com o probiótico e infecção experimental, e Tratamento 4 – Ração basal e infecção experimental.

O programa nutricional foi dividido em duas fases, ração inicial (0 a 21 dias) e ração crescimento/abate (22 a 42 dias), conforme descrito na Tabela 1. As dietas foram formuladas à base de milho e farelo de soja, de acordo com os valores de composição química dos alimentos e as recomendações

nutricionais propostas por Rostagno et al. (2011).

O premix utilizado em todos os tratamentos era isento de qualquer aditivo, contendo apenas minerais e vitaminas. A ração e a água foram fornecidas *ad libitum*.

O probiótico foi adicionado na dosagem de 150g/ton e 100g/ton nas rações inicial e crescimento, respectivamente, e era composto por *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarium*, *Lactobacillus rhamnosus* e

*Streptococcus thermophilus*.

Ao atingirem o 16º dia de vida, as aves dos tratamentos 3 e 4 foram submetidas a aplicação de dexametasona (colírio, 2mg/mL), duas vezes por dia, pela via intraocular que se estendeu pelos dois dias seguintes (17º e 18º dias de idade). Aos 19 e 20 dias de idade, executou-se o protocolo de infecção experimental a partir de um inócuo a base de *Clostridium* spp., na concentração de  $1,6 \times 10^6$  UFC/mL, por meio da inoculação direta no esôfago/inglúvio com o auxílio de pipeta graduada de 1mL.

**Tabela 1** - Composição percentual e valores calculados das dietas experimentais de frangos de corte no período inicial (1 a 21 dias) e crescimento/final (22 a 42 dias)

Ingredientes (%)	Ração inicial	Ração cresc./final
Milho	52,97	61,61
Farelo de soja	39,34	30,06
Óleo de soja	3,14	3,97
Calcário 38%	0,98	1,02
Fosfato bicálcico	2,09	1,98
Caulim*	0,10	0,10
Sal comum	0,37	0,36
Bicarbonato de Sódio	0,09	0,11
L-lisina	0,18	0,21
DL-metionina	0,28	0,22
L-treonina	0,04	0,04
Premix vit. e mineral <sup>1,2</sup>	0,30	0,30
Valores calculados		
Proteína, %	22,50	19,00
EM, Kcal/Kg	2949	3100
Cálcio, %	1,00	0,97
Fósforo Disponível, %	0,50	0,47
Lisina Dig., %	1,25	1,06
Metionina Dig., %	0,59	0,49
Met.+Cistina Dig., %	0,89	0,75
Treonina Dig., %	0,80	0,68
Mongin, Meq 100g <sup>-1</sup>	228,22	192,72

Nota: \*Substituído parcialmente pelo probiótico.<sup>1</sup>Mistura Vitamínica Inicial (Conteúdo por kg de premix): Vit.A 7.000.000,00UI ; Vit.D3 2.200.000,00UI ; Vit.E 11.000,00mg ; Vit.K3 1.600,00mg; Vit. B1 2.000,00mg; Vit. B2 5.000,00mg; Vit. B12 12.000,00mg; Niacina 35.000,00mg; Ácido Pantotênico 13.000,00mg; Ácido Fólico 800,00mg; Antioxidante 100.000,00; Veículo q.s.p. 1.000,00g. <sup>2</sup>Mistura Mineral (Conteúdo por kg de premix): Ferro 10.000,00mg; Cobre 16.000,00mg; Iodo 2.400,00mg; Zinco 100.000,00mg; Manganês 140.000,00mg; Selênio 400,00mg; Veículo q.s.p. 1.000,00g.

## Preparo do Inóculo a base de *Clostridium* spp

Foram utilizadas amostras de *Clostridium* spp. isoladas da porção do jejuno e cecos de um frango de corte com 30 dias de idade. As porções dos cecos e jejuno foram removidas assepticamente e transferidas individualmente para embalagens plásticas estéreis (Nasco - Whirl-Pak®). As amostras devidamente identificadas foram maceradas e vertidas em tubos contendo 10 mL de caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI). Os tubos foram incubados a 37 °C por 24 horas, em condições de anaerobiose (Anaerobac - PROBAC®). Após o período de incubação, as amostras foram semeadas em Agar base (Himedia®), enriquecido com sangue de carneiro. As placas foram incubadas em condições de anaerobiose a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, verificou-se o crescimento de colônias típicas de *Clostridium* spp., as quais apresentavam dupla zona de hemólise, colônias planas e elevadas no centro. A identificação foi feita pela detecção das bactérias Gram-positivas, com forma de bastonete esporulado e catalase negativa. Em seguida, as colônias típicas foram submetidas aos testes bioquímicos. Nestes testes foram avaliadas a presença de motilidade, fermentação de lactose, maltose, sacarose, salicina e prova do indol.

Para preparação do inóculo, as colônias foram cultivadas em 3 mL de caldo BHI, com incubação a 37 °C por 24 horas em condições de anaerobiose. O número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) do inóculo ( $1,6 \times 10^{-6}$  UFC/mL) foi determinado por diluições decimais em solução tampão de salina fosfatada (PBS) com pH 7,0. Todas as determinações bacterianas foram realizadas pelo plaqueamento de 0,1mL das respectivas diluições decimais até  $10^{-8}$ , em duplicata de ágar BHI, com auxílio da alça de Drigalski. Após o período de incubação, realizou-se a leitura das placas, onde as colônias foram contadas e os resultados expressos de acordo com Procedimentos de Contagem de Colônia da Normativa nº. 62, publicada em 26 de agosto de 2003 (Brasil, 2003).

## Avaliações

Nos 25º e 42º dias de idade, duas aves de cada unidade experimental foram retiradas para a coleta de sangue (por meio do acesso à veia

ulnar) e posterior eutanásia, utilizando a técnica de deslocamento cervical, segundo aprovação do comitê de ética e pesquisa envolvendo experimentação animal (13/2010- CEUA em 14 de março de 2010). As amostras de soro foram utilizadas para avaliação do perfil eletroforético da imunoglobulina A (IgA) pela técnica da eletroforese vertical em gel de poliacrilamida a 12% na presença de agente redutor (SDS-PAGE) (Silva et al., 2008). Os soros das aves foram analisados individualmente em duplicata e os resultados foram expressos como médias das densidades óticas determinadas em comprimento de onda de 495 nm.

Das aves eutanasiadas, foram obtidos raspados da mucosa do intestino delgado, os quais foram homogeneizados e utilizados para avaliação de IgA, de acordo com a metodologia descrita para o perfil sérico de IgA.

Além disso, foram colhidas amostras de fragmentos do duodeno, jejuno e íleo para realização das análises morfométricas (altura de vilos, profundidade de cripta e a relação vilos/cripta) e quantitativas (contagem de células caliciformes). As amostras foram lavadas em solução salina, fixadas em solução de formol tamponado e, posteriormente, desidratadas em série de concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol, e incluídas em parafina conforme metodologia descrita por Beçak e Paulete (1976). Foram obtidos cortes histológicos longitudinais e semi-seriados com 5 µm de espessura, que foram, posteriormente, corados pelo método hematoxilina-eosina (análise morfométrica) e ácido periódico de Schiff - PAS (análise quantitativa).

Para os estudos morfométrico e quantitativo, as imagens foram capturadas por microscopia de luz, utilizando-se o sistema analisador de imagens computadorizado (Image Pro-Plus®- versão 5.2 - média cibernética). Foi mensurada a altura de 20 vilos e a profundidade de 20 criptas de cada repetição por segmento e destes valores foi obtida a média.

Quanto aos parâmetros zootécnicos, foram avaliados: ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar nos períodos de 16 a 25, 16 a 42, 25 a 42, e 1 a 42 dias de idade.

Como parâmetros de carcaça, avaliou-se o rendimento em função do peso da ave ao abate, bem como o rendimento de cortes (peito e coxa) no final do período experimental (42 dias de idade).

**Tabela 2** - Ganho de peso (g), consumo de ração (g) e conversão alimentar (g/g) de frangos de corte nos períodos de 16 a 25, 25 a 42 e 1 a 42 dias de idade, desafiados ou não por *Clostridium* spp. e recebendo dietas suplementadas ou não com um probiótico

Tratamentos	Ganho de peso (g)	Consumo de ração (g)	Conversão alimentar (g/g)
	16 a 25 dias		
Controle	748,20 <sup>a</sup> ±39,73	1073,25±36,50	1,44±0,05
Probiótico	738,60 <sup>ab</sup> ±34,75	1045,00±29,15	1,41±0,07
Probiótico + Desafio	690,32 <sup>c</sup> ±27,79	1048,03±49,14	1,52 ±0,10
Desafio	701,00 <sup>bc</sup> ±25,92	1060,09±51,29	1,51±0,10
Valor de P	0,0387	0,7814	0,1918
CV%	5,33	3,90	6,35
16 a 42 dias			
Controle	2227,43±178,19	3397,71±164,83	1,53±0,09
Probiótico	2118,88±165,10	3331,21±76,71	1,61±0,13
Probiótico + Desafio	2141,37±195,58	3249,01±117,39	1,53±0,16
Desafio	2115,73±162,85	3268,27±208,11	1,55±0,09
Valor de P	0,7714	0,4902	0,7474
CV%	7,75	4,56	7,32
25 a 42 dias			
Controle	1479,23±154,20	2324,46±185,14	1,58±0,12
Probiótico	1380,28 ±169,00	2279,21 ±48,26	1,67 ±0,24
Probiótico + Desafio	1451,05 ±171,21	2200,98 ±71,87	1,54 ±0,20
Desafio	1414,72 ±178,81	2208,18 ±179,30	1,57 ±0,15
Valor de P	0,8284	0,4629	0,6941
CV%	11,14	5,82	11,37
1 a 42 dias			
Controle	2702,18±199,16	4079,71±198,04	1,51±0,08
Probiótico	2597,36±190,61	4024,71±67,10	1,58±0,11
Probiótico + Desafio	2615,82±206,65	3917,81±113,64	1,51±0,13
Desafio	2592,01±184,42	3959,80±204,46	1,53±0,09
Valor de P	0,8301	0,4650	0,7302
CV%	6,99	3,93	6,54

Nota: CV% = Coeficiente de Variação. Médias seguidas de letras diferentes na coluna são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey (P < 0,05).



## Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando-se o programa SAS (*Statistical Analysis System*). Como procedimento estatístico, foi utilizado o teste *Tukey* ( $P < 0,05$ ) para comparação das médias.

## Resultados e discussão

As rações suplementadas com probiótico e/ou com o desafio por *Clostridium* spp. não promoveram melhoras no desempenho de frangos de corte nos períodos de 16 a 25, 16 a 42, 25 a 42 e 1 a 42 dias de idade ( $P > 0,05$ ) (Tabela 2), no entanto, o ganho de peso no período de 16 a 25 dias de idade foi inferior ( $P < 0,05$ ) para os tratamentos que receberam desafio por *Clostridium* spp. em relação ao tratamento controle.

Jayaraman et al. (2013), ao avaliarem o efeito da suplementação de um probiótico contendo esporos de *Bacillus subtilis* em dietas de frangos de corte desafiados ou não com *Clostridium perfringens*, verificaram que os animais infectados com o *Clostridium perfringens* e recebendo a dieta suplementada com o probiótico apresentaram pior conversão alimentar em relação aos animais do tratamento controle ( $P < 0,05$ ), no entanto, o ganho de peso não foi influenciado pela infecção.

Cabe salientar que no trabalho desenvolvido por Jayaraman et al. (2013), realizou-se a indução experimental de enterite necrótica primeiramente por meio da inoculação de oocistos esporulados

de *Eimeria* (14<sup>o</sup> dia), seguida pela inoculação de *C. perfringens* isolada de campo cinco dias após o desafio com *Eimeria*, ou seja, durante o período de 19 a 21 dias de idade. Esta diferença em termos de metodologia poderia justificar a ausência de efeito do probiótico no presente trabalho, visto que, segundo Jayaraman et al. (2013), o fator predisponente mais importante para o desenvolvimento de enterite necrótica são os danos causados pelos coccídios.

Além disso, Lima et al. (2003) enfatizam que a ocorrência de situações de desafio sanitário, de qualquer tipo de estresse, e a relação entre o número e o tipo de microrganismos viáveis presentes no probiótico, podem estar relacionadas com a eficiência do produto. Desta forma, o desafio experimental pelo qual as aves foram submetidas foi de baixo impacto sobre a microbiota intestinal, o que pode justificar a ausência de resultado benéfico do uso do probiótico sobre o desempenho produtivo.

Por outro lado, pesquisas avaliando o uso de probióticos em dietas de aves, têm demonstrado resultados promissores, independente da presença de condições de desafio sanitário (Jin et al., 1998; Kalavathy et al., 2003; Rigobelo et al., 2011).

O rendimento de carcaça e cortes (peito e coxa) também não foi influenciado pelos diferentes tratamentos ( $P < 0,05$ ) (Tabela 3).

Os dados do presente trabalho corroboram com os de Awad et al. (2009) ao trabalharem com um probiótico à base de *Lactobacillus* spp., e Souza et al. (2010), ao trabalharem com um probiótico constituído por *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium*

**Tabela 3** - Rendimento de carcaça, peito e coxa (%) de frangos de corte aos 42 dias de idade desafiados ou não por *Clostridium* spp. e recebendo dietas suplementadas ou não com um probiótico comercial

Tratamentos	Rendimento Carcaça (%)	Rendimento Peito (%)	Rendimento Coxa (%)
Controle	76,04±1,29	35,10±1,56	28,43±1,26
Probiótico	75,25±1,77	36,06±2,17	28,62±1,36
Probiótico + desafio	76,07±2,01	36,15±1,72	27,50±1,01
Desafio	76,09±1,93	36,64±2,94	28,28±1,35
Valor de P	0,6962	0,4576	0,2609
CV%	2,28	6,02	4,52

*bifidum* e *Enterococcus faecium* em frangos de corte sem serem submetidos às condições de desafio sanitário. No entanto, os *wLactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus* e *Enterococcus faecium*) encontraram melhor rendimento de peito das aves em relação à dieta sem aditivos, em condições isentas de desafio sanitário.

Os resultados dos níveis de IgA no soro e na mucosa intestinal dos frangos aos 25 dias de idade

(Tabela 4), também não foram influenciados pelos diferentes tratamentos ( $P > 0,05$ ).

Por outro lado, Haghghi et al. (2006) encontraram resultados promissores com o uso de probiótico a base de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e *Streptococcus faecalis* em animais desafiados por *C. perfringens*, tendo em vista estímulo da produção de IgA anti-toxina  $\alpha$  de *C. perfringens* com a suplementação do probiótico.

**Tabela 4** - Nível de IgA no soro (g/dL) e na mucosa intestinal (g/dL) de frangos de corte aos 25 dias de idade, desafiados ou não por *Clostridium* spp. e recebendo dietas suplementadas ou não com um probiótico comercial

Tratamentos	IgA soro		IgA mucosa intestinal	
	25 dias	42 dias	25 dias	42 dias
Controle	0,12±0,01	0,17±0,04	0,35±0,09	0,48±0,09
Probiótico	0,12±0,01	0,16±0,04	0,36±0,07	0,45±0,14
Probiótico + desafio	0,12±0,02	0,14±0,04	0,34±0,09	0,48±0,08
Desafio	0,11±0,02	0,16±0,04	0,39±0,13	0,50±0,08
Valor de P	0,8361	0,5001	0,6364	0,7949
CV%	14,03	25,50	26,55	20,71

No presente trabalho, as aves foram alojadas em aviário experimental, com cama de maravalha nova e em condições de baixo desafio sanitário, o que poderia justificar ausência de resultados significativos, visto que os probióticos podem não ter manifestado seu efeito esperado devido à ausência de desafio de campo (Lima et al., 2003).

Além disso, como enfatizado anteriormente, a ausência de um fator predisponente responsável por lesionar a mucosa intestinal (como uma infecção subclínica por coccidiose, por exemplo) poderia explicar o efeito não significativo encontrado em relação aos níveis de IgA, uma vez que o *Clostridium* spp. não causando infecção também não geraria uma resposta inflamatória local.

Por outro lado, diversos trabalhos têm demonstrado efeito da suplementação de probióticos sobre o aumento da IgA na mucosa do duodeno (Gao et al., 2008; Amerah et al., 2013) ou soro (Huang et al., 2004), independente de condições de desafio.

Em relação aos resultados da análise morfométrica (altura de vilo, profundidade de cripta e relação vilo/

cripta) do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 25 dias de idade, verificou-se que as rações suplementadas com probiótico e com desafio por *Clostridium* spp. apresentaram menor altura de vilo e menor profundidade de cripta no jejuno em relação ao tratamento controle ( $P < 0,05$ ) (Tabela 5).

Já os resultados da altura de vilo, profundidade de cripta, relação vilo/cripta do duodeno, profundidade de cripta e relação vilo/cripta do íleo não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ).

Jayaraman et al. (2013) verificaram que os animais do grupo controle infectado, ou seja, que receberam indução para o desenvolvimento de enterite necrótica, apresentaram menor altura de vilo e menor relação vilo/cripta em relação ao grupo controle e ao grupo infectado recebendo *Bacillus subtilis* como probiótico, demonstrando que a suplementação de probiótico protegeu as vilosidades intestinais dos danos causados pelo *Clostridium perfringens*.

Segundo Jayaraman et al. (2013), a relação vilo/cripta é considerada o parâmetro mais importante



**Tabela 5** - Avaliação da administração do probiótico em frangos de corte infectados experimentalmente com *Clostridium* spp. sobre a morfometria (vilo/cripta) do duodeno, jejuno e íleo aos 25 dias de idade

Tratamentos	Altura vilo (V)	Profundidade cripta (C)	Relação V/C
	(x±s)	(x±s)	(x±s)
<i>Duodeno</i>			
Controle	1408,46±308,34	227,97±28,86	6,20±1,19
Probiótico	1391,20±33,17	242,19±63,99	6,03±1,92
Probiótico + desafio	1280,53±184,89	250,67±64,54	5,46±1,73
Desafio	1096,90±406,69	197,13±37,38	5,51±1,31
Valor de P	0,3365	0,3450	0,7319
CV%	23,48	20,64	24,76
<i>Jejuno</i>			
Controle	1041,33±254,94	208,89±57,16	5,13±0,98
Probiótico	854,92 <sup>ab</sup> ±277,77	187,45 <sup>ab</sup> ±62,99	4,75±1,53
Probiótico + desafio	787,46 <sup>b</sup> ±136,17	153,46 <sup>bc</sup> ±20,75	5,19±1,02
Desafio	878,91 <sup>ab</sup> ±30,34	134,80 <sup>c</sup> ±24,20	6,64±0,91
Valor de P	0,0103	0,0023	0,0512
CV%	26,20	29,30	23,47
<i>Íleo</i>			
Controle	825,64±206,08	176,89±56,59	4,29±0,99
Probiótico	773,81 <sup>ab</sup> ±170,26	195,51±43,84	4,14±0,81
Probiótico + desafio	580,30 <sup>c</sup> ±145,09	160,20±26,44	3,66±0,82
Desafio	664,23 <sup>bc</sup> ±131,48	171,42±34,60	3,61±0,61
Valor de P	0,0008	0,3241	0,2212
CV%	26,43	24,05	21,62

Nota: CV% = Coeficiente de Variação. Médias seguidas de letras diferentes na coluna são diferentes (P < 0,05) pelo teste de Tukey.

para se medir a saúde e a recuperação intestinal. Segundo os autores, uma relação elevada indica um longo vilo no qual o epitélio esteja suficientemente maduro e funcionalmente ativo, em combinação com uma cripta rasa que apresenta renovação celular constante, o que, segundo Silva et al. (2011), corresponderia a uma maior capacidade de digestão e absorção de nutrientes.

A ausência de diferenças significativas entre os tratamentos na relação vilo/cripta no presente trabalho, também pode justificar que o desafio por *Clostridium* spp. não foi suficiente para promover danos e justificar benefícios com a suplementação do probiótico. Outra justificativa para a ausência

de resultados significativos poderia ser a via de aplicação do inóculo de *Clostridium* spp. Williams et al. (2003) recomendam inoculação via cloaca a uma profundidade de 10 cm, em função de que o baixo pH no proventrículo e moela poderia matar alguns dos microrganismos inoculados por via oral.

Por outro lado, cabe salientar que na literatura diversos trabalhos avaliando os efeitos da suplementação de probióticos sobre a morfometria intestinal, independente de condições de desafio, têm demonstrado maior altura de vilo do duodeno nos animais que receberam suplementação de probiótico (Pelicano et al., 2003; Gao et al., 2008) ou ausência de resultados da suplementação sobre

**Tabela 6** - Média  $\pm$  erro padrão da contagem de células caliciformes do duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte aos 25 dias de idade, recebendo dietas contendo ou não probiótico e/ou infectados experimentalmente com *Clostridium* spp

Tratamentos (x $\pm$ s)	Duodeno (x $\pm$ s)	Jejuno (x $\pm$ s)	Íleo (x $\pm$ s)
Controle	20,64 $\pm$ 20,68	19,60 $\pm$ 3,98	17,64 $\pm$ 2,63
Probiótico	12,51 $\pm$ 3,51	26,68 $\pm$ 16,15	18,89 $\pm$ 6,57
Probiótico + desafio	8,90 $\pm$ 2,06	17,90 $\pm$ 2,04	16,47 $\pm$ 2,49
Desafio	11,30 $\pm$ 2,49	17,60 $\pm$ 0,62	16,91 $\pm$ 3,99
Valor de P	0,3683	0,7796	0,8299

a profundidade de criptas (Carrijo et al., 2005; Fukayama et al., 2005) e altura de vilos do jejuno e/ou íleo (Pelicano et al., 2003; Ramos et al., 2011).

Em relação à contagem de células caliciformes do duodeno, jejuno e íleo dos frangos de corte aos 25 dias de idade (Tabela 6) não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos.

Por outro lado, Shareefe e Al-Dabbagh (2009) e Faixová et al. (2012) observaram aumento do número de células caliciformes das aves provenientes de tratamentos que continham probióticos.

Igualmente, Lourenço et al. (2013), ao trabalharem com um probiótico comercial à base de *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarium*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus* e *Bifidobacterium bifidum*, também verificaram aumento no número de células caliciformes aos sete dias de idade quando comparados com o controle. Contudo, essas diferenças não foram significativas aos 35 dias de idade.

As células caliciformes secretoras de muco estão presentes nos vilos e criptas e são importantes na manutenção e desenvolvimento do epitélio intestinal. Segundo Bueno et al. (2012), estas células protegem o epitélio durante os processos digestivos, possuem poder lubrificante sobre os alimentos sólidos e funcionam como uma barreira protetora, impedindo o contato de microrganismos com as células epiteliais.

Segundo Chichlowski et al. (2007), a presença de bactérias probióticas pode estimular a proliferação de células produtoras de muco, que são importantes para a manutenção da integridade da mucosa

e formar a barreira contra patógenos na mucosa intestinal, o que traz benefícios para os animais.

Por outro lado, Bueno et al. (2012), relatam que o aumento do número de células caliciformes pode não ser indicativo apenas de efeito trófico da dieta, mas pode também representar um mecanismo de proteção contra danos causados ao epitélio intestinal.

## Conclusão

A suplementação do probiótico comercial à ração das aves desafiadas por meio de uma infecção experimental por *Clostridium* spp., não apresentou melhora sobre os seguintes parâmetros: tamanho de vilos e criptas intestinais; número de células caliciformes; níveis de IgA presentes no soro e mucosa intestinal; e índices zootécnicos.

## Referências

- Abildgaard L, Sondergaard TE, Engberg RM, Schramm A, Højberg O. In vitro production of necrotic enteritis toxin B, NetB, by netB-positive and netB-negative *Clostridium perfringens* originating from healthy and diseased broiler chickens. *Veterinary Microbiology*. 2009;144(1-2):231-235.
- Associação Brasileira de Proteína Animal - ABPA. Relatório Anual ABPA 2016. [acesso em 09 ago. 2016]. Disponível em: <http://tinyurl.com/zuq692g>.
- Amerah AM, Quiles A, Medel P, Sánchez J, Lehtinen MJ, Gracia MI. Effect of pelleting temperature and probiotic

- supplementation on growth performance and immune function of broilers fed maize/soy-based diets. *Animal Feed Science and Technology*. 2013;180(1-4):55-63.
- Awad WA, Ghareeb K, Abdel-Raheem S, Böhm J. Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poultry Science*. 2009; 88(1):49-56.
- Bannam TL, Yan XX, Harrison PF, Seemann T, Keyburn AL, Stubenrauch C, et al. Necrotic enteritis-derived *Clostridium perfringens* strain with three closely related independently conjugative toxin and antibiotic resistance plasmids. *mBio*. 2011;2(5):e00190-11.
- Beçak W, Paulete J. *Técnicas de citologia e histologia*. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos; 1976.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº. 62, de 26 de agosto de 2003. Diário Oficial [da] União. Brasília: MAPA; 2003 [acesso em 10 abr. 2013]. Disponível em: <http://tinyurl.com/h25tdre>.
- Bueno R, Albuquerque R, Murarolli VDA, Aya LAH, Raposo RS, Bordin RA. Efeito da influência de probiótico sobre a morfologia intestinal de codornas japonesas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2012; 49(2):111-115.
- Carrijo AS, Madeira LA, Sartori JR, Pezzatto AC, Gonçalves JC, Cruz VC, et al. Alho em pó na alimentação alternativa de frangos de corte. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2005;40(7):673-679.
- Chichlowski M, Croom J, McBride BW, Havenstein GB, Koci MD. Metabolic and physiological impact of probiotics or direct-fed-microbials on poultry: a brief review of current knowledge. *International Journal of Poultry Science*. 2007;6(10):694-704.
- Faixová Z, Piešová E, Maková Z, Levkut MJr, Pisl J, Lauková A, et al. Effect of dietary probiotic and plant extract supplementation on mucin dynamics in the chicken intestine and on performance of chickens. *Folia Veterinaria*. 2012; 56(Supplementum II):15-17.
- Fukayama EH, Bertechini AG, Geraldo A, Kato RK, Murgas LDS. Extrato de orégano como aditivo em rações para frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2005;34(6):2316-2326.
- Fuller R. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Microbiology*. 1989;66(5):365-378.
- Gao J, Zhang HJ, Yu SH, Wu SG, Yoon I, Quigley J, et al. Effects of yeast culture in broiler diets on performance and immunomodulatory functions. *Poultry Science*. 2008; 87(7):1377-1384.
- Gil de Los Santos JR, Conceição FR, Gil-Turnes C. Enterite necrótica aviária. *Ciência Rural*. 2008; 38(7):2076-2082.
- Haghighi HR, Gong J, Gyles CL, Hayes MA, Zhou H, Sanei B, et al. Probiotics stimulate production of natural antibodies in chickens. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2006;13(9):975-980.
- Huang MK, Choi YJ, Houde R, Lee JW, Lee B, Zhao X. Effects of Lactobacilli and an acidophilic fungus on the production performance and immune responses in broiler chickens. *Poultry Science*. 2004;83(5):788-795.
- Jayaraman S, Thangavel G, Kurian H, Mani R, Mukkalil R, Chirakkal H. *Bacillus subtilis* PB6 improves intestinal health of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens* - induced necrotic enteritis. *Poultry Science*. 2013;92(2):370-374.
- Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Jalaludin S. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets Lactobacillus cultures. *Poultry Science*. 1998;77(9):1259-1265.
- Junqueira OM, Duarte KF. Probióticos na nutrição de suínos: alternativa ou solução?. 2012 [acesso em 05 abr. 2013]. Disponível em: <http://tinyurl.com/h2bdprc>.
- Kalavathy R, Abdullah N, Jalaludin S, Ho YW. Effects of Lactobacillus cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. *Brazilian Poultry Science*. 2003;44(1):139-144.
- Kim GB, Seo YM, Kim CH, Paik IK. Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. *Poultry Science*. 2011;90(1):75-82.

- Lima ACF, Pizauro Jr JM, Macari M, Malheiros EB. Efeito do uso de probiótico sobre o desempenho e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2003;32(1):200-207.
- Lourenço MC, Kuritza LN, Westphal P, Miglino LB, Pickler L, Kraieski AL, et al. Uso de probiótico sobre a ativação de células T e controle de Salmonella Minnesota em frangos de corte. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2013;33(1):11-14.
- Mountzouris KC, 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*. 2007;86(2):309-317.
- Pedroso AA. Estrutura da comunidade de bactéria do trato intestinal de frangos suplementados com promotores de crescimento [tese]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo; 2003. 115 p.
- Pelicano ERL, Souza PA, Souza HBA, Oba A, Norkus EA, Kodawara LM, et al. Morfometria e ultra-estrutura da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes probióticos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 2003;98(547):125-134.
- Pelicano ERL, Souza PA, Souza HBA, Figueiredo DF, Boiago MM, Carvalho SR, et al. Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*. 2005;7(4):221-229.
- Ramos LSN, Lopes JB, Silva SMMS, Silva FES, Ribeiro MN. Desempenho e histomorfometria intestinal de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade recebendo melhoradores de crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2011;40(8):1738-1744.
- Rigobelo EC, Maluta RP, Ávila FA. Desempenho de frangos de corte suplementados com probiótico. *Ars Veterinaria*. 2011;27(2):111-115.
- Rocha AP, Abreu RD, Costa MCMM, Oliveira GJC, Albinati RCB, Paz AS, et al. Prebióticos, ácidos orgânicos e probióticos em rações para frangos de corte. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. 2010;11(3):793-801.
- Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Oliveira RF, Lopes DC, et al. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 3ª ed. Viçosa: UFV; 2011.
- Shareef AM, Al-Dabbagh ASA. Effect of probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*) on performance of broiler chicks. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*. 2009;23(Supplement I):23-29.
- Silva MA, Pessotti BMS, Zanini SF, Colnago GL, Nunes LC, Rodrigues MRA, et al. Óleo essencial de aroeira-vermelha como aditivo na ração de frangos de corte. *Ciência Rural*. 2011;41(4):676-681.
- Silva ROP, Lopes AF, Faria RMD. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. *Revista Médica de Minas Gerais*. 2008;18(2):116-122.
- Souza LFA, Araújo DN, Astolphi JLL, Dias LBM, Ambiel AC, Santos LS, et al. Probiótico e antibiótico como promotores de crescimento para frangos de corte. *Colloquium Agrariae*. 2010;6(2):33-39.
- 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*. 2004;33(6):537-549.
- Williams RB, Marshall RN, La Ragione RM, Catchpole J. A new method for the experimental production of necrotic enteritis and its use for studies on the relationships between necrotic enteritis, coccidiosis and anticoccidial vaccination of chickens. *Parasitology Research*. 2003;90(1):19-26.
- Yegani M, Korver DR. Factors affecting intestinal health in poultry. *Poultry Science*. 2008;87(10):2052-2063.

Recebido em: 09/03/2016  
Received in: 03/09/2016

Aprovado em: 16/09/2016  
Approved in: 09/16/2016