

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**CONTROLE DE *Salmonella* Typhimurium EM FRANGOS DE  
CORTE UTILIZANDO LACTULOSE**

Eliete Silva e Souza  
Orientadora: Maria Auxiliadora Andrade

GOIÂNIA  
2008



**Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TE-DE) na Biblioteca Digital da UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás-UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico:  Dissertação  Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor: **Eliete Silva e Souza** CPF: E-mail: **elietessouza@yahoo.com.br**

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?  Sim  Não

Vínculo Empregatício do autor: Agência de fomento:

País: UF: CNPJ: Sigla:

Título: **Controle de Salmonella Typhimurium em frangos de corte utilizando lactulose** Palavras-chave: **ave, desempenho, morfometria, prebiótico, salmoneloses**

Título em outra língua: **Control of Salmonella Typhimurium in broiler using lactulose**

Palavras-chave em outra língua:

Área de concentração: **Sanidade Animal** Data de defesa: (dd/mm/aaaa) **(25/07/2008)**

Programa de Pós-Graduação: **Ciência Animal**

Orientador(a): **Maria Auxiliadora Andrade** CPF: E-mail: **maa@vet.ufg.br**

Co-orientador(1): **José Henrique Stringhini** CPF: E-mail: **henrique@vet.ufg.br**

Co-orientador(2): **Marcos Barcellos Café** CPF: E-mail: **mcafe@vet.ufg.br**

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?  total  parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

] Capítulos. Especifique:

] Outras restrições:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiania 17 de dezembro de 2008

  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

ELIETE SILVA E SOUZA

**CONTROLE DE *Salmonella* Typhimurium EM FRANGOS DE  
CORTE UTILIZANDO LACTULOSE**

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre  
em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Goiás.

**Área de Concentração:**  
Sanidade Animal

**Linha de Pesquisa:**  
Etiologia, epidemiologia e controle das doenças infecciosas e parasitárias dos  
animais

**Orientadora:**  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Auxiliadora Andrade – UFG

**Comitê de Orientação:**  
Prof. Dr. José Henrique Stringhini – UFG  
Prof. Dr. Marcos Barcellos Café - UFG

GOIÂNIA  
2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(GPT/BC/UFG)

**Souza, Eliete Silva e.**  
**S729c**      **Controle de *Salmonella* Typhimurium em frangos de corte utilizando lactose [manuscrito] / Eliete Silva e Souza. – 2008.**  
                 xi, 75 f. : il. ; figs., tabs.

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade.**

**Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,  
Escola de Veterinária, 2008.**

Bibliografia.

**Inclui lista de figuras e tabelas.**

1. Salmonelose em animais 2. *Salmonella* Typhimurium  
3. Frango – Contaminação bacteriana I. Andrade, Maria Auxiliadora. II. Universidade Federal de Goiás, **Escola de Veterinária.**

III. Título.

CDU: 636.52/.58:616-022

ELIETE SILVA E SOUZA

Dissertação defendida e aprovada em 25/07/2008, pela  
Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dra. Maria Auxiliadora Andrade  
(Orientador (a))



Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles – UNESP/Araçatuba – SP



Profa. Dra. Cintia Silva Minalta e Rezende – CPA/EV/UFG

*Dedico*

*“Ao meu Deus, que me capacitou em todos os momentos e  
aos meus pais que sempre me incentivaram  
e me ensinaram a acreditar que temos  
que sonhar sempre”.*

*“As sociedades precisam tanto da ciência como da religião.*

*Elas não são incompatíveis, mas complementares.*

*Precisamos da ciência para explicar o mundo e usar  
esse conhecimento para melhorar as condições humanas.*

*Mas a ciência deve permanecer em silêncio*

*nos assuntos espirituais.”*

(Francis Collins)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus, meu criador, meu Salvador, companheiro imutável de todas as horas. Ele sempre se fez presente, nunca me desamparou; mesmo quando houve complicações, Ele me iluminou quando houve tristezas, Ele me concedeu alegrias; quando me senti sozinha, Ele foi meu companheiro; quando eu disse que não iria conseguir, Ele segurou a minha mão e me fez mais forte me tornando vencedora.

Agradeço aos meus pais, Aldeci Timóteo e Purcina Paula, que sempre me apoiaram em todos os momentos, me incentivando a crescer sempre, a valorizar a vida, o amor ao próximo, o aprendizado e o trabalho, para que eu possa me tornar uma pessoa melhor a cada dia. Os dias longes de vocês com certeza não foram fáceis, mas com certeza eu aprendi muito durante todo este tempo. Obrigada, por poder sempre contar com vocês e me sentir tão amada e privilegiada de fazer parte desta família!

Agradeço ao Uiltom, a Jussara e a Júlia, pois durante este mestrado, foram minha família, me concedendo mais que uma casa, um lar, onde senti todo carinho e proteção, foram mais que irmão e cunhada, foram meus pais, amigos, companheiros, sempre terei vocês como pessoas mais que especiais em minha vida e saibam que terei eterna gratidão!

Agradeço ao Márcio, Valéria e Diógenes, que mesmo que, distantes algumas vezes, eu amo muito vocês e tenho orgulho que façam parte da minha família!

Agradeço ao Robson, pois durante todo este tempo, foi amigo, companheiro, me emprestou seus ombros para me acolher, para me ouvir chorar, foi aquele que escutou minhas reclamações, minhas dúvidas mais profundas, mas sempre paciente e conselheiro. Obrigada pelas horas de alegria, paciência, amor e carinho concedidos!

Agradeço a grande amiga Tatiane Martins, pois acompanhou minha vida durante todo este período. Sempre brincava que era a irmã que não tive e saiba que sempre te considerarei assim, pois foi muito bom conviver todo este tempo juntas,

aprendi muito, cresci muito com você. Obrigada pelas horas de descontração, convivência e amizade!

Tenho que agradecer a uma pessoa mais que especial em minha vida, minha querida orientadora, Maria Auxiliadora Andrade, pois para mim é um exemplo a ser seguido como mulher, pessoa, profissional. Obrigada, por ter sido, mais que orientadora, foi minha segunda mãe (assim a considero), foi paciente nas minhas teimosias, conselheira nas minhas dúvidas, em nenhum momento deixou a desejar, sempre com muito que fazer, mas sempre parava tudo para me ouvir, me ajudar. Saiba que eu tenho orgulho de você ser minha orientadora, minha grande amiga, te amo querida professora, você é o meu espelho, quero ser igual a você!

Agradeço aos professores da avicultura, José Henrique Stringhini, Marcos Barcellos Café e Nadja Susana Mogyca Leandro, pois como co-orientadores e amigos, sempre me ajudaram, tornando possível para que este trabalho fosse desenvolvido. Saibam que a cada momento aprendo mais com vocês e é um grande prazer conviver lado a lado com pessoas tão especiais e sei que têm muito ainda a me ensinar!

Agradeço também, aos professores, Regiane Nascimento Gagno Porto, Valéria de Sá Jayme, Francisco Dias de Carvalho, Guido Fontgallad Coelho Linhares, Jurij Sobestiansky e Aires Manoel de Souza. Obrigada pelas horas de convivência e alegrias concedidas!

Agradeço a todos os alunos da graduação e da pós-graduação, que não mediram esforços para me ajudar, vocês são todos meus grandes amigos: Juliana, Januária, Ana Caroline, Hérika, Paulo Ricardo, Anderson, Gracinda, Maria Luiza, Pedro, Iberê, Carlos Eduardo, André, Plínio, Ítalo, Lia, Filipe, Dunya, Alberto, Natali, Ivonete, Hillari. E aos amigos que têm me apoiado plenamente, Fabiana Dias, Fábio Henrique, Chirley, Erika, Edmêe, Adriana Rocha, Fabiana Mendes, Roberto Filho e Leandro Chaves. Obrigada pelo incentivo e grande amizade, pois tenho sempre aprendido muito com vocês!

Agradeço aos tios (principalmente, Raquel e Anésio) e primos, que contribuíram para meu aprimoramento e crescimento, e também aos funcionários e técnicos: Dorinha, Tânia, João, Elenilson, Lourdes, seu Enedino, seu Antônio, seu Germano.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro concedido, pois sem ele não seria possível desenvolver este trabalho e a empresa Super Frango pelo apoio concedido!

Muito obrigada a todos vocês, por fazerem parte do meu mundo, da minha vida, saiba que cada um esteve no lugar certo, no momento certo, e saibam que todos vocês são muito, mais muito especiais, amo todos vocês!

Muito obrigada!

**SUMÁRIO**

Página

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	1
REFERÊNCIAS .....	5
CAPÍTULO 2 – INFLUÊNCIA DA LACTULOSE NO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E NA TAXA DE REISOLAMENTO FECAL EM FRANGOS DE CORTE EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS COM <i>Salmonella</i> Typhimurium	7
RESUMO.....	7
ABSTRACT .....	8
1 - INTRODUÇÃO .....	9
2 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	12
2.1 - Local.....	12
2.2 - Delineamento Experimental .....	12
2.3 - Preparação do inóculo .....	13
2.4 - Programa alimentar.....	14
2.5 - Cálculo da dose de lactulose- pré-experimento .....	15
2.6 - Variáveis estudadas .....	15
2.7 - Desempenho.....	15
2.8 - Pesquisa de <i>Salmonella</i> Typhimurium .....	16
2.9 - Análises estatísticas.....	17
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	18
4 - CONCLUSÕES .....	25
5 - REFERÊNCIAS.....	26
CAPÍTULO 3- AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA LACTULOSE NA SAÚDE INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS COM <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	29
1 - INTRODUÇÃO .....	31
2 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	33
2.1 - Local .....	33
2.2 - Manejo Experimental .....	33
2.3 - Preparação do inóculo.....	34
2.4 - Cálculo da dose de lactulose - pré-experimento.....	34
2.5 - Programa alimentar .....	35

2.6 - Variáveis estudadas .....	35
2.7 - Avaliação de pH.....	35
2.8 - Quantificação e identificação de <i>Salmonella</i> .....	36
2.9 - Quantificação e identificação de <i>Escherichia coli</i> .....	37
2.10 - Análises estatísticas .....	37
3 - RESULTADOS .....	38
4 - DISCUSSÃO .....	42
5 - CONCLUSÕES .....	46
6 - REFERÊNCIAS.....	47
CAPÍTULO 4- AVALIAÇÃO do efeito sistêmico da lactulose em aves inoculadas experimentalmente com <i>Salmonella Typhimurium</i> .....	51
1 - INTRODUÇÃO .....	53
2 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	55
2.1 - Local .....	55
2.2 - Manejo Experimental .....	55
2.3 - Preparação do inóculo.....	56
2.4 - Cálculo da dose de lactulose- pré-experimento.....	57
2.5 - Programa alimentar .....	57
2.6 - Recuperação de <i>Salmonella Typhimurium</i> .....	57
2.7 - Exames biométricos do fígado .....	58
2.8 - Bioquímica sérica .....	59
2.9 - Análises estatísticas .....	59
3 - RESULTADOS e discussão .....	60
4 - CONCLUSÕES .....	70
5 - REFERÊNCIAS.....	71
CAPÍTULO 5- CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	74

## RESUMO

O presente trabalho foi conduzido no Núcleo Experimental de Doenças de Aves e Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás para avaliar os efeitos da lactulose na *Salmonella* Typhimurium em frangos de corte. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, avaliando substância aplicada (lactulose) e desafio bacteriano. Foram utilizados 630 pintos de linhagem comercial, os quais foram distribuídos em seis tratamentos, com sete repetições e 15 aves por unidade experimental. O desafio microbiano foi fornecido às aves no primeiro dia de vida contendo  $5,0 \times 10^2$  UFC /0,5mL de *Salmonella* Typhimurium. E lactulose na dose de 0,023 mL/g de peso vivo até 14 dias de idade. Os pesos das aves e ração consumida foram considerados semanalmente para cálculo do desempenho. Nos dias sete, 14, 21 e 28, uma ave por parcela foi necropsiada, sendo coletado o fígado para análises biométricas e histopatológicas. Os conteúdos dos inglúvios e dos cecos foram submetidos à enumeração de *Salmonella* e *Escherichia coli* e às análises bacterianas, assim como o baço, o fígado e o coração foram examinados bacteriologicamente. Também foi aferido o pH do inglúvio, intestino delgado e ceco e coletado sangue para avaliação das enzimas hepáticas. Os dados quantitativos de desempenho, biometria do fígado, pH, contagem de bactérias e enzimas hepáticas foram analisados aplicando ANOVA e Tukey (5%), e os dados resultantes das análises de excreção fecal da *Salmonella* foram analisados utilizando o teste não paramétrico qui-quadrado. Observou-se maior ganho de peso e menor conversão alimentar ( $P < 0,05$ ) nos grupos que receberam a lactulose com ou sem *S. Typhimurium* até 21 dias de vida e que houve redução da excreção fecal de *S. Typhimurium* aos 10 dias de idade, para as aves que receberam a lactulose ( $P < 0,05$ ) desde o primeiro dia de vida. Constatou-se também, que a lactulose determinou redução nos valores ( $P < 0,05$ ) de pH nos órgãos do sistema digestivo aos sete dias de vida e que a lactulose reduziu ( $P < 0,05$ ) as UFC de *E. coli* no inglúvio aos 21 e 28 dias de vida e de *S. Typhimurium* nos tratamentos em que se administrou a lactulose antes do patógeno e nas idades avaliadas. A lactulose impediu infecção no período inicial de vida das aves, mostrando melhor efeito, quando administrada 48 horas antes da inoculação do patógeno. Constatou-se, ainda, que houve aumento do peso relativo do fígado pela *S. Typhimurium* em todas as idades estudadas e que a lactulose causou discretas alterações hepáticas; e constatou-se também, que a *S. Typhimurium* não determinou sinais clínicos severos, nem mortalidade e que seu índice de recuperação diminuiu com a idade. Pode-se concluir que a lactulose propiciou maior ganho de peso nas aves até uma semana após seu fornecimento; assim como, foi hábil em diminuir a excreção fecal de *S. Typhimurium*. Conclui-se também, que a lactulose alterou os valores de pH, com exceção do pH cecal e reduziu a colonização de *S. Typhimurium* no ceco e o número das UFCs de *E. coli* no inglúvio. Conclui-se ainda, que a lactulose foi capaz de impedir a infecção sistêmica enquanto estava sendo fornecida, tendo mostrado melhor efeito preventivo; e ainda, determinou alterações hepáticas discretas, semelhantes a um processo congestivo.

Palavras-chave: ave, desempenho, morfometria, prebiótico, salmoneloses

## **CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS**

O Brasil está entre os maiores produtores e exportadores de carne de frango do mundo, o que tem ocasionado avanços na economia, inclusive com a geração de empregos. A boa qualidade dos produtos, o esforço do setor para ampliar os mercados consumidores, a disponibilidade da produção de grãos, além do aumento a cada ano da produção brasileira, têm demonstrado que o País possui um potencial crescente para a produção de carne de frango (SCHORR, 2002; ABEF, 2008).

A segurança e o controle de qualidade dos alimentos estão alicerçados nas exigências do mercado internacional e nos sistemas de gestão da qualidade da cadeia avícola, que apontam para cuidados com matérias-primas, produtos e subprodutos (SILVA, 2006).

A qualidade sanitária do frango é fator relevante para saúde pública. A veiculação de doenças entre animais e homens é tema atual e de preocupação global do ponto de vista técnico-científico e comercial. Enquadra-se neste contexto, todo um complexo agroindustrial de criação de aves e de comercialização nacional e internacional de carnes (REZENDE, 2006).

As salmoneloses estão entre os problemas de maior prevalência na avicultura industrial, por isto necessita de um rigoroso programa de prevenção e controle que deve contemplar medidas e evitar sua transmissão vertical e horizontal (TESSARI et al., 2003), devido aos múltiplos parâmetros epidemiológicos envolvidos.

As salmonelas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo o trato intestinal dos animais, o principal reservatório natural. As aves são consideradas o reservatório mais importante entre os animais (DOYLE & CLIVER, 1990).

O controle da infecção por *Salmonella* sp. em uma granja avícola é muito difícil e apresenta resultados imprecisos, ocorrendo disseminação entre as aves, via vertical e horizontal e para o meio ambiente. O rendimento do plantel e a qualidade do produto final podem ser comprometidos; portanto, medidas gerais de controle devem ser realizadas tanto em lotes de reprodutoras, como em lotes comerciais e em ambientes de criação (WRAY & DAVIES, 2000).

O desenvolvimento de pesquisas, no Estado de Goiás, em frangos de corte, comprovou positividade para *Salmonella* sp. em 77,78% dos lotes estudados (ROCHA, 2001). Este autor analisou 1206 amostras, as quais foram categorizadas em pintos de um dia, forros de caixas de transporte de pintos, frangos, suabes de arrasto da cama de aviários e rações finais, verificando uma frequência de positividade em 3,03%, 11,11%, 0,69%, 4,17% e 8,89%, respectivamente. REZENDE (2002), avaliando doze lotes de frangos em três abatedouros, identificou que 75% desses foram positivos para *Salmonella* sp., sendo identificados seis sorovares, sendo *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium os de maior frequência, com 67,66% e 11,76% de isolamento, respectivamente.

A partir do ano de 2003, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento passou a realizar um monitoramento contínuo do nível de contaminação por *Salmonella* em abatedouros de aves. A implementação deste programa, nos estabelecimentos sob inspeção federal, se deu em razão das exigências em relação à segurança alimentar, aliada à necessidade de que o sistema de inspeção seja realizado com base nos princípios de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e na Análise de Riscos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). A construção deste sistema poderá também, ajudar no rastreamento de surtos epidemiológicos causados por *Salmonella* e na construção de um sistema de informações para avaliação da contaminação dos produtos (BRASIL, 2003).

Para sustentar o desenvolvimento de toda a cadeia avícola, muitas pesquisas nas áreas de melhoramento genético, nutrição, sanidade e manejo têm sido realizadas. Com esse desenvolvimento, iniciou-se o uso em larga escala de antibióticos como promotores de crescimento na produção de frangos de corte, melhorando o desempenho animal e diminuindo a mortalidade causada por infecções clínicas e subclínicas (FUKAYAMA et al., 2005).

Após anos de uso de antibióticos, como promotores de crescimento na alimentação de aves, alguns questionamentos foram levantados. Entre eles, se esses produtos continham os mesmos princípios ativos de antibióticos utilizados na terapêutica humana ou se apresentavam moléculas cuja estrutura induzia resistência cruzada a antibióticos administrados em humanos. Resíduos desses antibióticos poderiam permanecer na carne e, assim, serem transmitidos ao

consumidor final, propiciando o aparecimento de resistência de bactérias intestinais aos promotores de crescimento (FUKAYAMA et al., 2005).

O uso de antibióticos e quimioterápicos na produção animal, em doses subterapêuticas, tem tido o objetivo de controlar microrganismos entéricos, entre estes as salmonelas. Porém, de acordo com McMULLIN (2004), o uso de antibióticos pode acarretar problemas potenciais à saúde do homem, como toxicidade, alergia e desenvolvimento de resistência da bactéria, trazendo preocupações relacionadas à saúde pública.

Em janeiro de 2006, o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento na alimentação de animais foi banido pela União Européia. A proibição da utilização destas substâncias em rações de criação de aves impede a importação para os países afins. Acrescenta-se ainda, o fator de que este bloco comercial é formador de opinião, influenciando importantes importadores como os blocos asiáticos e o Oriente Médio.

Considerando estas questões sanitárias e comerciais, os pesquisadores e as empresas têm buscado estratégias para reduzir ou mesmo, para substituir o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento. A utilização de ingredientes alimentares não digeríveis que beneficiam a saúde do hospedeiro, cuja ação proporcione melhor desempenho das aves, é na atualidade um desafio, principalmente para a eliminação ou controle das salmonelas.

Recentemente compostos vêm sendo utilizados como alternativa aos promotores de crescimento, com o objetivo de manter o equilíbrio benéfico da microbiota intestinal, especialmente em animais jovens ou em iminente condição de estresse. Entre esses compostos situa-se a descoberta, na década de 50, de que o leite humano possui substâncias que atuam como inibidores de adesão de bactérias patogênicas na superfície epitelial, posteriormente identificada como lactulose, e potencializam o crescimento das populações de bifidobactérias e lactobacillus (NICOLI & VIEIRA, 2000).

De acordo com HOLZ & MIDDLETON (2005), após ser ingerida, a lactulose chega ao cólon praticamente sem sofrer digestão ou absorção tanto no estômago, como no intestino delgado. No cólon, serve como substrato para bifidobactérias, lactobacilos e algumas outras bactérias benéficas, cujos metabólitos são pequenos grupos de ácidos graxos, como ácido acético,

propiónico e butírico. Partes destes ácidos graxos são extensivamente metabolizados nos hepatócitos e aquelas que não sofreram o metabolismo nos hepatócitos, são transportadas pela circulação aos vários tecidos, onde se submetem a um metabolismo adicional.

Diante do exposto, procurou-se estudar no presente trabalho, a lactulose, produto com ação prebiótica, com o objetivo de analisar seu efeito, como possível substituto a antibióticos e quimioterápicos promotores de crescimento, sem determinar comprometimento da saúde intestinal.

## REFERÊNCIAS

1. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGOS (ABEF). 2007. Disponível em: [www.abef.com.br](http://www.abef.com.br), acesso em: 11 de abril de 2008.
2. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 70**. Programa de Redução de Patógenos (PRP), v. 1, Brasília, 2003, 168 p.
3. DOYLE, M. P., CLIVER, D. O. *Salmonella*. In: D. O. CLIVER, ed., **Foodborne Diseases**. London: Academic Press, 1990, p. 185-204.
4. FUKAYAMA, E. H.; BERTECHINI, A. G.; GERALDO, A.; KANJI KATO, R. SOLIS MURGAS, L. D. Extrato de Orégano como Aditivo em Rações para Frangos de Corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2316-2326, 2005.
5. HOLZ, P. H.; MIDDLETON, D. R. Prospective Study. **Medical Surgery**, v. 15, n. 1, p. 4-6, 2005.
6. McMULLIN, P. Produção avícola sem antibióticos: riscos potenciais de contaminação cruzada e de detecção de resíduos. In: CONFERÊNCIA APINCO 2004 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. 2004. **Anais...**, v. 2. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p. 211-216, 2004.
7. NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q. Probióticos, prebióticos e simbióticos. Moduladores do ecossistema digestivo. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 28, n. 63, p.34-38, 2000.
8. REZENDE, C. S. M. **Ácidos orgânicos em rações experimentalmente contaminadas com *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium**. Goiânia, 2006. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Sanidade Animal). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. 94 p.
9. REZENDE, C. S. M. **Ocorrência de *Salmonella* em lotes de frangos de corte de agroindústrias goianas: identificação bacteriológica e perfil de sensibilidade a antimicrobianos**. Goiânia, 2002, 73 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Sanidade Animal). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.
10. ROCHA, P. T. **Ocorrência de *Salmonella* spp. Em granjas de integrações de frangos de corte no Estado de Goiás**. Goiânia. 2001. 57f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Sanidade Animal). Escola de Veterinária. Universidade Federal de Goiás.

11. SCHORR, H. O futuro da cadeia de produção de frangos de corte (uma visão internacional). In: CONFERÊNCIA APINCO 2002 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2002, Campinas, **Anais...** Campinas: FACTA, p.19-30, 2002.
12. SILVA, P. L. Segurança alimentar e legislação na produção. In: VII SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. Chapecó-SC. Embrapa Suínos e Aves, p. 34-40, 2006.
13. TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO A. G. M.; ZANATTA, G. F.; KANASHIRO, A. M. Incidência de *Salmonella* sp. em pintos de corte recém-nascidos. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 3, p. 279-281, 2003.
14. WRAY, C.; DAVIES, R. H. Control ambient de *Salmonella*. **Avicultura Professional**, v. 18, p. 18-21, 2000.

## CAPÍTULO 2 – INFLUÊNCIA DA LACTULOSE NO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E NA TAXA DE REISOLAMENTO FECAL EM FRANGOS DE CORTE EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS COM *Salmonella* Typhimurium

**RESUMO:** Infecções por *Salmonella* constituem um desafio para a avicultura, e produtos alternativos capazes de controlá-la, sem causar prejuízos aos parâmetros de desempenho têm sido recomendados. Por isso, o presente trabalho foi desenvolvido para avaliar a influência da lactulose nas variáveis de desempenho, bem como sua possível habilidade de impedir a colonização da *Salmonella* Typhimurium experimentalmente inoculada, via oral, na dose de  $5,0 \times 10^2$  UFC /0,5mL, em frangos de corte. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, onde se utilizaram 630 pintos, machos, os quais foram distribuídos em seis tratamentos, com sete repetições e 15 aves por unidade experimental. O tratamento 1 (ttm 1) constituiu o grupo controle (grupo placebo); o ttm 2 recebeu somente a lactulose (inoculadas somente com a lactulose-L); o ttm 3 recebeu somente a *S. Typhimurium* (grupo controle positivo-ST); no ttm 4 o grupo recebeu a lactulose e a *S. Typhimurium* no 1º dia de vida [L(1º)+ST(1º)], o no ttm 5 as aves receberam a lactulose 48h antes da *S. Typhimurium* e no ttm 6 a *S. Typhimurium* 48h antes da lactulose [ST(1º)+L(48h)]. Aos dias sete, 14, 21 e 28, as aves foram submetidas às variáveis de desempenho e análises bacteriológicas dos suabes cloacais aos dias 10, 24 e 35 de idade. Os dados quantitativos de desempenho foram analisados aplicando ANOVA e Tukey (5%), e os dados resultantes das análises de excreção fecal da *Salmonella* foram analisados utilizando o teste não paramétrico qui-quadrado. Observou-se maior ganho de peso e menor conversão alimentar ( $P < 0,05$ ) nos grupos que receberam a lactulose com ou sem *S. Typhimurium* até 21 dias de vida. Observou-se, também, redução da excreção fecal de *S. Typhimurium* para as aves que receberam a lactulose ( $P < 0,05$ ) desde o primeiro dia de vida e, também naquelas que receberam a lactulose 48 horas antes de serem inoculadas diretamente no inglúvio com *S. Typhimurium*. Pode se concluir que a lactulose propiciou maior ganho de peso nas aves até uma semana após seu fornecimento; e ainda diminuiu a excreção fecal de *Salmonella* Typhimurium.

Palavras-chave: excretas, ganho de peso, prebióticos, salmoneloses.

**INFLUENCE OF LACTULOSE IN PERFORMANCE AND FECAL  
REISOLATION IN BROILERS EXPERIMENTALLY INOCULATED WITH  
*Salmonella* Typhimurium**

**ABSTRACT:** *Salmonella* infections are diseases of major impact on poultry, and alternative products can be recommended to control it, without causing damage to the parameters of performance. Hence, this experiment was designed to assess the influence of lactulose in performance and its ability to prevent the possible colonization of *Salmonella* Typhimurium in broilers orally inoculated with  $5.0 \times 10^2$  CFU / mL 0.5. Birds were allotted in a completely randomized design, with 630 day-old male chicks distributed in six treatments, with seven replications and 15 birds per experimental unit. Treatment (ttm) 1 did not receive microbial inoculum or lactulose (placebo group), ttm2 received only lactulose (control group of lactulose-L), ttm 3 received only *S. Typhimurium* (ST-positive control group), ttm 4 received lactulose and *S. Typhimurium* in the first day of life (L (1) + ST (1)), ttm 5 received lactulose 48 hours before the *S. Typhimurium* (L (1) + ST (48h)) and ttm 6 received the *S. Typhimurium* 48h before lactulose (ST (1) + L (48h)). At seven, 14, 21 and 28 days of age, performance was evaluated and bacteriological analyses of the cloacal swabs were done on 10, 24 and 35 days of age. Performance data were analyzed with ANOVA and Tukey test (5%) and fecal excretion data were performed by non-parametric test of chi-square. A greater weight gain and lower feed conversion ( $P < 0.05$ ) were observed in groups that received lactulose with or without *S. Typhimurium* up to 21 days of life. No reduction on fecal excretion of *S. Typhimurium* at 10 days old was verified for birds that received lactulose ( $P < 0.05$ ) from the first day of life, and also those who have received lactulose 48 hours before being inoculated directly into the crop with *S. Typhimurium*. Lactulose increased performance in birds until one week after inoculation, and still reduced fecal excretion of *Salmonella* Typhimurium.

Keywords: excreta, prebiotic, salmonellosis, weight gain.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é, na atualidade, o segundo maior produtor mundial de *commodities* avícolas e também o primeiro exportador de carne de frango. Dentre as muitas ações adotadas para manter-se nesse patamar de grande exportador, o Brasil tem buscado se adaptar às exigências internacionais, atendendo às legislações vigentes sobre restrição do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento na alimentação dos animais.

A proibição da utilização destas substâncias, pela União Européia, desde janeiro de 2006, pode acarretar prejuízos, restringindo o comércio de produtos originados de animais criados com rações contendo antimicrobianos.

Por outro lado, os antimicrobianos têm sido utilizados como promotores de crescimento na produção de frangos de corte, sustentando a cadeia avícola, melhorando o desempenho animal e diminuindo a mortalidade causada por infecções clínicas (FUKAYAMA et al., 2005). Portanto, os antibióticos utilizados como promotores de crescimento, em doses subterapêuticas, têm controlado microrganismos entéricos, entre estes, as salmonelas aviárias.

Estudos realizados indicam que a simples retirada dos antibióticos promotores de crescimento da dieta de frangos de corte, leva a uma diminuição média no desempenho das aves de 3% a 7%, além do impacto negativo sobre a saúde animal e aumento da mortalidade. Desse modo, há necessidade de se introduzir estratégias novas, a fim de contornar tais efeitos. Uma abordagem nutricional amplamente utilizada é o uso de novos aditivos alimentares que são eficazes na melhoria do desempenho das aves, hipoteticamente através de modulação da microflora no trato intestinal (LANGHOUT, 2005).

Os microrganismos entéricos que compõem a microbiota intestinal normal, também denominada útil, auxiliam na digestão e absorção de nutrientes, produzem vitaminas que são utilizadas pelo hospedeiro e diminuem, por exclusão competitiva, a proliferação de agentes patogênicos (ROY & GIBSON, 1999). RICHTER (1992) relatou que, além desta microbiota ter a capacidade de impedir a fixação de microrganismos patogênicos na parede intestinal, ocupando os sítios de ligação que normalmente seriam utilizados por eles, e ainda podem produzir substâncias antibacterianas.

A microbiota nociva pode causar inflamações na mucosa intestinal, gerar metabólitos tóxicos e propiciar o aparecimento de enfermidades clínicas ou subclínicas e provavelmente afetar os parâmetros de desempenho, além do risco potencial de contaminação alimentar, se o agente for zoonótico.

Neste contexto, podem se situar as salmoneloses aviárias que segundo SESTI (2001) se tornaram prioridade nos últimos anos, como uma das doenças de maior risco para a indústria avícola nacional. Alguns sorovares, como *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, usualmente encontrados no trato gastrointestinal, especialmente das aves, são considerados de relevância em saúde pública, por provocarem doenças gastrointestinais em humanos.

BARROW (1993) destacou que as salmoneloses são doenças de difícil controle, pela complexidade da sua epidemiologia, que envolve grande número de reservatórios, que eliminam o patógeno pelas excreções fecais e promovem a contaminação do ambiente.

A fim de controlar e eliminar os microrganismos nocivos, produtos alternativos e substitutivos ao uso de antibióticos estão sendo estudados. A lactulose pode ser um desses produtos. De acordo com HOLZ & MIDDLETON (2005), após ser ingerida, a lactulose chega ao cólon praticamente sem sofrer digestão ou absorção, tanto no estômago como no intestino delgado. No cólon pode ser fermentada por bifidobactérias, lactobacillus e algumas outras bactérias benéficas, cujos metabólitos são ácidos graxos que induzem aos efeitos benéficos sistêmicos ou no lúmen intestinal.

A lactulose, provavelmente estimula o crescimento e a atividade de bactérias benéficas do trato gastrointestinal, que atuam positivamente no sistema imune e promovem melhorias no ambiente e no epitélio intestinal, resultando em compostos que refletem de forma desejável no desempenho animal (SILVA & NÖRNBERG, 2003).

Na literatura consultada, poucos trabalhos foram encontrados sobre a utilização da lactulose em animais domésticos. KAMPHERS et al., (2003) demonstraram o efeito laxativo e a capacidade de eliminação da bactéria em suínos e estes resultados foram semelhantes à indicação farmacológica do produto para humanos.

BOUVÉE-OUDENHOVEN et al. (1997, 2003) demonstraram o efeito deste dissacarídeo contra salmoneloses em camundongos, que foram oralmente infectados com *Salmonella* e medicados com diferentes níveis de lactulose pura ou em combinação com frutooligosacarídeos ou fosfato de cálcio. Segundo esses autores, apesar de serem observadas similaridades no trato alimentar de diferentes espécies animais, existem importantes diferenças ao nível intestinal, como capacidade digestiva ou reações sobre a substância ingerida. Percebeu-se então, a necessidade de estudos experimentais nas espécies alvo, especialmente em frangos de corte.

Tendo em vista, a exigência de mercado consumidor e com o intuito de que esta substância seja recomendada como aditivo na alimentação animal, foi desenvolvido o presente estudo para avaliar a influência da lactulose nas variáveis de desempenho, bem como sua possível habilidade de impedir a colonização da *S. Typhimurium* experimentalmente inoculada via ingluvío.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Local

O experimento foi realizado no Núcleo Experimental de Doenças de Aves e no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária (EV) da Universidade Federal de Goiás (UFG) durante os meses de janeiro e fevereiro de 2008.

### Delineamento Experimental

Os pintos da linhagem Cobb, machos, de um dia de idade, foram divididos em seis tratamentos, com sete repetições cada, alojados em grupos de 15 aves por unidade experimental, em um total de 42 unidades experimentais.

As aves foram pesadas, identificadas e distribuídas em seis tratamentos de 105 pintos cada, conforme o delineamento abaixo:

TRATAMENTO 1: constituiu o grupo controle que não recebeu o inóculo microbiano nem a lactulose (Placebo).

TRATAMENTO 2: constituiu o grupo de aves inoculadas diretamente no inglúvio no primeiro dia de vida, com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente  $5,0 \times 10^2$  UFC/0,5 mL de *Salmonella* Typhimurium (controle positivo- ST).

TRATAMENTO 3: constituiu o grupo que recebeu água adicionada com lactulose, na dosagem estabelecida no pré-experimento, na dose de 0,023 mL/g de peso vivo, do primeiro aos 14 dias de vida de alojamento (controle da Lactulose).

TRATAMENTO 4: constituiu o grupo de aves inoculadas diretamente no inglúvio no primeiro dia de vida, com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente  $5,0 \times 10^2$  UFC/0,5 mL de *Salmonella* Typhimurium e 48 horas depois, a lactulose foi fornecida na água de bebida até 14 dias de vida da ave, na mesma quantidade do controle [(ST(1<sup>0</sup>) +L(48h)].

TRATAMENTO 5: constituiu o grupo de aves que recebeu a água com lactulose desde o primeiro dia de vida na mesma dose do controle, e com 48 horas foram inoculadas diretamente no inglúvio com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente  $5,0 \times 10^2$  UFC/0,5 mL de *Salmonella* Typhimurium [(L(1<sup>0</sup>) +ST(48h)].

TRATAMENTO 6: constituiu o grupo de aves que recebeu diretamente no inglúvio, 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente  $5,0 \times 10^2$  UFC/0,5 mL de *Salmonella* Typhimurium e a água com lactulose, em dose de 0,023 mL/g de peso vivo do primeiro até aos 14 dias [(ST(1<sup>0</sup>) +L(1<sup>0</sup>)].

As aves desafiadas e não desafiadas foram alojadas separadamente, mantendo-se a mesma ambiência, em baterias com cinco andares de aço galvanizado, equipadas com comedouros e bebedouros tipos lineares e bandejas para retirada de excretas. As baterias foram aquecidas com uma lâmpada incandescente de 60 W por andar até os 21 dias de idade.

### **Preparação do inóculo**

O inóculo, na concentração de  $5,0 \times 10^2$  UFC/0,5 mL, foi preparado com *Salmonella* Typhimurium isolada de amostras oriundas de frangos de corte cedida por REZENDE (2002).

Para obtenção do inóculo, a cepa foi repicada em ágar verde brilhante e incubada a 37° C, por 18-20h. Em seguida, as células foram suspensas em solução salina tamponada a 0,85%, mantidas a 4° C e concentração de  $5,0 \times 10^2$  UFC/mL ajustada com auxílio da escala de Mac Farland (FERNÁNDEZ et al., 2001). A concentração foi confirmada pelo plaqueamento das diluições decimais seriadas em ágar verde brilhante, com posterior incubação a 37° C e quantificação das UFC de *Salmonella*.

## Programa alimentar

A dieta fornecida aos animais, farelada à base de milho moído e farelo de soja, foi formulada de acordo com a composição dos alimentos e exigências nutricionais preconizadas por ROSTAGNO (2000) e não continham nenhum produto químico, ou seja, anticoccidianos e antibióticos promotores de crescimento. As aves de todos os tratamentos receberam a mesma dieta, fornecida “*ad libitum*”, durante todo o período experimental de criação das aves.

TABELA 1 – Composição percentual da ração fornecida aos pintos de corte durante todo o período experimental (1-28 dias de idade)

<b>Ingredientes %</b>	<b>Pré-inicial (1-7 dias)</b>	<b>Inicial (8-14 dias)</b>	<b>Crescimento (15-28 dias)</b>
Milho	59,04	61,42	64,86
Farelo de Soja (45%)	35,97	33,74	29,55
Fosfato bicálcico	1,91	1,80	2,12
Óleo vegetal	0,88	1,26	1,63
Calcário	0,86	0,80	0,79
Sal	0,45	0,42	0,41
DL-metionina 99	0,40	0,23	0,25
L-lisina HCl	0,36	0,20	0,24
*Vitini-Ave	0,10	0,10	0,10
<b>Total</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>
<b>Nutrientes</b>	<b>Atendimento</b>		
Proteína bruta (%)	22,04	20,96	19,41
Energia metabolizável (kcal/kg)	2,95	3,00	3,10
Cálcio (%)	0,93	0,88	0,82
Fósforo Disponível (%)	0,47	0,44	0,41
Sódio (%)	0,22	0,21	0,20
Lisina (%)	1,33	1,14	1,08
Metionina + cistina (%)	0,95	0,81	0,78
Metionina (%)	0,66	0,52	0,51

\*Suplemento vitamínico-mineral para aves – Vitini-Ave

Níveis de garantia por quilograma do produto:

Vit. A 4.000.000 UI, Vit. D3 1.000.000 UI, Vit. E 10.000 UI, Vit. K3 1.200,0 mg, Vit. B1 800,4 mg, Vit. B2 2.400,0 mg, Vit. B6 1.600,0 mg, Vit B126.000,0 mcg, Ac. Nicotínico 16.000,0 mg, Ac. Pantotênico 6.000,0 mg, Biotina 40,0 mg, Ac. Fólico 400,0 mg, Ferro 2.000,0 mg, Cobre 4.000,0 mg, Zinco 20.000,0 mg, Manganês 32.000,0 mg, Selênio 120,0 mg, Iodo 400,0 g, Cobalto 400,0 g, Violeta Genciana 8,0 g, Antioxidante 12,0 g, Veículo q. s. p. 1.000,0 g.

## **Cálculo da dose de lactulose- pré-experimento**

Foi realizado um pré-experimento, com 30 pintos de corte até 10 dias de vida, onde foram administradas doses diárias crescentes de lactulose, na água de bebida até observar o aparecimento de fezes amolecidas.

A dose assim definida e utilizada, foi de 0,023 mL/g de peso vivo. Calculou-se ainda a ingestão diária de água pelas aves, sendo considerado como peso diário, o estabelecido pelo o manual da linhagem.

A quantidade de lactulose foi calculada diariamente, multiplicando a dose pela quantidade de aves em cada gaiola, sendo medida com o auxílio de uma pipeta volumétrica. A lactulose foi homogeneizada com água em um balde e colocada nos bebedouros; esta prática foi repetida a cada 24 horas, desde o primeiro até os 14 dias de experimento.

## **Variáveis estudadas**

### **Desempenho**

Para análise do desempenho das aves foi observado o seguinte:

Peso Médio (PM): obtido dividindo-se o peso total das aves de cada parcela, pelo número médio de aves da parcela,  $PM=PF/NMA$ ;

Ganho de Peso (GP): calculado pela diferença entre o peso final e o peso inicial das aves somado ao peso da ave morta e dividindo pelo número médio de aves,  $GP= [(PF-PI) + \text{Peso da ave morta}]/NMA$ ;

Consumo de ração (CR): calculado pela razão entre o consumo de ração total (fornecido – sobra) e o número médio de aves;

Conversão alimentar (CA): calculada pela razão:  $CR/GP$ ;

Mortalidade: Para análise estatística o valor em percentagem de mortalidade foi transformado em Arc seno  $((\%Mort. /100)+0,05)^{0,5}$ .

As pesagens das aves, assim como das rações foram feitas semanalmente até os 28 dias de idade para cálculo de consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar. As aves mortas foram identificadas e pesadas para o ajuste do consumo de ração e conversão alimentar, bem como necropsiadas e as alterações macroscópicas identificadas.

### **Pesquisa de *Salmonella* Typhimurium**

Nos dias 10, 24 e 35 dias de vida das aves, foi coletada amostra individual de excretas, através de suabe cloacal de 50 aves por tratamento, totalizando 300 aves por idade analisada.

As amostras foram homogeneizadas e transferidas para tubos contendo caldo de enriquecimento e processadas de acordo com BRASIL (2003) e com o GEORGIA POULTRY LABORATORY (1997), com algumas modificações descritas a seguir.

Após a coleta, por meio de suabe cloacal, as amostras foram colocadas em tubos de ensaio contendo nove mL de caldo Selenito Cistina e incubadas em estufa a 37° C por 18-24h.

Após este período, com uma alça de níquel-cromo, alíquotas foram estriadas nos ágar verde brilhante e Hektoen e incubadas a 37° C por 24h. De cada um dos ágar, foram selecionadas de três a cinco colônias com características morfológicas de *Salmonella* e repicadas para ágar tríplice açúcar-ferro (ágar TSI), seguindo-se incubação a 37° C por 24h.

Os isolados do TSI que apresentaram reações características compatíveis com as do gênero *Salmonella* foram submetidas aos seguintes testes bioquímicos: produção de indol, produção de H<sub>2</sub>S, motilidade, urease, descarboxilação da lisina, vermelho de metila, utilização do malonato e citrato de Simmons. As amostras confirmadas bioquimicamente como *Salmonella* foram submetidas ao teste sorológico com soro polivalente anti "O". Aquelas confirmadas na bioquímica e na sorologia foram encaminhadas ao Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ) para tipificação sorológica.

## **Análises estatísticas**

Os dados quantitativos de desempenho foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas quando necessário pelo teste de Tukey a 5%, sendo utilizado o procedimento *general linear model* (GLM) do pacote estatístico SAS (2000).

Para análise de dados excreção de *Salmonella* Typhimurium aplicou-se o teste não paramétrico qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados, expressos pelos valores das médias dos tratamentos e análises de contrastes entre alguns destes podem ser observadas nas Tabelas 2, 3, 4 e 5.

TABELA 2 – Peso inicial (PI), peso final (PF), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar calculada (CAC) de frangos de corte recebendo lactulose (L) e/ou *Salmonella* Typhimurium (ST) no período de 1-7 dias de vida.

Tratamentos	PI	PF	GP	CR	CAC
Placebo	43,03A	182,00	139,00	151,80	1,09
Controle positivo (ST)	42,94A	180,00	137,00	149,30	1,08
Controle lactulose (L)	42,18B	177,00	134,00	150,60	1,11
ST (1ºd) e L (1ºd)	42,29B	176,00	134,00	146,90	1,09
L(1ºd) e ST (48h)	42,37B	182,00	140,00	147,80	1,05
ST (1ºd) e L (48h)	42,33B	183,00	140,00	148,80	1,05
C. V. (%)	0,4061	4,1962	5,4805	7,5124	5,1058
P	0,0010	0,4489	0,4920	0,9686	0,2675
Análise de contraste entre tratamentos					
Placebo x Cont pos (ST)	ns	ns	ns	ns	ns
Placebo x Cont lactu (L)	<0,0001	ns	ns	ns	ns
Cont pos(ST) x ST(1º)+L(1º)	<0,0001	ns	ns	ns	ns
Cont pos (ST)x L (1º)+ ST(48h)	<0,0001	ns	ns	ns	ns
Cont pos(ST) x ST (1º)+L (48h)	<0,0001	ns	ns	ns	ns
C. V. (%)	0,4061	4,1962	5,4805	7,5124	5,1058

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Como pode ser observado na Tabela 2 os pesos iniciais foram bastante homogêneos, variaram de 42,18 a 43,03 g/ave, com um baixo coeficiente de variação, embora tenha apresentado diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Essa diferença de peso encontra relevância nas afirmativas de STRINGHINI et. al. (2003) que para cada grama de peso do pinto no alojamento, obtém-se 9,4 gramas a mais de diferença no peso final dos frangos na idade de abate. Por

outro lado, a inoculação da *S. Typhimurium* e a administração da lactulose não influenciaram ( $P>0,05$ ) nas variáveis estudadas no período de um a sete dias de idade.

O peso final dos pintos, aos 14 dias de idade foi influenciado negativamente pela inoculação de *S. Typhimurium* (Tabela 3). Observou-se pior ganho de peso para as aves ( $P<0,05$ ) que foram inoculadas com o patógeno e não receberam lactulose, em relação ao ganho de peso das aves que foram inoculadas com *Salmonella* no primeiro dia de vida e receberam simultaneamente a lactulose. Verifica-se também, que o consumo de ração foi maior para este grupo, o que resultou, portanto, em uma pior conversão alimentar.

TABELA 3 – Peso final (PF), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar calculada (CAC) de frangos de corte recebendo lactulose (L) e/ou *Salmonella Typhimurium* (ST) no período de 1-14 dias de vida.

<b>Tratamentos</b>	<b>PF</b>	<b>GP</b>	<b>CR</b>	<b>CAC</b>
Placebo	441,02AB	397,98AB	284,45B	1,11B
Controle positivo (ST)	418,85B	375,90B	369,15A	1,40A
Controle lactulose (L)	456,65AB	414,47AB	293,70B	1,09B
ST (1ºd) + L (1ºd)	470,43A	428,14A	313,18B	1,09B
L(1ºd) + ST (48h)	454,68AB	412,31AB	291,82B	1,09B
ST (1ºd) + L (48h)	454,76AB	412,43AB	287,36B	1,07B
C. V. (%)	6,2382	6,8944	8,7225	6,7719
P	0,0282	0,0323	0,0001	0,0001
<b>Análise de contraste entre tratamentos</b>				
Placebo x Cont pos (ST)	ns	ns	<0,0001	<0,0001
Placebo x Cont lactu (L)	ns	ns	ns	ns
Cont pos(ST) x [ST(1º)+L(1º)]	0,0015	0,0013	0,0004	<0,0001
Cont pos (ST)x [L (1º)+ ST(48h)]	0,0221	0,0203	<0,0001	<0,0001
Cont pos(ST) x [ST (1º)+L (48h)]	0,0219	0,0199	<0,0001	<0,0001
C. V. (%)	6,2382	6,8944	8,7225	6,7719

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P<0,05$ ).

Esses dados sugerem que a lactulose, que é um dissacarídeo, propiciou maior proteção à mucosa, atuando provavelmente sobre a modulação da ecologia intestinal, estimulando o crescimento e a atividade de bactérias

benéficas do TGI, que atuaram positivamente no sistema imune e promoveram melhorias no ambiente e no epitélio intestinal. Além desses aspectos, as substâncias prebióticas, podem atuar bloqueando os sítios de aderência reduzindo a capacidade de fixação de algumas bactérias patogênicas resultando em compostos que refletiram de forma desejável no desempenho animal (SILVA & NÖRNBERG, 2003; ANDREATTI FILHO, 2008).

Aos 21 dias de idade (Tabela 4), o ganho de peso dos pintos no grupo placebo foi menor ( $P < 0,05$ ) do que os demais tratamentos. Esse resultado pode ser atribuído ao menor consumo de ração pelas aves nesse período.

TABELA 4—Peso final (PF), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar calculada (CAC) de frangos de corte recebendo lactulose (L) e/ou *Salmonella* Typhimurium (ST) no período de 1-21 dias de vida.

Tratamentos	PF	GP	CR	CAC
Placebo	732,23B	689,19B	433,56C	1,34A
Controle positivo (ST)	812,89A	769,94A	464,36BC	1,34A
Controle lactulose (L)	828,22A	786,04A	471,42ABC	1,25B
ST (1ºd) e+L (1ºd)	847,95A	805,65A	490,02AB	1,26B
L(1ºd) + ST (48h)	861,66A	819,29A	517,04A	1,25B
ST (1ºd) + L (48h)	853,87A	811,54A	494,53AB	1,22B
C. V. (%)	5,8858	6,2033	6,4886	3,6604
P	0,0001	0,0001	0,0004	<0,0001
Análise de contraste entre tratamentos				
Placebo x Cont pos (ST)	0,0036	0,0035	ns	ns
Placebo x Cont lactu (L)	0,0007	0,0006	0,0285	0,0010
Cont pos (ST) x [ST(1º)+L(1º)]	ns	ns	ns	0,0026
Cont pos (ST)x [L (1º)+ ST(48h)]	ns	ns	0,0031	0,0012
Cont pos(ST) x [ST (1º)+L (48h)]	ns	ns	ns	<0,0001
C. V. (%)	5,8858	6,2033	6,4886	3,6604

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Observa-se ainda na mesma Tabela, melhor ( $P < 0,05$ ) conversão alimentar para aqueles tratamentos que receberam lactulose. Melhor conversão alimentar também foi registrada por COLLETT (2000), ao fornecer de 0,5 a 3% de monooligossacarídeo, para de frangos de corte (1 a 10%) em comparação ao tratamento sem o monooligossacarídeo.

Verificou-se também, na Tabela 4, que os grupos que receberam a lactulose com ou sem o patógeno apresentaram maior ganho de peso. Também MACARI & MAIORKA (2000) obtiveram maior ganho de peso em frangos suplementados com 0,2% de monooligossacarídeo.

TABELA 5 – Peso final (PF), ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar calculada (CAC) de frangos de corte recebendo lactulose (L) e/ou *Salmonella* Typhimurium (ST) no período de 1-28 dias de vida.

Tratamentos	PF	GP	CR	CAC
Placebo	1.105,78	1.062,75	1.537,70	1,47AB
Controle positivo (ST)	1.115,67	1.072,72	1.689,17	1,60A
Controle lactulose (L)	1.210,68	1.168,49	1.621,92	1,42B
ST (1ºd) e L (1ºd)	1.118,91	1.076,61	1.652,92	1,54AB
L(1ºd) e ST (48h)	1.129,44	1.087,07	1.673,59	1,55AB
ST (1ºd) e L (48h)	1.162,17	1.119,83	1.681,33	1,53AB
C. V. (%)	8,6455	8,9809	6,1962	5,7477
P	0,3582	0,3653	0,0775	0,0079
Análise de contraste entre tratamentos				
Placebo x Cont pos (ST)	ns	ns	0,0085	0,0114
Placebo x Cont lactu (L)	ns	ns	ns	ns
Cont pos(ST) x [ST(1º)+L(1º)]	ns	ns	ns	ns
Cont pos (ST)x [L (1º)+ ST(48h)]	ns	ns	ns	ns
Cont pos(ST) x [ST (1º)+L (48h)]	ns	ns	ns	ns
C. V. (%)	8,6455	8,9809	6,1962	5,7477

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Como pode ser notado na Tabela 5, com 28 dias de idade, somente a conversão alimentar foi influenciada (P<0,05) pela inoculação experimental da *Salmonella* Typhimurium. Como nos períodos anteriores, verifica-se também que a lactulose influenciou positivamente a conversão alimentar e proporcionou um melhor ganho de peso das aves.

Tanto os resultados da pior conversão no grupo que foi desafiado com o patógeno desde os 14 dias de experimento, assim como da melhor conversão pela utilização da lactulose podem ser justificados pelas afirmações de SILVA & NÖNBERG (2003) e FURLAN et al.(2006). Segundo esses pesquisadores para

que as bactérias consigam colonizar o TGI e criar uma condição patológica, precisam inicialmente aderir-se superfície epitelial. Esta adesão ocorre através de glicoproteínas (lectinas ou fímbrias), que reconhecem determinados açúcares da superfície do epitélio intestinal. Portanto, se as bactérias se ligarem a um açúcar, oligossacarídeo ou dissacarídeos, e não à mucosa intestinal, irão passar com a ingesta sem causar problemas digestivos para os animais, promovendo melhoria das condições luminiais do intestino.

TABELA 6 – Frequência da excreção de *Salmonella* Typhimurium aos 10, 24 e 35 dias de idade, em pintos inoculados no inglúvio e tratados com lactulose.

Idade	10 dias	24 dias	35 dias
Tratamentos	n(%)	n(%)	n(%)
Placebo	0/50(0%)B*	0/50(0%)	0/50(0%)
Controle positivo (ST)	15/50(30%)A	4/50(8%)	0/50(0%)
Controle lactulose (L)	0/50(0%)B	0/50(0%)	0/50(0%)
ST (1ºd) e L (1ºd)	4/50(8%)B	1/50(2%)	0/50(0%)
L(1ºd) e ST (48h)	3/50(6%)B	0/50(0%)	0/50(0%)
ST (1ºd) e L (48h)	5/50(10%)B	1/50(2%)	0/50(0%)

\* Letras diferentes na mesma coluna, diferem entre si pelo teste do qui-quadrado a 0,05%.

Paralelamente ao estudo das variáveis de desempenho, fez-se suabes cloacais, como método de monitoramento da excreção de *S. Typhimurium*. Observou-se que houve diferença significativa (Tabela 6 e Gráfico 1) na frequência de eliminação do patógeno entre os tratamentos aos dez dias de idade. Os dados mostraram uma menor frequência, 3/50(6%); 4/50(8%), e 5/50(10%) de excreção de *Salmonella* para os grupos que receberam a lactulose no primeiro dia ou 48h após o alojamento, em relação ao tratamento sem lactulose e inoculado com a *Salmonella* Typhimurium de 15/50(30%).

Verificou-se que a lactulose influenciou a colonização da *S. Typhimurium*, provavelmente inibindo a aderência de *S. Typhimurium*, potencializando o crescimento de bactérias benéficas ao hospedeiro e por competição eliminou o patógeno inoculado. Esses resultados podem ser explicados pelas afirmações de SPRING et al. (2000) os quais sugeriram que os mananoligossacarídeos, podem atuar no TGI bloqueando os sítios de ligação de

bactérias patogênicas na mucosa intestinal, bem como modular a microbiota nativa.

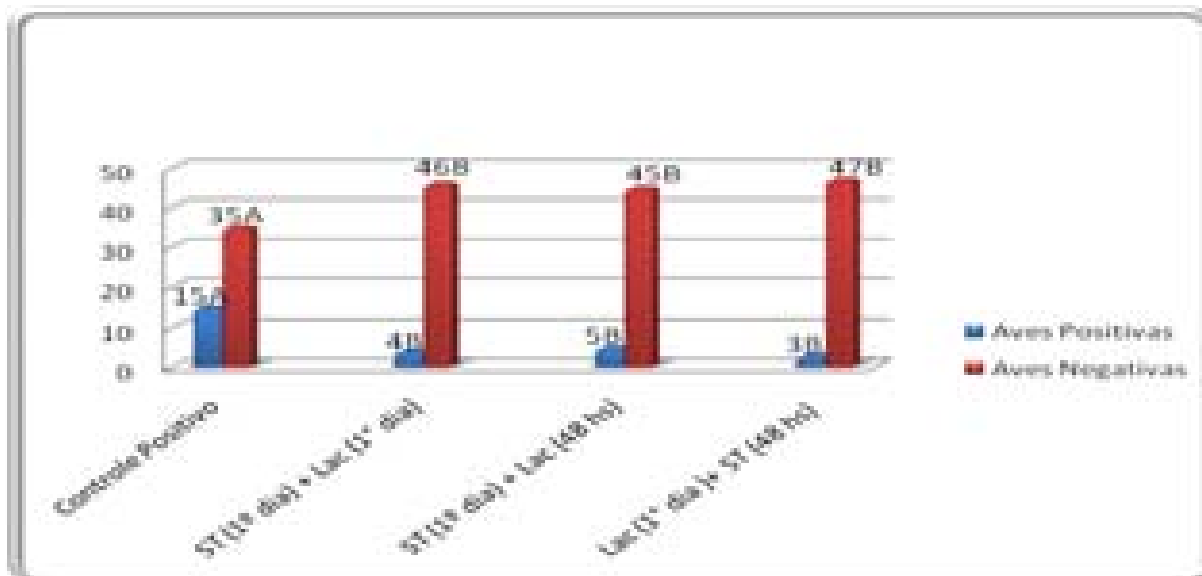


FIGURA 1 – Excreção de *Salmonella* Typhimurium aos 10 dias de idade, em pintos inoculados no Inglúvio e tratados ou não com lactulose.

Por outro lado, percebe-se uma redução natural de 35/50(70%) na infecção intestinal para o controle positivo (ST), considerando, que todas as aves do grupo se infectaram ao receber o inóculo. Isso pode estar relacionado a resistência natural que ocorre durante os cinco a dez dias de vida da ave frente à enteropatógenos. De acordo com ILONA (2008) essa idade coincide com o aumento dos linfócitos sanguíneos e o desenvolvimento do mecanismo termoregulador, ou ainda, porque segundo ANDRADE et al. (2007) este patógeno tem habilidade de ser excretado de forma intermitente e pode ser eliminado em pequenas quantidades pelas fezes, o que pode dificultar sua detecção pela análise realizada.

Já aos 24 dias de idade (Tabela 6), não se verificou diferença significativa entre resultados obtidos dos diferentes tratamentos. *Salmonella* foi eliminada quase totalmente do organismo da ave, embora tenha sido detectada em 4/50(8%) das amostras analisadas no controle positivo. Essa frequência, 4/50(8%), provavelmente afetou a saúde intestinal da ave (conversão alimentar ( $P < 0,05$ ) aos 28 dias de experimento). Além disso, essas aves constituem

portadores inaparentes de importância epidemiológica. As bactérias são eliminadas nas fezes e podem contaminar outras aves, o ambiente, assim como o solo. De acordo com RODRIGUES (2005) elas podem permanecer viáveis no material fecal por longo período, particularmente em fezes secas, podendo resistir por mais de 28 meses nas fezes de aves. Além disso, pode ocorrer a contaminação cruzada no ambiente criatório e disseminação durante as operações de abate.

Já aos 35 dias de idade (Tabela 6), não se detectou presença de *Salmonella* em nenhum dos grupos estudados, conferindo com os resultados encontrados por CHAVES (2007), quando afirmou que *Salmonella*, independente do tratamento efetuado, tende a ser eliminada do organismo da ave com o avançar da idade. Esse avançar da idade possibilita o estabelecimento da microbiota intestinal, o desenvolvimento e maturidade do sistema imunológico da ave, o que pode propiciar a eliminação ou impedir a instalação de microrganismos maléficos do organismo (BARROW 1991; CORRIER et al. 1991; GORHAM et al. 1991).

A utilização da lactulose via água de bebida às aves, proporcionou uma melhoria no desempenho zootécnico e menor eliminação da *S. Typhimurium* via excretas, o que sugere redução de contaminação no ambiente criatório e disseminação e ainda, contaminação cruzada durante as operações de abate, propiciando assim uma melhor qualidade da carcaça do frango no abatedouro e conseqüentemente, um produto de qualidade na mesa do consumidor.

## CONCLUSÕES

A lactulose propiciou maior ganho de peso nas aves, enquanto estava sendo fornecida, tendo seu efeito prolongado até uma semana após sua retirada; também diminuiu a excreção fecal de *Salmonella* Typhimurium em todas as idades estudadas.

## REFERÊNCIAS

1. ANDRADE, M. A.; MESQUITA, A. J.; STRINGHINI, J. H.; CHAVES, L. S.; MATTOS, M. S.; MORAES, D. M. C. Excreção fecal de *S. Enteritidis* em duas linhagens de frangos de corte. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 4, p. 757-765, 2007.
2. ANDREATTI FILHO, R. L. Alimentos funcionais na Produção Avícola. **Saúde Aviária e Doenças**. Ed. ROCA, São Paulo, Brasil, p. 41-52, 2008.
3. BARROW, P. A. Experimental infection of chickens with *Salmonella* Enteritidis. **Avian Pathology**, v. 20, p. 145-153, 1991.
4. BARROW, P. A. *Salmonella* control – past, present and future. **Avian Pathology**, v.22, n.3, p 651-69, 1993.
5. BOUVEE-LOUDENHOVEN, I. M. J.; BRUGGENCATE, S.J.M.; LETTINK-WISSINK, M. L. G.; MEER, R. V. Dietary fructo-oligosaccharides and lactulose inhibit intestinal colonization but stimulate translocation of salmonella in rats. **BMJ Publishing Group LTD & British Society of Gastroenterology**, v. 52, p.1572-1578, 2003.
6. BOUVEE-LOUDENHOVEN, I. M. J.; MEER, V. D. Protective effects of dietary lactulose and calcium phosphate against *Salmonella* infection. **Scandinavian Journal of Gastroenterology Supplement**, v. 222, p. 112-114, 1997.
7. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 70**. Programa de Redução de Patógenos (PRP), v. 1, Brasília, 2003, 168 p.
8. CHAVES, L. S. **Frangos de corte de crescimento lento e rápido, oriundos de ovos inoculados com probiótico, submetidos a desafio com *Salmonella* Enteritidis e jejum após a eclosão**. Goiânia, 2007, 52 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Produção Animal). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.
9. COLLETT, S. Nutrição, imunidade e produtividade. In: Ronda Latino Americana. O Futuro da Alimentação. **Palestras...** Brasil: Alltech, p. 20-30, 2000.
10. CORRIER, D. E.; HARGIS, B.; HINTON, A. Jr.; LINDSEY, D.; CALDWELL, D.; MANNIG, J.; DELOACH, J. Effect of anaerobic cecal microflora and dietary lactose on colonization resistance of layer chickens to invasive *Salmonella* Enteritidis. **Avian Diseases**, v. 35, p. 357-343, 1991.

11. FERNÁNDEZ, A.; LARA, C.; LOSTE, A.; CALVO, S.; MARCA, M.C. Control of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 experimental infection by fosfomycin in newly hatched chicks. **Comparative Immunology, Microbiology & Infections Disease**, v. 24, p. 207-216, 2001.
12. FUKAYAMA, E. H.; BERTECHINI, A. G.; GERALDO, A.; KANJI KATO, R. SOLIS MURGAS, L. D. Extrato de Orégano como Aditivo em Rações para Frangos de Corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2316-2326, 2005.
13. FURLAN, R. L., MACARI, M., LUQUETTI, C., Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão. **Simpósio Técnico de incubação, matrizes de corte e nutrição**. Exclusão competitiva. 5 Balneário de Camboriú, SC, p. 6-28, 2006.
14. GEORGIA POULTRY LABORATORY. **Monitoring and detection of Salmonella in poultry and poultry environments**. Oakwood: Georgia Poultry Laboratory, 1997. 293p. [Workshop]
15. GORHAM, S.L.; KADAVIL, K.; VAUGAHAN, E.; LAMBERT, H.; PERT, B.; ABEL, J. Gross and microscopic lesions in young chickens experimentally with *Salmonella* Enteritidis. **Avian Diseases**, v.38, p.816-821, 1991.
16. HOLZ, P. H.; MIDDLETON, D. R. Prospective Study. **Medical Surgery**, v. 15, n. 1, p. 4-6, 2005.
17. ILONA, disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/html/...> (ILONA).pdf+Ilona+monografia&hl=ptBR&ct=clnk&cd=1, acessado em: 10 de junho de 2008.
18. KAMPHERS, J.; TABELING, R.; STUKE, O. Possible interesting dietetic effects of lactulose as a feed additive in pig feed. **Dtsch Tierarztl Wochenschr**, v. 110, n. 9, p. 365-368, 2003.
19. LANGHOUT, P. Alternativas ao uso de quimioterápicos na dieta de aves: A visão da indústria e recentes avanços. In: Conferência APINCO 2005 de Ciência e Tecnologias Avícolas, 2005, Santos, 2005. **Anais...**, Santos: FACTA. 2005. 21 p.
20. MACARI, M.; MAIORKA, A. Função gastrointestinal e seu impacto no rendimento avícola. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, Campinas, 2000. **Anais...** Campinas: FACTA, p.161-174, 2001.
21. REZENDE, C. S. M. **Ocorrência de Salmonella em lotes de frangos de corte de agroindústrias goianas**: identificação bacteriológica e perfil de sensibilidade a antimicrobianos. Goiânia, 2002, 73 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Sanidade Animal). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.

22. RICHTER, K. P. Moléstias do intestino grosso. In: ETTINGER, S. J. (ed.), **Tratado de medicina interna veterinária: moléstias do cão e do gato**. São Paulo: Manole, p.1462-1486, 1992.
23. RODRIGUES, D. P. Ecologia e prevalência de *Salmonella* spp. em aves e materiais avícolas. Campinas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005, Santos, 2005. **Anais...** Santos, v. 2, p. 223-228, 2005.
24. ROSTAGNO, H. S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**; composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa: UFV, Departamento de Zootecnia, 2000, 221p.
25. ROY, M.; GIBSON, G.R. **Probiotics and prebiotics microbial in menu**. Online. Disponível em: <http://www.babelfish.altavista.com/cgi-bm>. Acesso em 19 de maio de 2007.
26. SAS Institute. SAS (Statistical Analysis System). **User's Guide: Statistics**. Cary, NC: SAS Institute INC; 2000.
27. SESTI, L. A. C. Filosofias e conceitos de biosseguridade e doenças com potencial de risco para avicultura brasileira. IN: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, Campinas, p. 47-91, 2001.
28. SILVA, L. P.; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 5, p. 983-990, 2003.
29. SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, K. A.; NEOMAN, K. E. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of Salmonella-challenged broiler chicks. **Poultry Science**, London, v. 79, n. 2, p. 205-211, 2000.
30. STRINGHINI, J. H.; RESENDE, A.; CAFÉ, M. B.; LEANDRO, N. S. M.; ANDRADE, M. A. Efeito do peso inicial dos pintos e do período de dieta pré-inicial sobre o desempenho de frango de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 2, 2003, 8 p.

### **CAPÍTULO 3- AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA LACTULOSE NA SAÚDE INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS COM *Salmonella Typhimurium***

**RESUMO:** A utilização de produtos alternativos para substituir o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e que beneficiam a saúde do hospedeiro e controlam os enteropatógenos é um dos grandes desafios da indústria avícola. Assim, o presente trabalho foi desenvolvido para avaliar os efeitos da lactulose no lúmen intestinal pela aferição do pH de conteúdos do trato gastrointestinal, bem como sobre a redução de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli*. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, onde se utilizaram 630 pintos, machos, os quais foram distribuídos em seis tratamentos, com sete repetições e 15 aves por unidade experimental. O tratamento 1 (ttm 1) não recebeu o inóculo microbiano nem lactulose (grupo Placebo), ttm 2 recebeu somente a lactulose (grupo controle da lactulose-L), ttm 3 recebeu somente a *S. Typhimurium* (grupo controle positivo-ST), ttm 4 recebeu a lactulose e a *S. Typhimurium* no 1º dia de vida [L(1º)+ST(1º)], ttm 5 recebeu a lactulose 48h antes da *S. Typhimurium* [L(1º)+ST(48h)] e o ttm 6 recebeu a *S. Typhimurium* 48h antes da lactulose [ST(1º)+L(48h)]. Aos dias sete, 14, 21 e 28 uma ave por parcela foi sacrificada e os conteúdos do ingluvío e do ceco foram coletados para enumeração de *S. Typhimurium* e *E. coli*. Paralelamente, foi realizada também a aferição do pH do ingluvío, intestino delgado e ceco aos dias sete, 14, 21 e 28 dias do período experimental, das mesmas aves. Os conteúdos dos inglúvios e dos cecos foram submetidos à contagem de *Salmonella* e *Escherichia coli* e às análises bacterianas. O baço, o fígado e o coração foram coletados e submetidos a exames bacteriológicos. Também foi aferido o pH do ingluvío, intestino delgado e ceco e coletado sangue para avaliação das enzimas hepáticas. Os dados quantitativos de pH dos diferentes segmentos do trato gastrointestinal, assim como de enumeração de bactérias foram analisados aplicando ANOVA e Tukey (5%). Constatou-se que a lactulose determinou redução nos valores ( $P<0,05$ ) de pH nos órgãos do sistema digestivo aos sete dias de vida. Essa redução se manteve até 28 dias somente para o ingluvío e intestino delgado, enquanto que o pH cecal nos períodos de 21 e 28 dias, não apresentou diferença entre os demais tratamentos ( $P>0,05$ ). Constatou-se também, que a lactulose reduziu ( $P<0,05$ ) as UFC de *E. coli* no ingluvío aos 21 e 28 dias de vida e de *S. Typhimurium* nos tratamentos em que se administrou a lactulose antes do patógeno e nas idades avaliadas. Pode-se concluir que a lactulose alterou os valores de pH, com exceção do pH cecal e reduziu a colonização de *S. Typhimurium* no ceco e o número das UFCs de *E. coli* no ingluvío.

Palavras-chave: enumeração, *Escherichia coli*, pH, UFC.

**EVALUATION OF THE EFFECTS OF INTESTINAL LACTULOSE HEALTH OF  
BROILERS FOR CUTTING INOCULADOS EXPERIMENTALLY WITH  
*Salmonella* Typhimurium**

**ABSTRACT:** The use of alternatives to replace the use of antimicrobial additives as growth promoters which bring benefits host health and control the enteropathogens is a great challenge for the poultry industry. Thus, this study was conducted to assess the effects of lactulose in the intestinal lumen by measuring the pH content of the gastrointestinal tract, and on reducing the amount of colony forming units (CFU) of *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium. Birds were allotted in a completely randomized design, with 630 day-old male chicks distributed in six treatments, with seven replications and 15 birds per experimental unit. Treatment (ttm) 1 did not receive microbial inoculum or lactulose (placebo group), ttm2 received only lactulose (control group of lactulose-L), ttm 3 received only *S. Typhimurium* (ST-positive control group), ttm 4 received lactulose and *S. Typhimurium* in the first day of life (L (1) + ST (1)), ttm 5 received lactulose 48 hours before the *S. Typhimurium* (L (1) + ST (48h)) and ttm 6 received the *S. Typhimurium* 48h before lactulose (ST (1) + L (48h)). At seven, 14, 21 and 28 days of age one bird per plot was sacrificed and cecum and crop contents were collected for counting of *S. Typhimurium* and *E. coli*. In parallel, it was also measured pH of crop, small intestine and cecum at seven, 14, 21 and 28 days of age for the same birds. Crop and ceca content was submitted to *Salmonella* and *Escherichia coli* countings and bacterial analysis. pH of crop, small intestine and ceca was determined and blood was collected for liver enzyme evaluation. Values of pH for different segments of gastrointestinal tract and bacterial countings were analyzed with ANOVA and Tukey test (5%). Lactulose reduced pH value ( $P < 0.05$ ) of pH digestive organs at seven days of life which remained until 28 days only for crop and small intestine, whereas the cecal pH at 21 and 28 days, did not differ between the other treatments ( $P > 0.05$ ). It was also discovered that lactulose reduced ( $P < 0.05$ ) the CFU of *E. coli* at the crop at 21 and 28 days of age and *S. Typhimurium* for birds that lactulose was administered before the pathogen inoculation. Lactulose changed pH, except cecal pH and reduced the colonization of *S. Typhimurium* in the cecum and the number of UFCs of *E. coli* in the crop.

Keywords: enumeration, *Escherichia coli*, pH, UFC.

## INTRODUÇÃO

A avicultura destaca-se entre as atividades do setor agropecuário mundial, com índices de produção em constante crescimento. O aumento na produção de carne de frangos foi consequência de avanços em genética, nutrição, sanidade e manejo, que elevaram os níveis de produtividade e desempenho (RIBEIRO, 2008).

Considerando que o Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de frango do mundo, e que tem ocorrido na Região Centro-Oeste a implantação de novas empresas nas últimas décadas, a necessidade de pesquisas na área de sanidade avícola também foi incrementada. A produção em grande escala de frango, para ofertar alimentos, tem potenciais fatores de risco de introduzir patógenos, como a *Salmonella*, na cadeia alimentar do homem. Essa bactéria tem sido apontada como o agente de enteroinfecções em surtos ou casos esporádicos de toxinfecção alimentar, além de estar associada a perdas econômicas na criação avícola.

O gênero *Salmonella* é constituído por 2.523 sorovares (POPOFF et al., 2003) amplamente distribuídos na natureza, e que podem infectar além das aves, o homem, insetos, peixes, répteis e mamíferos em geral, causando a enfermidade denominada salmonelose. Pode causar infecção clínica ou subclínica em aves e homens, sendo que as aves podem permanecer como reservatório e fonte de infecção para humanos. É um microrganismo de fácil adaptação no ambiente, tornando-se muito difícil a sua erradicação dos ambientes criatórios (BACK et al., 2006).

O controle da salmonela é um dos grandes desafios da indústria avícola mundial nos últimos anos, pois sua infecção pode ocasionar restrições ao comércio dos seus produtos, pelas implicações em saúde pública, e grandes prejuízos financeiros devido à alta mortalidade, ao alto custo com medicação, a queda na produção de ovos, a baixa qualidade dos pintos e ao custo elevado das medidas de erradicação e controle (HAFEZ, 2005).

Os antimicrobianos têm sido utilizados como promotores de crescimento na produção de frangos de corte, sustentando a cadeia avícola, melhorando o desempenho animal e diminuindo a mortalidade causada por

infecções clínicas (FUKAYAMA et al., 2005). Portanto, os antibióticos utilizados como promotores de crescimento, em doses subterapêuticas, têm controlado microrganismos entéricos, entre estes as salmoneloses aviárias.

Mas, os consumidores têm buscado por produtos avícolas produzidos sem antibióticos promotores de crescimento, levando os produtores e profissionais a se adaptarem às novas exigências e a procurarem alternativas viáveis e sustentáveis economicamente para substituir estes antibióticos. Isto tem resultado na necessidade de se estudar produtos alternativos ao uso de antimicrobianos, como os probióticos, os ácidos orgânicos, os prebióticos, os simbióticos, as enzimas, os extratos de ervas e os óleos vegetais para reduzir o crescimento de bactérias indesejáveis, tais como *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. (HOFACRE et al., 1998).

Os prebióticos compreendem ingredientes nutricionais não digeríveis que atuam como inibidores de adesão de bactérias patogênicas na superfície epitelial e que potencializam o crescimento das populações de bifidobactérias e lactobacillus. Esses produtos afetam benéficamente o hospedeiro ativando o metabolismo de uma ou mais bactérias benéficas e induzindo a efeitos desejáveis sistêmicos ou na luz intestinal (ANDREATTI FILHO, 2008; GUIMARAES & GUEDES, 2007).

Diante disso, o presente trabalho foi desenvolvido para investigar os efeitos da lactulose, na saúde intestinal pela aferição do pH do ingluvío, intestino delgado e ceco, bem como sobre o número de unidades formadoras de colônias (UFCs) de *S. Typhimurium* e *E. coli* no ingluvío e ceco de frangos de corte inoculados experimentalmente com *S. Typhimurium*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Local

O experimento foi realizado no Núcleo Experimental de Doenças de Aves e no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária (EV) da Universidade Federal de Goiás (UFG) durante os meses de janeiro e fevereiro de 2008.

### Manejo Experimental

Os pintos da linhagem Cobb, machos, de um dia de idade, foram divididos em seis tratamentos, com sete repetições cada, alojados em grupos de 15 aves por unidade experimental, em um total de 42 unidades experimentais.

As aves foram pesadas, identificadas e distribuídas em seis tratamentos de 105 pintos cada, conforme o delineamento abaixo:

TRATAMENTO 1: constituiu o grupo controle que não recebeu o inóculo microbiano nem a lactulose (placebo).

TRATAMENTO 2: constituiu o grupo de aves inoculadas diretamente no Inglúvio no primeiro dia de vida, com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente  $5,0 \times 10^2$  UFC/0,5 mL de *Salmonella* Typhimurium (controle positivo- ST).

TRATAMENTO 3: constituiu o grupo que recebeu água adicionada com lactulose, na dosagem estabelecida em um pré-experimento, a dosagem utilizada foi de 0,023 mL/g de peso vivo, do primeiro aos 14 dias de vida de alojamento (controle da Lactulose-L)

TRATAMENTO 4: constituiu o grupo de aves inoculadas diretamente no Inglúvio no primeiro dia de vida, com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente  $5,0 \times 10^2$  UFC/0,5 mL de *Salmonella* Typhimurium e 48 horas depois, a lactulose foi fornecida na água de bebida até 14 dias de vida da ave, na mesma quantidade do controle [ST(1<sup>0</sup>) +L(48h)].

TRATAMENTO 5: constituiu o grupo de aves que recebeu a água com lactulose desde o primeiro dia de vida na mesma dose do controle, e com 48

horas foram inoculadas diretamente no inglúvio com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente  $5,0 \times 10^2$  UFC/0,5 mL de *Salmonella* Typhimurium [L(1<sup>0</sup>) +ST(48h)].

TRATAMENTO 6: constituiu o grupo de aves que recebeu diretamente no inglúvio 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente  $5,0 \times 10^2$  UFC/0,5 mL de *Salmonella* Typhimurium e a água com lactulose, a dose de lactulose utilizada foi de 0,023 mL/g de peso vivo, do primeiro até aos 14 dias [ST(1<sup>0</sup>) +L(1<sup>0</sup>)].

As aves desafiadas e não desafiadas foram alojadas separadamente, mantendo-se a mesma ambiência, em baterias com cinco andares de aço galvanizado, equipadas com comedouros e bebedouros tipos lineares e bandejas para retirada de excretas. As baterias foram aquecidas com uma lâmpada incandescente de 60W por andar até os 21 dias de idade.

### **Preparação do inóculo**

O inóculo foi preparado com *Salmonella* Typhimurium isolada de amostras oriundas de frangos de corte cedida por REZENDE (2002). A concentração do inóculo foi de  $5,0 \times 10^2$  UFC/0,5 mL, conforme REZENDE (2002).

Para obtenção do inóculo a cepa foi repicada em ágar verde brilhante e incubada a 37° C, por 18-20h. Em seguida, as células foram suspensas em solução salina tamponada a 0,85%, mantidas a 4° C e concentração de  $5,0 \times 10^2$  UFC/mL ajustada com auxílio da escala de Mac Farland (FERNÁNDEZ et al., 2001). A concentração foi confirmada pelo plaqueamento das diluições decimais seriadas em ágar verde brilhante, com posterior incubação a 37° C e quantificação das UFC de *Salmonella*.

### **Cálculo da dose de lactulose - pré-experimento**

Foi realizado um pré-experimento, com 30 pintos de corte até 10 dias de vida, onde foram administradas doses diárias crescentes de lactulose, na água

de bebida, até obter uma dose que determinasse eliminação de fezes amolecidas.

A dose assim definida e utilizada, foi de 0,023 mL/g de peso vivo. Calculou-se ainda, a ingestão diária de água pelas aves, sendo considerado o peso diário, o estabelecido pelo o manual da linhagem.

A quantidade de lactulose era calculada diariamente, multiplicando a dose pela quantidade de aves em cada gaiola, sendo medida com o auxílio de uma pipeta volumétrica. A lactulose era homogeneizada com água em um balde e colocada nos bebedouros, esta prática foi repetida a cada 24 horas, desde o primeiro, até os 14 dias de experimento.

### **Programa alimentar**

A dieta fornecida aos animais, farelada à base de milho moído e farelo de soja, foi formulada de acordo com a composição dos alimentos e exigências nutricionais preconizadas por ROSTAGNO (2000) e não continham nenhum produto químico, ou seja, anticoccidianos e antibióticos promotores de crescimento. As aves de todos os tratamentos receberam a mesma dieta, fornecida “*ad libitum*”, durante todo o período experimental de criação das aves.

### **Variáveis estudadas**

Nos dias sete, 14, 21 e 28, as aves foram submetidas a um jejum alimentar de duas a três horas antes do início do sacrifício, e uma ave por parcela foi necropsiada e as amostras foram coletadas para avaliação do pH. Das mesmas parcelas aos 14, 21 e 28 dias coletaram-se amostras para quantificar o número de UFCs de *E. coli* e *S. Typhimurium*.

### **Avaliação de pH**

Aos sete, 14, 21 e 28 dias o conteúdo do ingluvío, intestino delgado e do ceco foram colocados em frascos contendo 15mL de água destilada, sendo

homogeneizados e os valores de pH destas porções foram mensurados em pHmetro digital segundo a metodologia empregada por SILVA et al. (2000).

### **Quantificação e identificação de *Salmonella***

A quantificação da *Salmonella* foi realizada de acordo com a técnica de BRASIL (2003) com modificações. Suabes de inglúvio foram coletados e colocados em tubos de ensaio contendo 5,0 mL de caldo selenito-cistina (CS) constituindo a diluição  $10^0$ . Em seguida, do mesmo animal, 0,5 g do conteúdo do ceco foi pesado e colocado em 4,5 mL de CS, constituindo a diluição  $10^{-1}$ . Diluições decimais seriadas sucessivas foram realizadas até  $10^{-6}$ , utilizando solução salina esterilizada peptonada a 0,1%. Realizaram-se plaqueamentos, em duplicata, de 0,1 mL de diferentes diluições em ágar Xylose-Lysine-Tergitol 4 (XLT4), ágar verde brilhante e ágar Hektoen os quais foram incubados a 37°C por 24h. A leitura foi realizada selecionando-se e contando as unidades formadoras de colônias com características morfológicas de *Salmonella*.

Os tubos inoculados contendo CS também foram incubados a 37°C por 24 h e, caso não apresentassem crescimento sugestivo de *Salmonella* nos meios de XLT4 e Hektoen, alíquotas do CS eram transferidas para os meios seletivos, incubados a 37° C por 24 h e registrados com crescimento  $<10^0$  para o inglúvio e  $<10^1$  para ceco. De três a cinco unidades formadoras de colônias por placas, foram transferidas para tubos contendo tríplex açúcar ferro (TSI), os quais foram incubados a 37°C por 24 horas.

Tubos de TSI com crescimento sugestivo de *Salmonella* foram submetidos ao teste da urease, produção do indol, vermelho metila, motilidade, teste do malonato e lisina descarboxilase. Aqueles que apresentaram reações bioquímicas compatíveis com *Salmonella* foram submetidos ao teste sorológico com soro polivalente anti-O de *Salmonella*. Amostras positivas à sorologia foram remetidas à Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ) para confirmação do sorovar isolado.

### **Quantificação e identificação de *Escherichia coli***

Suabes de ingluvío foram coletados e colocados em tubos de ensaio contendo 5,0 mL de solução salina tamponada a 0,1%, constituindo a diluição  $10^0$ . Em seguida, do mesmo animal para a contagem desta bactéria foram pesados 0,5 gramas do conteúdo cecal de cada parcela, e então transferidos para tubo de ensaio contendo 4,5 mL de solução salina tamponada a 0,1%. A partir dessas diluições foram feitas diluições decimais seriadas sucessivas até a  $10^{-6}$ , utilizando solução salina esterilizada peptonada a 0,1%. Das diluições  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ , foi transferido 0,1 mL de cada diluição para placas de Petri contendo ágar eosina azul de metileno (EMB), fazendo-se o plaqueamento em superfície e as placas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 24 h.

A leitura foi realizada selecionando-se e contando as unidades formadoras de colônias com características morfológicas de *E. coli*. A partir do crescimento de colônias típicas e atípicas, segundo BRASIL (2003), de três a cinco colônias foram transferidas para tubos contendo tríplice açúcar ferro (TSI), os quais foram incubados a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas. Isolados do TSI foram confirmados para presença de *E. coli* pela bioquímica através da produção de indol e vermelho de metila, motilidade, produção de  $\text{H}_2\text{S}$ , urease e reação no citrato de Simmons.

Tubos de TSI com crescimento sugestivo de *E. coli* foram submetidos ao teste da urease, produção do indol, vermelho metila, citrato de Simmons, motilidade e teste do malonato para confirmação da bactéria.

### **Análises estatísticas**

Os dados quantitativos de pH intestinal, bem como as médias da enumeração das UFCs de *S. Typhimurium*, *E. coli* foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%, sendo utilizado o procedimento *general linear model* (GLM) do pacote estatístico do SAS (2000).

## RESULTADOS

Verifica-se na Tabela 1 o pH do inglúvio e ceco com sete, 14, 21 e 28 dias de vida. Analisando os dados dispostos na referida Tabela, observa-se diferença ( $P < 0,05$ ) entre valores de pH dos tratamentos nos segmentos estudados, inglúvio e ceco, aos sete de vida. Verifica-se, ainda um menor valor para o pH das aves pertencentes ao grupo que recebeu a lactulose.

Os resultados das análises de pH aos 14 dias, mostram pronunciada redução, nos valores de pH do inglúvio, das aves que foram inoculadas com *S. Typhimurium* e a lactulose no primeiro dia de vida, em relação ao placebo. Já os valores do pH do ceco no mesmo período não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos.

TABELA 1- Resultados das aferições de pH do inglúvio e ceco de frango de corte recebendo lactulose e/ou *Salmonella Typhimurium* aos 14, 21 e 28 dias de vida.

Inglúvio				
Tratamento	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
Placebo	6,64A	6,66A	7,10A	6,65A
Controle positivo (ST)	5,27BC	6,25AB	6,06B	4,83B
Controle lactulose (L)	4,82C	6,34AB	6,44AB	6,61A
[ST (1ºd) e L (1ºd)]	6,44AB	5,58B	5,59BC	5,17B
[L (1ºd) e ST (48h)]	5,34BC	5,61AB	4,35D	5,50AB
ST (1ºd) e L (48h)	5,63ABC	6,15AB	4,93DC	5,08B
C. V. (%)	13,1253	11,01	10,0323	13,90
P	0,0003	0,0308	0,0001	0,0001
Ceco				
Tratamento	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
Placebo	7,20A	6,92	6,52	6,83AB
Controle positivo (ST)	6,58AB	6,71	6,69	6,46B
Controle lactulose (L)	5,97B	6,68	6,68	6,95A
ST (1ºd) e L (1ºd)	6,45AB	6,56	6,94	6,69AB
L (1ºd) e ST (48h)	6,63AB	6,75	6,77	6,64AB
ST (1ºd) e L (48h)	5,85B	6,84	6,87	6,58AB
C. V. (%)	10,4811	7,30	5,4022	4,49
P	0,0085	0,8175	0,3589	0,0571

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Seguindo a tendência do que ocorreu aos 14 dias, aos 21 dias observa-se um maior valor para o pH do ingúvio para aves pertencentes ao grupo que recebeu nenhum tipo de tratamento. Porém, as aves que receberam a lactulose 48 horas antes de serem desafiadas com *S. Typhimurium* apresentaram uma redução do pH do ingúvio. Por outro lado, o pH cecal, nesse período, não mostrou diferença ( $P>0,05$ ) entre os diferentes tratamentos.

A análise dos dados obtidos com 28 dias de idade (Tabela 1) mostra que aves que compuseram os tratamentos placebo e controle da lactulose, obtiveram um maior valor de pH para o ingúvio e um menor valor para aves que foram inoculadas com *S. Typhimurium* independente do momento de inoculação.

Por outro lado, nota-se que nas amostras do ceco, o grupo controle da lactulose apresentou maior valor de pH e foi semelhante ao grupo do placebo. Verifica-se ainda que o pH do ceco do controle positivo apresentou menor pH e foi semelhante ao grupo placebo.

Os valores médios de contagem UFCs, expressos em log, de *E. coli* no ingúvio e ceco estão anotados na Tabela 2. Os resultados da contagem aos 14, 21 e 28 dias de idade de conteúdo do ingúvio foram semelhantes, onde se observou maior valor ( $P<0,05$ ) para UFC/ mL de conteúdo do ingúvio do grupo placebo, porém esses valores não foram diferentes do controle positivo.

Observou-se ainda, que menores valores no ingúvio foram encontrados nos grupos que receberam somente a lactulose e naqueles inoculados experimentalmente com *S. Typhimurium* e tratados com lactulose aos 14 dias do experimento. Por outro lado, uma reduzida contagem ou mesmo ausência de *E. coli* foi verificada no grupo controle da lactulose no ingúvio. Para a contagem de *E. coli* no ceco não foi observada diferença ( $P>0,05$ ) entre os diversos grupos estudados durante todos os períodos analisados.

TABELA 2-Valores médios da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) expressa em log, de *Escherichia coli* no ingluvío e no ceco de frangos de corte recebendo lactulose (L) e/ou *S. Typhimurium* (ST) aos 14, 21 e 28 dias de idade.

Tratamentos	Inglúvio		
	14 dias	21 dias	28 dias
Placebo	4,4339A	4,4174A	3,3046A
Controle positivo (ST)	2,9014AB	3,3365AB	2,9252AB
Controle lactulose (L)	0,8385BC	-	1,4196B
ST (1ºd) e L (1ºd)	1,2204BC	3,0743AB	2,5955AB
L (1ºd) e ST (48h)	0,2857C	2,8410AB	1,6407AB
ST (1ºd) e L (48h)	-	2,1012AB	2,0548AB
P	<0,0001	0,0925	0,0302
Tratamentos	Ceco		
	14 dias	21 dias	28 dias
Placebo	4,5649	5,8227	5,7165
Controle positivo (ST)	5,3945	5,9419	6,1251
Controle lactulose (L)	6,4755	5,9269	6,0090
ST (1ºd) e L (1ºd)	6,4471	6,9550	6,6243
L (1ºd) e ST (48h)	4,9911	6,4831	6,1210
ST (1ºd) e L (48h)	6,2436	6,8157	6,2114
P	0,0287	0,7707	0,9651

(-) Ausência

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Em relação à enumeração de *S. Typhimurium* do ingluvío e ceco, os resultados estão mostrados na Tabela 3. Verifica-se que a quantificação de UFCs da *S. Typhimurium* aos 14 dias, do conteúdo do ingluvío, assim como do conteúdo do ceco apresentaram diferenças ( $P < 0,05$ ) em relação aos demais tratamentos. Destaca-se, ainda, que os grupos que receberam o patógeno antes da lactulose e controle positivo apresentaram uma contagem mais elevada de UFC.

Observa-se, também que, aos 21 dias as UFCs obtidas do ingluvío se mantiveram mais altas no controle positivo e foram diferentes ( $P < 0,05$ ) do demais tratamentos. Ainda, nota-se que as UFCs do conteúdo cecal nos grupos que receberam simultaneamente o patógeno e lactulose [ST (1ºd) + L (1ºd)], e o patógeno e posteriormente lactulose [ST (1ºd) + L (48h)], não apresentaram diferenças significativas do grupo controle positivo.

TABELA 3- Valores médios de unidades formadoras de colônias (UFCs) de *Salmonella* Typhimurium, expressas em log, no Inglúvio e no ceco de frangos de corte recebendo lactulose (L) e/ou *Salmonella* Typhimurium (ST) aos 14, 21 e 28 dias de idade.

Tratamentos	Inglúvio		
	14 dias	21 dias	28 dias
Placebo	-	-	-
Controle positivo (ST)	1,1112A	1,7240A	1,5339A
Controle lactulose (L)	-	-	-
ST (1ºd) e L (1ºd)	-	-	1, 4316A
L (1ºd) e ST (48h)	-	0,5284B	-
ST (1ºd) e L (48h)	0,3774B	-	0,1000B
P	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Tratamentos	Ceco		
	14 dias	21 dias	28 dias
Placebo	-	-	-
Controle positivo (ST)	3,2346A	0,1000B	0,1000B
Controle lactulose (L)	-	-	-
ST (1ºd) e L (1ºd)	-	1,0000A	1,0000A
L (1ºd) e ST (48h)	-	-	-
ST (1ºd) e L (48h)	2,2479B	1,0000A	1,0000A
P	<0,0001	<0,0001	<0,0001

(-) Ausência

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Aos 28 dias, os resultados se apresentaram de forma semelhante aos 21 dias, ou seja, mantiveram-se com os mesmos valores, entretanto com maior registro de contagem de UFCs de *Salmonella* no Inglúvio do grupo [ST (1ºd) e L (48h)].

Analisando, ainda, a Tabela 3 observa-se que, aos 28 dias, os valores de UFCs no Inglúvio foram maiores para o controle positivo, que se mostrou estatisticamente diferente dos grupos que receberam o patógeno associada à lactulose. No ceco, a contagem de um menor valor foi para o controle positivo que foi diferente (P<0,05) dos grupos que receberam a *S. Typhimurium* e a lactulose, e a lactulose e posteriormente (48h) o patógeno.

## DISCUSSÃO

Neste estudo, enquanto a lactulose foi fornecida, associada ou não à *S. Typhimurium*, ocorreu redução do pH no ingúvio e até os sete dias no ceco. De acordo com WIEMER (1999) a lactulose, que é um dissacarídeo, composta por uma molécula de galactose e uma molécula de frutose (4-O-β-D-galactose-D-frutose), considerada um isômero da lactose, leva à diminuição do desenvolvimento de diversas bactérias intestinais, patogênicas ou não, pelo aumento da quantidade de ácido láctico com conseqüente redução do pH.

Além disso, de acordo ANDREATTI FILHO & SILVA (2005) as substâncias prebióticas, agem alimentando e estimulando o crescimento de diversas bactérias intestinais, cujos metabólitos atuam, também, reduzindo o pH, mediante o aumento da quantidade de ácidos orgânicos principalmente ácido láctico nos cecos.

Destaca-se que no mesmo período ocorreu uma reduzida contagem ou mesmo ausência de *E. coli* nos grupos que receberam a lactulose. Inere-se por isso, que a redução de pH contribuiu para a redução de *E. coli*. Esses resultados estão respaldados nos dados experimentais obtidos por MATHEW et al. (1993), que adicionaram 1% de galactanas, e por GEBBINK et al. (2000), que adicionaram 5% de fruto-oligossacarídeo (FOS) em dietas para leitões recém desmamados, demonstrando a ação efetiva destes compostos no aumento na população de bactérias lácticas, redução do pH e diminuição na contagem de *E. coli*.

Outra análise que os dados permitem sugerir quanto aos grupos inoculados experimentalmente com *S. Typhimurium* e tratados com a lactulose, é que essa droga modificou a microbiota transiente (residente temporária) e mesmo a indígena (colonização permanentemente) do ingúvio determinando a inibição de populações de *E. coli* pelo mecanismo de exclusão competitiva. Além disso, WAGNER & THOMAS (1978), relataram que os microrganismos Gram-negativos como *E. coli*, são incapazes de fermentar lactulose tendo seu crescimento diminuído quando em presença de substâncias utilizadas como depressores de crescimento microbiano.

Por outro lado, o pH cecal não mostrou diferenças ( $P>0,05$ ) entre os diferentes tratamentos aos 14 e 21 dias. Esperava-se menores valores de pH pelo efeito da lactulose, tendo em vista que inicialmente ocorreu essa alteração e conseqüentemente haveria aumento de bactérias benéficas produtoras de ácidos orgânicos.

Especula-se, que outros fatores como dieta, renovação celular, temperatura, privação de alimentos interferiram nesse processo. Uma hipótese provável para explicar esse dado seria a dose, o veículo, e o período de administração da substância, ou melhor, a quantidade e o tempo de administração da droga talvez não tenham sido suficientes para modificar ou promover essa mudança de pH até 21 dias do experimento. Outra possibilidade seria um mecanismo de ação da lactulose diferente do conhecido, pois de acordo com FAIRCHILD et al. (1999) nem sempre a ingestão de compostos com potencial ação prebiótica causa mudanças no pH cecal e isto pode estar relacionado com a população microbiana da espécie animal e a ingestão da quantidade do produto adicionado à alimentação.

Constatou-se ainda, que aos 28 dias os maiores valores de pH do inglúvio, assim como ceco, foram detectados para os tratamentos que receberam a droga e o placebo. O comportamento da *S. Typhimurium* isoladamente ou mesmo quando inoculada simultaneamente com a lactulose ou 48 horas após a inoculação da *Salmonella* propiciou algum efeito nas condições luminais do intestino propiciando maior desenvolvimento da *Salmonella* que por competição, eliminou bactérias, inclusive benéficas. Essa explicação encontra respaldo em FERREIRA (2000), quando afirmou que o trato entérico das aves tem complexidade ainda não totalmente conhecida, mas sabe-se que a composição nutricional da alimentação fornecida, o pH de cada porção do intestino, a tensão de oxigênio no intestino delgado e dióxido de carbono no ceco são fatores que regulam a população de microrganismos.

Não se observou diferenças ( $P>0,05$ ) na quantificação de *E. coli* no ceco. Esse resultado não pode ser atribuído às mudanças de pH, pois os valores aos 14 dias e 21 dias não se modificaram e aos 28 dias o maior valor de pH foi verificado no controle da lactulose que foi semelhante ao grupo placebo. Estes dados foram diferentes dos resultados obtidos em trabalhos desenvolvidos por STANLEY et al. (1996a) que observaram significativa redução na contagem de

coliformes totais ( $2 \log_{10}$ ) em cecos de frangos de corte que receberam 0,2% de lactulose na dieta. Esses resultados podem ser atribuídos à concentração da droga, ao veículo usado para fornecer o medicamento, à ração que foi mudada devido à fase de crescimento e talvez a um mecanismo diferente da lactulose. Acrescenta-se a tudo isso, que *E. coli*, integrante do TGI das aves, não tem seu papel totalmente elucidado nas atividades intestinais e encontra-se em concentrações acima de  $10^6$  UFCs por grama de fezes. Embora seu papel não esteja totalmente definido, 10-15% dessa população pode ser considerada potencialmente patogênica (GEDEK, 1986; LEITE, 2001; BARNES et al., 2003).

A quantificação de UFCs de *S. Typhimurium* aos 14 dias do conteúdo do inglúvio, assim como do conteúdo do ceco apresentaram diferenças ( $P < 0,05$ ) em relação aos demais tratamentos. Verifica-se que, somente os grupos que receberam o patógeno e simultaneamente a lactulose, e lactulose e 48 horas a *S. Typhimurium* apresentaram ausência de UFCs do agente inoculado. Isso permite especular que a lactulose reduziu a colonização por *S. Typhimurium* no inglúvio e no ceco, embora o ceco seja o local onde a *Salmonella* encontra condições para se desenvolver com mais facilidade. Essa característica, conforme MCHAN et al., (1989), relaciona-se com receptores específicos no órgão e com a fisiologia do peristaltismo cecal, que possibilita maior tempo de permanência do bolo alimentar. O fornecimento da lactulose aumentou o peristaltismo cecal o que determinou menor tempo de permanência do bolo alimentar e, portanto menor colonização pela bactéria inoculada. Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho realizado por HOOGE (2006) onde relatou que a adição de altos níveis de MOS fosforilado (0,40%) na dieta de frangos jovens desafiados com *Salmonella* reduziram as contagens de bactérias no ceco.

Outra avaliação que deve ser feita é sobre a recuperação da *S. Typhimurium* nos conteúdos do inglúvio. Observou-se que com o avançar da idade, no grupo controle positivo os valores de UFCs foram maiores e sem diferenças estatísticas do grupo que recebeu o patógeno simultaneamente à lactulose. Deve-se considerar que no inglúvio ocorre a predominância de *Lactobacillus* e *Streptococcus* que formam uma camada com duas ou três fileiras de células aderidas à superfície epitelial que produzem ácido láctico e acético. Essa característica permite manter o pH desse segmento próximo a 5,0 (GAUTHIER, 2002; FERREIRA, 2006) o que propicia o controle, inibição ou

estimula a proliferação de outras espécies bacterianas da família de *Enterobacteriaceae*, inclusive da *Salmonella*. Por outro lado, variações que resultam em uma excessiva oferta de algum substrato ou supressão das bactérias benéficas podem apresentar efeitos prejudiciais ao hospedeiro (WELTZIEN, 2003).

Por outro lado, a contagem de UFCs de *S. Typhimurium* no ceco foi menor para o controle positivo e diferente ( $P < 0,05$ ) dos grupos que receberam a *S. Typhimurium* e a lactulose, e a lactulose e posteriormente (48h) o patógeno. O que pode se destacar é que a idade foi um fator importante na redução da colonização no ceco, e também de alguma forma a lactulose, fornecida de 1 -14 dias de idade das aves, e posteriormente retirada, influenciou na microbiota do ceco o que facilitou a reinfecção mais tardia.

Segundo FURLAN et al. (2004) para que as bactérias consigam colonizar TGI e criar uma condição patológica, precisam inicialmente aderir-se à superfície epitelial através de glicoproteínas que reconhecem determinados açúcares da superfície do epitélio intestinal. Caso as bactérias se liguem a um açúcar e não à mucosa intestinal, irão passar com a ingesta sem causar problemas digestivos para os animais. Desta forma, os açúcares são capazes de bloquear a aderência dos patógenos e evitar a colonização. Enquanto a lactulose era fornecida, impediu a colonização do patógeno e essa afirmação pode de alguma forma, justificar esse achado, pois a bactéria eliminada pelas fezes das aves inoculadas contaminou o ambiente onde as aves estavam alojadas, e por via oro-fecal, aquelas que não contaminaram se contaminaram mais tardiamente. Ou então, considerando as afirmações de SAAVEDRA & TSCHERMIA (2002), de que a microbiota intestinal possui um mecanismo metabolicamente ativo, sujeito a variação na composição e no número de espécies presentes na microbiota.

Por estes resultados, pode-se inferir que a lactulose reduziu ou impediu a colonização do ceco pela *Salmonella*. Ou ainda, estimulou seletivamente o crescimento bacteriano, ativando o metabolismo de bactérias benéficas do TGI. Esses dados foram parcialmente discutidos por LODDI et al. (2006) que relataram que monooligosacarídeos possuem características específicas, que permitem reduzir a colonização de patógenos no organismo. Portanto, além dos benefícios da saúde do próprio animal, também existe o benefício na segurança dos alimentos pela redução de contaminação de carcaça.

## CONCLUSÕES

Constatou-se que a lactulose reduziu a colonização cecal de *Salmonella* Typhimurium, bem como das UFCs da *E. coli* no ingúvio.

## REFERÊNCIAS

1. ANDREATTI FILHO, R. L.; SILVA, E. N.; BALEN, L. Probióticos e correlatos na produção avícola. **Farmacologia aplicada à avicultura**, 1 ed., São Paulo: ROCA, p. 225-237, 2005.
2. ANDREATTI FILHO, R. L. Alimentos funcionais na Produção Avícola. **Saúde Aviária e Doenças**. Ed. ROCA, São Paulo, Brasil, p. 41-52, 2008.
3. BACK, A.; BELTRÃO, N.; LEÃO, J. A. Monitoria e controle de Salmonella: aspectos práticos. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 7, 2006. **Anais...** Embrapa Suínos e Aves, p. 95-103, 2006.
4. BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J. P.; GROSS, W. B. Colibacillosis. In: SAIF, Y. M. **Diseases of Poultry**, 11 ed., Ames, Iowa: Iowa States Press, p. 631-656, 2003.
5. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 70**. Programa de Redução de Patógenos (PRP), v. 1, Brasília, 2003, 168 p.
6. FAIRCHILD, A.S. et al. Effect of hen age, Bio-Mos and Flavomycin on susceptibility of turkey poults to oral *Escherichia coli* challenge In: ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM, 15, 1999, Nottingham. **Proceedings...** Nottingham: Alltech, p.185 – 201, 1999.
7. FERNÁNDEZ, A.; LARA, C.; LOSTE, A.; CALVO, S.; MARCA, M.C. Control of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 experimental infection by fosfomycin in newly hatched chicks. **Comparative Immunology, Microbiology & Infections Disease**, v. 24, p. 207-216, 2001.
8. FERREIRA, A. J. P. Exclusão competitiva na avicultura. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2000. p. 6873, 2000.
9. FERREIRA, A, P.; FERREIRA, C. S. Medidas inespecíficas para o controle bacteriano. In: VII SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. 2006, Chapecó. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, p. 19-31, 2006.
10. FUKAYAMA, E. H.; BERTECHINI, A. G.; GERALDO, A.; KANJI KATO, R. SOLIS MURGAS, L. D. Extrato de Orégano como Aditivo em Rações para Frangos de Corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2316-2326, 2005.
11. FURLAN, R. L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. SIMPÓSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MATRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO, 5, ACAV,

2004. Balneário Camboriú, SC. Anais... Concórdia: EMBRAPA suínos e aves, p. 6-28, 2004.
12. GAUTHIER, R. La Salud Intestinal: Clave de la productividad (El caso de los Ácidos Orgânicos). In: Precongreso Científico Avícola IASA, XXVII Convención ANECA-WPDC. Puerto Vallarta, Jal. México, 2002. **Anais eletrônicos...** [online] Disponível em: <http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/00CAP8.pdf>. Acesso em: 16/08/2008.
  13. GEBBINK, G .A. R. **Effects of addition offruooligosaccharide (FOS) and sugar beet pulp to weanling pig diets on performance, microflora and intestinal health.** Acesso em 12 de abril de 2007. Online. Disponível em: <http://www.ansc.purdue.edu/swine/swineday/sday.html>.
  14. GEDEK, B. Kompendium der medizinischen Mykologie. Pareys Studentext 25, Berlin, Hamburg: **Paul Parey**, p. 147-182, 1986.
  15. GUIMARÃES, C. V.; GUEDES, R. M. C. Aditivos alimentares para manutenção da integridade intestinal de aves e suínos. Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia, v. 54, p. 1-97, 2007.
  16. HAFEZ, H. M. Perspectiva global de enfermidades emergentes e re-emergentes em aves. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Santos, **Anais...** Santos: FACTA, 2005, p. 123-138.
  17. HOFACRE, C. L.; FROYMAN, R.; GAUTRIAS, B.; GEORGE, B.; GOODWIN, M. A.; BROWN, J. Use of Aviguard and other intestinal bioproducts in experimental Clostridium perfringens-associated necrotizing enteritis in broiler chickens. **Avian Diseases.** 42:579-584, 1998.
  18. HOOGE, D. M. Meta-análise de experimentos com frangos de corte mantidos em boxes experimentais avaliando os efeitos do mananoligossacarídeos fosforilado. In: Promotores naturais de crescimento. **Especial Ave World.** A Revista do Avicultor Moderno, ago/set 2006. São Paulo: Animal World, Edição especial, p 9-10.
  19. LEITE, C. R. C. Desinfecção química aplicada na avicultura: concentrações inibitórias mínimas de desinfetantes derivados de quartenário de amônia e hipoclorito de sódio sobre *Salmonella* sp. e *E. coli*. **Dissertação (mestrado).** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, 2001, 103 p.
  20. LODDI, M. M; MORAES, V. B. M.; NAKAGHI, L. S. O.; TUCCI, F. M.; BRUNO, L. D. G.; MACARI, M. Efeito de mananoligossacarídeos fosforilado e ácidos orgânicos sobre o desempenho e morfologia intestinal de frangos de corte. In: Promotores naturais de crescimento. **Especial Ave World.** A Revista do Avicultor Moderno, ago/set 2006. São Paulo: Animal World, Edição especial, p.10-12.

21. MATHEW, A.G. et al. Effect of galactan on selected microbial populations and pH and volatile fatty acids in the ileum of the weanling pig. **Journal Animal Science**, Savoy, v. 71, n. 6, p.1503-1509, 1993.
22. MCHAN, COX N. A.; BLANKENSHIP, L. C.; BAILEY, J. S. In vitro attachment of *Salmonella* Typhimurium to chick ceca exposed to select carbohydrates. **Avian Diseases**, 1989.
23. POPOFF, M.Y.; BOCKEMUHL, J.; GHEESLING, L.L. **Supplement Research in Microbiology**, v. 154, p. 173-174, 2003.
24. REZENDE, C. S. M. **Ocorrência de *Salmonella* em lotes de frangos de corte de agroindústrias goianas**: identificação bacteriológica e perfil de sensibilidade a antimicrobianos. Goiânia, 2002, 73 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Sanidade Animal). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.
25. RIBEIRO, A. M. L.; VOGT, L. K.; CANAL, C. W.; LAGANÁ, C.; STRECK, F. Vitamins and organic minerals supplementation and its effect upon the immunocompetence of broilers submitted to heat stress. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol. 37, n. 4, Viçosa, 2008.
26. ROSTAGNO, H. S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**; composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa: UFV, Departamento de Zootecnia, 2000, 221p.
27. SAAVEDRA, J. M.; TSCHERMIA, A. human studies with probiotics and prebiotics: clinical implications. **British Journal Nutrition**. 87, p. 241-246. 2002.
28. SAS Institute. SAS (Statistical Analysis System). User's Guide: Statistics. Cary, NC: SAS Institute INC; 2000.
29. SILVA, E. N.; TEIXEIRA, A. S.; FIALHO, E. T.; BERTECHINI, A. G.; SOUZA, P. R. I. Efeitos dos probióticos e antibióticos sobre as vilosidades e pH do trato gastrointestinal de frangos de corte. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.24 (Edição Especial), p.163-173, 2000.
30. STANLEY, V.G. et al. Effects of lactose and Bio-MOS in dietary application on growth and total coliform bacteria reduction in broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 75, supp. 1, p. 61, 1996 a.
31. WAGNER, D. D.; THOMAS, P. O. Influence of diets containing rye or pectin on the intestinal flora of chickens. **Poultry Science**. Champaign, n. 75, p. 971, 1978.
32. WELTZIEN, E. M. Effectes of feed form on gut microbiota in broilers. **Poultry Industry Council**, Ontario, v.1, n.5, 2003.

33. WIEMER, F. **Untersuchungen zur Salmonellenprävalenz in Ferkelerzeugerbetrieben sowie erste Ergebnisse der Behandlung porciner Salmonelleninfektionen mit Lactulose.** (Dissertation) Hannover, 1999, 117 p.

#### **CAPÍTULO 4- AVALIAÇÃO DO EFEITO SISTÊMICO DA LACTULOSE EM AVES INOCULADAS EXPERIMENTALMENTE COM *Salmonella* Typhimurium**

**RESUMO:** O presente trabalho foi desenvolvido para avaliar os efeitos sistêmicos da lactulose em aves inoculadas experimentalmente com *Salmonella* Typhimurium, através da bacteriologia convencional, alterações hepáticas e bioquímica sérica. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, onde se utilizaram 630 pintos, machos, os quais foram distribuídos em seis tratamentos, com sete repetições e 15 aves por unidade experimental. O tratamento 1 (ttm 1) constituiu o grupo placebo; ttm 2 recebeu somente a lactulose; ttm 3 recebeu somente a *S. Typhimurium*; ttm 4 foi inoculado com a lactulose e a *S. Typhimurium* no 1º dia de vida; ttm 5 foi inoculado com a lactulose 48h antes da *S. Typhimurium* e o ttm 6 recebeu a *S. Typhimurium* 48h antes da lactulose. Nos dias sete, 14, 21 e 28 de idade, uma ave por parcela foi necropsiada e seus órgãos coletados e submetidos às análises de bacteriologias e biométricas de fígado, sendo que nos dias 14 e 28 foram coletados fragmentos de fígados para exames histopatológicos. Nos dias 14, 28 e 35 dias de vida, coletaram-se amostras de sangue das aves para exames de bioquímica sérica. Os dados quantitativos de biometria do fígado e bioquímica sérica foram analisados aplicando ANOVA e Tukey (5%) e os dados qualitativos de análises bacteriológicas e alterações histopatológicas do fígado foram analisados por frequência simples. Constatou-se que a lactulose impediu a infecção no período inicial de vida das aves, mostrando melhor efeito, quando administrada 48 horas antes da inoculação do patógeno. Constatou-se, também, que houve aumento do peso relativo do fígado e discretas alterações hepáticas pela *Salmonella* Typhimurium em todas as idades estudadas. Pode se concluir que a lactulose foi capaz de impedir a infecção sistêmica enquanto estava sendo fornecida, tendo mostrado melhor efeito preventivo; e ainda determinou discretas alterações hepáticas semelhantes a um processo congestivo.

Palavras-chave: bioquímica sérica, biometria, histopatologia hepática, prebiótico.

## EVALUATION OF THE SISTEMIC EFFECT OF LACTULOSE IN BROILERS EXPERIMENTALLY INCULATED WITH *Salmonella* Typhimurium

**ABSTRACT:** This study was conducted to assess the systemic effects of lactulose in birds experimentally inoculated with *Salmonella* Typhimurium, through conventional bacteriology, liver changes and serum biochemistry. Birds were allotted in a completely randomized design, with 630 day-old male chicks distributed in six treatments, with seven replications and 15 birds per experimental unit. Treatment (ttm) 1 did not receive microbial inoculum or lactulose (placebo group), ttm2 received only lactulose (control group of lactulose-L), ttm 3 received only *S. Typhimurium* (ST-positive control group), ttm 4 received lactulose and *S. Typhimurium* in the first day of life (L (1) + ST (1)), ttm 5 received lactulose 48 hours before the *S. Typhimurium* (L (1) + ST (48h)) and ttm 6 received the *S. Typhimurium* 48h before lactulose (ST (1) + L (48h)). At seven, 14, 21 and 28 of age, one bird per plot was necropsied and submitted to bacteriological conventional analysis, and biometric measures of the liver, in which at 14 and 28 fragments were collected for pathological examinations. On 14, 28 and 35 days of life, blood samples were collected for serum biochemistry analysis. Lactulose prevented infection in the starter period of life, and better effect was observed when administered 48 hours before the pathogen inoculation. An increase in the liver relative weight was observed for *Salmonella* Typhimurium inoculated birds at all ages studied, and for lactulose discrete changes in liver occurred, and *Salmonella* Typhimurium did not determined severe clinical signs, even mortality and that its recovering index decreased with age. Lactulose was able to prevent systemic infection and shown better preventive effect when it has been provided to broilers, and determined liver changes similar to a discrete process congestion.

Keywords: biometrics, histopathology liver, prebiotics, serum biochemistry.

## INTRODUÇÃO

As salmoneloses são apontadas como uma das principais doenças de origem bacteriana, que possuem sorovares capazes de causar toxinfecções alimentares em humanos. A veiculação de doenças entre animais e homens é tema atual e de preocupação global do ponto de vista técnico-científico e comercial (REZENDE, 2006).

A qualidade sanitária do frango é fator relevante para saúde pública. Enquadra-se neste contexto, todo um complexo agroindustrial de criação de aves e de comercialização nacional e internacional de carnes. Por isto necessita de um cuidadoso programa de prevenção e controle que devem contemplar medidas que possam evitar a disseminação (TESSARI et al., 2002; REZENDE, 2006).

No homem, *Salmonella* Typhimurium é causa comum de gastroenterites usualmente benignas e auto-limitadas, entretanto em qualquer surto, alguns óbitos podem ocorrer, principalmente, naqueles que desenvolvem a grave forma sistêmica (BRENNER et al., 2000).

A colonização das aves por salmonelas é influenciada pela capacidade da bactéria em sobreviver à passagem pelo trato intestinal, pela competição microbiana, pelo uso de medicamentos, pelo estresse dos animais e pelo estado fisiológico, genética e idade. As salmonelas localizam-se, principalmente, no ceco e podem ser excretadas por um longo período sem que a ave apresente sintomas. As aves com a infecção inaparente, ao excretarem salmonelas pelas fezes, a disseminam no plantel e também podem ocasionar contaminações cruzadas nos abatedouros avícolas (FRANCO & LANDGRAF, 1996; DELAZARI, 2001; LEITÃO, 2001).

Para manter o equilíbrio benéfico da microbiota do trato gastrintestinal (TGI), mesmo em condições de estresse, os principais produtos usados nas últimas cinco décadas foram os antibióticos e os quimioterápicos que, em doses subterapêuticas, atuam como promotores de crescimento, diminuindo os índices de mortalidade e aumentando a eficiência produtiva e reprodutiva (SALYERS, 1999).

Além disso, os antibióticos, geralmente, eliminam as bactérias lácticas e bífidas que são as principais bactérias benéficas que compõe a microbiota. Estes microrganismos desejáveis colonizam o epitélio intestinal, além de

produzirem metabólitos que mantêm sob controle os demais microrganismos indesejáveis (FERREIRA, 1998).

No entanto, a restrição do uso dos antibióticos e os quimioterápicos na nutrição animal tem se tornado crescente nos últimos anos, sendo necessário então, buscar alternativas e produtos substitutivos para os antibióticos.

A lactulose é um dissacarídeo não digestível, útil em doenças inflamatórias infecciosas do intestino do homem, como salmoneloses, tendo sido utilizada na medicina humana por cerca de 40 anos, principalmente no tratamento de encefalopatia portosistêmica e constipação. A farmacodinâmica da lactulose faz dela uma droga segura e eficaz nestas indicações (SCHUMANN, 2002). Promove ações antitumores (principalmente no cólon intestinal), antimicrobianas, hipolipidêmica e hipoglicêmica, podendo melhorar também a absorção e o balanço de minerais, além de possuir atividade antiosteoporótica. Tem sido usada no Japão e nos Estados Unidos, em alimentos funcionais e como suplemento nutricional (HOLZ & MIDDLETON, 2005).

Ainda que este assunto mereça ser melhor explorado, produtos alternativos, capazes de manter o equilíbrio da microbiota sem causar prejuízos à saúde, tais como os prebióticos, incluindo a lactulose, têm sido estudados (McINTOSH, 1996).

A presente pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar os efeitos sistêmicos da lactulose em frangos de corte inoculados experimentalmente, via ingluvío com *Salmonella* Typhimurium, pela análise de invasão e persistência do patógeno em órgãos e pelos parâmetros hepáticos biométricos, bioquímicos e histopatológicos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Local

O experimento foi realizado no Núcleo Experimental de Doenças de Aves e no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária e Laboratório Clínico do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária (EV) da Universidade Federal de Goiás (UFG) durante os meses de janeiro e fevereiro de 2008.

### Manejo Experimental

Os pintos da linhagem Cobb, machos, de um dia de idade, foram divididos em seis tratamentos, com sete repetições cada, alojados em grupos de 15 aves por unidade experimental, em um total de 42 unidades experimentais.

As aves foram pesadas, identificadas e distribuídas em seis tratamentos de 105 pintos cada, conforme o delineamento abaixo:

TRATAMENTO 1: constituiu o grupo controle que não recebeu o inóculo microbiano nem a lactulose (Placebo).

TRATAMENTO 2: constituiu o grupo de aves inoculadas diretamente no inglúvio no primeiro dia de vida, com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente  $5,0 \times 10^2$  UFC/0,5 mL de *S. Typhimurium* (controle positivo- ST).

TRATAMENTO 3: constituiu o grupo que recebeu água adicionada com lactulose, na dosagem estabelecida em um pré-experimento, a dose utilizada foi de 0,023 mL/g de peso vivo, do primeiro aos 14 dias de vida de alojamento (controle da Lactulose).

TRATAMENTO 4: constituiu o grupo de aves inoculadas diretamente no inglúvio no primeiro dia de vida, com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente  $5,0 \times 10^2$  UFC/0,5 mL de *S. Typhimurium* e 48 horas depois, a lactulose foi fornecida na água de bebida até 14 dias de vida da ave, na mesma quantidade do controle [(ST(1<sup>0</sup>) +L(48h)].

TRATAMENTO 5: constituiu o grupo de aves que recebeu a água com lactulose desde o primeiro dia de vida na mesma dose do controle, e com 48 horas, foram inoculadas diretamente no ingluvío com 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente  $5,0 \times 10^2$  UFC/0,5 mL de *S. Typhimurium* [(L(1<sup>0</sup>) +ST(48h)].

TRATAMENTO 6: constituiu o grupo de aves que recebeu diretamente no ingluvío 0,5 mL de solução salina tamponada a 0,85%, contendo aproximadamente  $5,0 \times 10^2$  UFC/0,5 mL de *S. Typhimurium* e a água com lactulose, na quantidade de 0,023 mL/g de peso vivo, do primeiro até aos 14 dias [(ST(1<sup>0</sup>) +L(1<sup>0</sup>)].

As aves desafiadas e não desafiadas foram alojadas separadamente, mantendo-se a mesma ambiência, em baterias com cinco andares de aço galvanizado, equipadas com comedouros e bebedouros tipos lineares e bandejas para retirada de excretas. As baterias foram aquecidas com uma lâmpada incandescente de 60W por andar até os 21 dias de idade.

### **Preparação do inóculo**

O inóculo foi preparado com *S. Typhimurium* isolada de amostras oriundas de frangos de corte cedida por REZENDE (2002). A concentração do inóculo foi de  $5,0 \times 10^2$  UFC/0,5 mL, conforme descrito por REZENDE (2002).

Para obtenção do inóculo, a cepa foi repicada em ágar verde brilhante e incubada a 37° C, por 18-20h. Em seguida, as células foram suspensas em solução salina tamponada a 0,85%, mantidas a 4° C e concentração de  $5,0 \times 10^2$  UFC/mL ajustada com auxílio da escala de Mac Farland (FERNÁNDEZ et al., 2001). A concentração foi confirmada pelo plaqueamento das diluições decimais seriadas em ágar verde brilhante, com posterior incubação a 37° C e quantificação das UFC de *Salmonella*.

### **Cálculo da dose de lactulose- pré-experimento**

Foi realizado um pré-experimento, com 30 pintos de corte até 10 dias de vida, onde foram administradas doses diárias crescentes de lactulose, na água de bebida, até obter uma dose que determinasse eliminação de fezes amolecidas.

A dose assim definida e utilizada foi de 0,023 mL/g de peso vivo. Calculou-se ainda a ingestão diária de água pelas aves, sendo considerado o peso diário, o estabelecido pelo o manual da linhagem.

A quantidade de lactulose era calculada diariamente, multiplicando a dose pela quantidade de aves em cada gaiola, sendo medida com o auxílio de uma pipeta volumétrica. A lactulose era homogeneizada com água em um balde e colocada nos bebedouros, esta prática foi repetida a cada 24 horas, desde o primeiro, até os 14 dias de experimento.

### **Programa alimentar**

A dieta fornecida aos animais, farelada à base de milho moído e farelo de soja, foi formulada de acordo com a composição dos alimentos e exigências nutricionais preconizadas por ROSTAGNO (2000) e não continha nenhum produto químico, ou seja, anticoccidianos e antibióticos promotores de crescimento. As aves de todos os tratamentos receberam a mesma dieta, fornecida “*ad libitum*”, durante todo o período experimental de criação das aves.

### **Recuperação de *Salmonella Typhimurium***

Nos dias sete, 14, 21 e 28 de idade, uma ave por parcela foi sacrificada e necropsiada. De cada animal, foi colhido aproximadamente 1g de cada órgão, sendo coletados o baço, fígado, coração, suabe de ingluvío e conteúdo cecal de aves.

As amostras foram homogeneizadas e transferidas para tubos contendo caldos de enriquecimento e processados de acordo com BRASIL (2003) e com o GEORGIA POULTRY LABORATORY (1997), com algumas modificações descritas a seguir. Após preparação das amostras dos órgãos, estas foram

enriquecidas utilizando o caldo Selenito Cistina em alíquotas de nove mL e acondicionadas em estufa a 37° C por 24h.

Após este período, de cada cultura foram realizados repiques nos ágar verde brilhante e Hektoen e incubadas a 37° C por 24h. De cada um dos ágar foram selecionadas de três a cinco colônias sugestivas da bactéria e repicadas em ágar tríplice açúcar-ferro (ágar TSI), seguindo-se incubação a 37° C por 24 h. As amostras bacterianas que apresentarem reações e características compatíveis as do gênero *Salmonella* foram submetidas aos seguintes testes bioquímicos: produção de indol, produção de H<sub>2</sub>S, urease, descarboxilação da lisina, vermelho de metila, utilização do malonato e motilidade.

Os tubos de análise bioquímica foram incubados a 37° C por até sete dias, com leituras diárias, para as provas com resultados negativos nas primeiras 48 horas de incubação e para os testes de descarboxilação ou hidrólise de aminoácidos. As amostras confirmadas bioquimicamente como *Salmonella* foram submetidas ao teste sorológico com soros polivalentes anti “O”. Aquelas confirmadas na bioquímica e na sorologia foram encaminhadas ao Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ) para tipificação sorológica.

### **Exames biométricos do fígado**

Para determinação do índice biométrico do fígado, uma ave por parcela, após jejum de seis horas, foi pesada e sacrificada aos sete, 14, 21, 28 dias de idade. O peso do fígado foi anotado para cálculo da relação peso de órgão/peso da ave.

### **Exames histopatológicos**

Fragmentos de fígados foram coletados e processados de acordo com a metodologia convencional de LUNA (1968), uma vez fixadas por 24h em solução de formalina neutra tamponada a 10%, os fragmentos foram recortados, acondicionados em cassetes e identificados. Em seguida, foram lavados em água

corrente para retirada de excessos de pigmentos de formol e posteriormente desidratados em álcool etílico em série crescente, desde 70% até álcool absoluto.

Posteriormente, procedeu-se à clarificação com xilol e impregnação em parafina histológica, com ponto de fusão a 56° C. Os fragmentos de 5,0 mm foram incluídos em blocos de parafinas histológicas, seccionados a 5,0 µm em micrótomo rotativo, marca American-Optical, modelo Spencer-820, utilizando navalhas descartáveis, laminados, e coradas pelo método de Hematoxilina – Eosina (HE), sendo as lâminas lidas em microscópio óptico de campo claro, marca Carl Zeiss, modelo JENAVAL.

### **Bioquímica sérica**

Para avaliação da função hepática das aves, foram retirados cerca de dois a três mL de sangue, por punção intracardíaca, nos dias 14, 28 e 35 de idade. O sangue foi vertido em frascos, colocado em repouso em temperatura ambiente para obter os soros para determinação de Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT).

As análises foram realizadas utilizando reagentes comerciais desenvolvidos pelo Laboratório Labtest, e as leituras foram feitas em Espectrofotômetro.

### **Análises estatísticas**

Os dados quantitativos de biometria de fígado e bioquímica sérica foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas quando necessário pelo teste de Tukey a 5%, sendo utilizado o procedimento *general linear model* (GLM) do pacote estatístico SAS (2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises bacteriológicas dos conteúdos de inglúvio, ceco, baço, *pool* de fígado mais coração estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 - Frequência de isolamento de *Salmonella* Typhimurium (ST) de conteúdo de inglúvio, ceco, baço, fígado e coração de frangos de corte recebendo lactulose (L) aos sete, 14, 21 e 28 dias de idade.

Tratamentos	Inglúvio	Ceco	Fíg+Cor	Baço	Total
<b>7 dias de idade</b>					
Placebo	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/20(0%)
Controle Lactulose (L)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/20(0%)
Controle positivo (ST)	4/5(80%)	5/5(100%)	4/5(80%)	4/5(80%)	17/20(85%)
ST (1° d) + L (1°d)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/28(0%)
ST (1° d) + L (48h)	0/7(0%)	2/7(28,5%)	0/7(0%)	0/7(0%)	2/28(7,1%)
L (1°d) + ST (48h)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/28(0%)
<b>Total</b>	4/26(15,4%)	7/26(26,9%)	4/26(15,4%)	4/26(15,4%)	19/144(0,13%)
<b>14 dias de idade</b>					
Placebo	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/20(0%)
Controle Lactulose (L)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/20(0%)
Controle positivo (ST)	0/5(0%)	5/5(100%)	4/5(80%)	5/5(100%)	14/20(70%)
ST (1° d) + L (1°d)	0/7(0%)	0/7(0%)	2/7(28,5%)	2/7(28,5%)	4/28(14,2%)
ST (1° d) + L (48h)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/28(0%)
L (1°d) + ST (48h)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/28(0%)
<b>Total</b>	0/26(0%)	5/26(19,2%)	6/26(23,0%)	7/26(26,9%)	18/144(0,12%)
<b>21 dias de idade</b>					
Placebo	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/20(0%)
Controle Lactulose (L)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/20(0%)
Controle positivo (ST)	1/5(20%)	3/5(60%)	2/5(40%)	4/5(80%)	10/20(50%)
ST (1° d) + L (1°d)	0/7(0%)	2/7(28,5%)	1/7(14,2%)	2/7(28,5%)	5/28(17,8%)
ST (1° d) + L (48h)	2/7(28,5%)	0/7(0%)	0/7(0%)	1/7(14,2%)	3/28(10,7%)
L (1°d) + ST (48h)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/28(0%)
<b>Total</b>	3/26(11,5%)	6/26(23,0%)	3/26(11,5%)	7/26(26,9%)	19/144(0,13%)
<b>28 dias de idade</b>					
Placebo	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/20(0%)
Controle Lactulose (L)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/20(0%)
Controle positivo (ST)	1/5(20%)	2/5(40%)	3/5(60%)	2/5(40%)	8/20(40%)
ST (1° d) + L (1°d)	1/7(14,2%)	2/7(28,5%)	0/7(0%)	0/7(0%)	3/28(10,7%)
ST (1° d) + L (48h)	0/7(0%)	0/7(0%)	1/7(14,2%)	1/7(14,2%)	2/28(7,1%)
L (1°d) + ST (48h)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/28(0%)
<b>Total</b>	2/26(7,6%)	4/26(15,4%)	4/26(15,4%)	3/26(11,5%)	13/144(0,09%)

De acordo com os dados da referida Tabela 1, observa-se no grupo controle positivo, uma taxa de recuperação bacteriana de 85,0% (17/20) aos sete dias; 70,0% (14/20) aos 14 dias; 50,0% (10/20) aos 21 dias e 40% (8/20) aos 28 dias de idade das amostras analisadas. Verifica-se, portanto que ocorreu um declínio da freqüência de recuperação da bactéria com o avançar da idade. Isso sugere que pelas barreiras naturais o organismo tentou eliminar a *Salmonella*, Segundo DESMIDT et al. (1998) e BEAL et al. (2004) o mecanismo de resistência idade-dependente, compreendido como imunidade idade-dependente, correlacionada ao desenvolvimento natural do sistema imune que pela idade.

Nas aves em que se inoculou *S. Typhimurium* no primeiro dia de vida e administrou lactulose simultaneamente, o microrganismo foi recuperado em 0% (0/28), 14,2% (4/28), 17,8% (5/28), 10,8% (3/28) das amostras analisadas aos dias sete, 14, 21 e 28 dias de vida, respectivamente. Na idade de maior susceptibilidade à infecção verificou-se baixa recuperação. A partir daí e até 28 dias do estudo o patógeno se manteve num percentual de 10,7 a 17,8%, sendo a menor freqüência aos 28 dias. Esses dados que sugerem que a lactulose não impediu a reinfecção pela bactéria que foi eliminada pelas fezes das aves inoculadas. Provavelmente o protocolo utilizado, dose e via de administração da droga aplicada contribuíram para esse fato.

O grupo em que inoculou a *S. Typhimurium* e administrou a lactulose 48 horas após, observou-se taxas de recuperação bacteriana das amostras analisadas de 7,1% (2/28), 0% (0/28) , 10,7% (3/28) e 7,1% (2/28) aos sete, 14, 21 e 28 dias de idade, respectivamente. Verificou-se a presença da bactéria no conteúdo de cecos aos sete dias de vida e de acordo com GORHAM et al. (1991), o ceco é o principal local de multiplicação de *Salmonella* no organismo da ave, e neste estudo 48 horas foi tempo suficiente para a bactéria se desenvolver e se instalar neste órgão.

Aos 14 dias de vida, não se recuperou o patógeno nos órgãos analisados, porém a partir desta data, em que o fornecimento da lactulose foi interrompido, observaram-se taxas de recuperação bacteriana de 7,1% e 10,7%, comprovando o efeito redutor induzido pela lactulose durante o período de administração. Porém, o efeito não se manteve durante o tempo de vida das aves,

sugerindo que a lactulose fornece efeito protetor contra *Salmonella*, somente enquanto está presente no organismo.

Nota-se (Tabela 1) que em todas as idades avaliadas, o tratamento que ocorreu uma melhor proteção contra a *Salmonella*, foi aquele em que a lactulose foi utilizada em um período de 48 horas antes dos pintos serem desafiados, apresentando baixas taxas de recuperação bacteriana, 0% (0/112), em todas amostras analisadas e em todos os períodos. Através destes achados, comprova-se, que a lactulose apresentou efeitos preventivos, impedindo a aderência à mucosa epitelial e conseqüentemente a invasão e colonização pelo microrganismo.

Os grupos que receberam a lactulose juntamente com o inóculo bacteriano ou 48 horas após, demonstraram uma infectividade maior que o grupo que recebeu a lactulose 48 horas antes da inoculação das aves. COLLET (2000) explicou que estes compostos se ligariam a sítios receptores dos macrófagos, através do reconhecimento de determinados açúcares, presentes nas glicoproteínas da superfície epitelial das células, desencadeando uma reação em cascata que resultaria na ativação dos macrófagos e liberação de citoquinas, ativando a resposta imune adquirida, o que justificaria a menor presença de *Salmonella* nos tratamentos em que utilizou a lactulose preventivamente.

A diminuição da taxa de positividade para *Salmonella* aos 28 dias de idade em todos os grupos estudados mostra a capacidade de eliminação do patógeno pelo próprio organismo das aves. A susceptibilidade das aves à colonização intestinal por *Salmonella* sp. é maior durante os primeiros dias de vida, sendo posteriormente reduzida à medida que há o crescimento da microbiota intestinal normal, sendo que o seu estabelecimento ocorre entre a terceira e sexta semanas de idade (NURMI & RANTALA, 1973; BAILEY, 1988; BARNES et al., 2003).

Outro aspecto que foi evidenciado neste estudo foi a capacidade de invasão do patógeno no organismo da ave. Observa-se que no tratamento que só a *Salmonella* foi inoculada ocorreu uma redução na recuperação dos *pools* de fígado e coração e do baço em 17/20(85%) aos sete dias, 14/20(70%) aos 14 dias, 10/20(50%) aos 21 dias com a idade (Tabela 1). Já nas aves que receberam o inóculo no ingluvío e a lactulose na água no primeiro dia de vida observou 0/28 (0%) aos sete dias; 4/28 (14,2%) aos 14 dias, 3/28 (10,7%) aos 21 dias e 3/28

(10,7%). Esses achados indicam que a lactulose não teve efeito sistêmico, pois após a invasão das bactérias, elas permaneceram no organismo na mesma frequência até 28 dias da fase experimental.

Diariamente, duas vezes ao dia, as aves foram examinadas e os sinais clínicos observados. Estes foram percebidos até 14 dias de idade e consistiram, basicamente, na presença de excretas mais liquefeitas que em determinadas situações causaram tamponamento de cloaca. Estes dados confirmam parcialmente as afirmações de BARROW (2000) de que não existe clareza na ocorrência de enterite em aves infectadas pela *Salmonella*, mas o acúmulo de excretas na região pericloacal caracteriza certa disfunção intestinal quando a via de inoculação ocorre por via digestiva. Essa avaliação clínica encontra respaldo em BERCHIERI JR (2000), que afirmou que os sinais clínicos são raramente observados em aves com mais de 14 dias de idade.

TABELA 2 – Frequência da mortalidade de frangos de corte, inoculados com *Salmonella* Typhimurium e medicadas com lactulose no período de 1-28 dias de vida.

Tratamento	Aves/Tratamento	Nº de óbitos	Índice de mortalidade (%)
Placebo	105	2	1,90
Controle positivo (ST)	105	3	2,85
Controle lactulose (L)	105	2	1,90
ST (1ºd) e L (1ºd)	105	1	0,95
L (1ºd) e ST (48h)	105	0	0,00
ST (1ºd) e L (48h)	105	1	0,95
<b>Total</b>	630	9(9/630)	8,55%(9/630)

Acrescenta-se ainda que durante o período experimental, o índice de mortalidade total foi de 9/630 (8,55%), sendo que o grupo inoculado com *S. Typhimurium* apresentou 3/105 (2,85 %) não mostrando diferenças entre os demais tratamentos. Estas observações evidenciam que os óbitos ocorreram de forma aleatória e natural dentro da população animal. Evidenciam também que, *S.*

*Typhimurium* mostrou-se apatogênica na dose e via que foi inoculada e que a lactulose não apresentou toxicidade determinando mortalidade significativa.

Paralelamente, coletaram-se os fígados para análises biométricas, os quais foram pesados com sete, 14, 21 e 28 dias de idade e tiveram seus pesos relativos calculados e anotados (Tabela 3).

TABELA 3 – Peso relativo de fígados aos sete, 14, 21 e 28 dias de idade de frango de corte recebendo lactulose e/ou *Salmonella Typhimurium*.

Tratamentos	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
Placebo	3,27C	2,70C	2,22B	2,00B
Controle positivo (ST)	4,68AB	2,83BC	3,10AB	2,60AB
Controle lactulose (L)	3,61BC	3,54A	2,16B	1,96B
ST (1ºd) e L (1ºd)	4,82AB	3,62A	3,16AB	3,11A
L (1ºd) e ST (48h)	5,41A	2,83BC	3,67A	3,07A
ST (1ºd) e L (48h)	4,60ABC	3,35AB	3,78A	2,91A
C. V. (%)	15,1938	10,8373	16,8720	16,8876
P	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Análise de contraste entre tratamentos				
Placebo x Cont pos (ST)	0,0253	ns	ns	ns
Placebo x Cont lactu (L)	ns	0,0004	ns	ns
Cont pos (ST) x ST(1º)+L(1º)	0,0004	0,0001	ns	ns
Cont pos x L (1º)+ ST (48h)	ns	ns	ns	ns
Cont pos x ST (1º)+L (48h)	ns	0,0075	ns	ns
C. V. (%)	15,1938	10,8373	16,8720	16,8876

A; B - médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Aos sete, 14, 21 e 28 dias de vida, observou-se diferença ( $P < 0,05$ ) para o peso do fígado para os tratamentos estudados. Os tratamentos placebo e controle da lactulose, ou seja, aqueles que não receberam inoculação bacteriana foram os que apresentaram os menores pesos para o referido órgão.

Enquanto que os tratamentos que receberam experimentalmente a inoculação de *S. Typhimurium* e lactulose apresentaram maior peso de fígado durante todo o período experimental. O aumento do peso de fígado, provavelmente, seja resultante do processo infeccioso desencadeado pela

*Salmonella* nesse órgão. Além disso, de acordo com LANA et al., (2000), o fígado tem a função metabólica extremamente importante de regular a concentração no sangue da maioria dos metabólitos, particularmente glicose e aminoácidos, além de ser fisiologicamente responsável por neutralizar substâncias tóxicas produzidas pela atividade metabólica das bactérias.

Dos mesmos fígados, aos 14 e 28 dias de vida coletaram-se fragmentos que foram processados de acordo com LUNA (1968) e submetidos às avaliações histopatológicas.

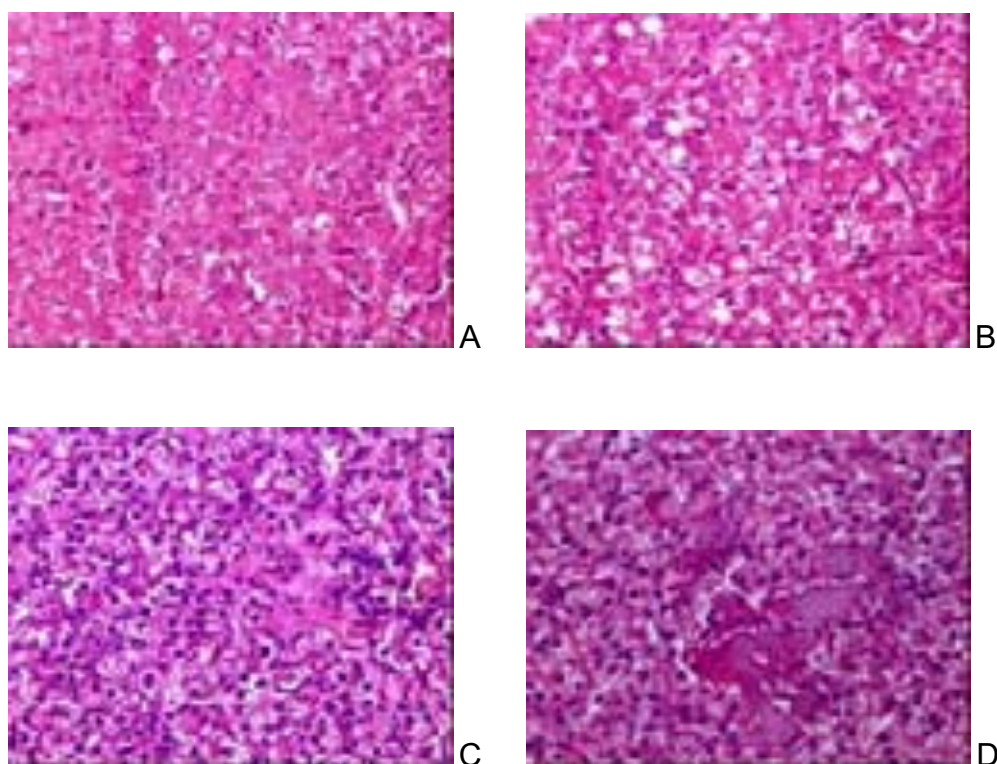


FIGURA 1: A- Necrose hepatocitária difusa; B- Degeneração macrovacuolar hepatocitária; C- Necrose massiva de hepatócitos; D- Granuloma por *Salmonella*.

Nas avaliações histopatológicas do fígado, aos 14 dias (Figura 1), do grupo inoculado experimentalmente somente com *S. Typhimurium* observou-se hepatócitos entumescidos em 60% (3/5), necrose difusa dos hepatócitos em 20% (1/5) e moderada degeneração microvacuolar com focos de necrose em 40% (2/5); aos 28 dias de idade, observaram moderada e difusa degeneração hialina de hepatócitos em 20% (1/5) e necrose difusa de hepatócitos em 80% (4/5). Estes

resultados provavelmente refletem a patogênese de bactérias do gênero *Salmonella*, entretanto foram diferentes dos obtidos por BARCELOS et al. (2006) que ao analisar fígados infectados com esse patógeno não observaram lesões microscópicas indicativas de infecção por *Salmonella* sp..

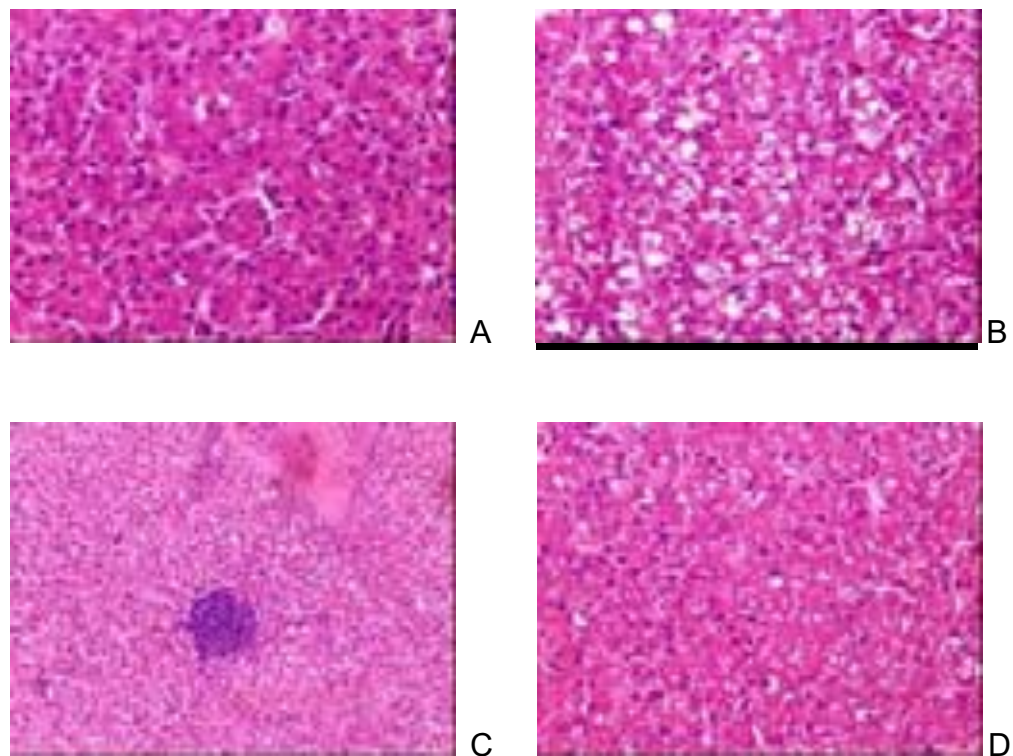


FIGURA 2: A- Dilatação dos sinusóides; B- Degeneração macrovacuolar hepatocitária; C- Infiltrado linfocitário; D- Necrose dos hepatócitos.

Os grupos inoculados experimentalmente com *S. Typhimurium* e lactulose aos 14 dias de idade (Figura 2) apresentaram achados histopatológicos semelhantes, independentemente do período de inoculação do patógeno ou da administração da lactulose. Os achados incluíram discreta dilatação de sinusóides em 33,3% (5/15), necrose difusa dos hepatócitos em 53,3% (8/15) e degeneração microvacuolar hepatocitária em 40% (6/15); aos 28 dias (Figura 2) identificou-se as mesmas alterações dos 14 dias, incluindo múltiplos focos de infiltrados linfocitários em 100% (15/15) e necrose difusa de hepatócitos em 66,6% (10/15). Observa-se que a inflamação linfocítica permaneceu como seqüela da infecção,

embora esta alteração não seja específica HOERR (1996) relatou que a infecção por *Salmonella* no fígado, assemelha-se a outras infecções bacterianas agudas, mas com zonas de necroses multifocais a coalescentes dos hepatócitos acompanhadas por infiltração linfocítica. Esses achados foram parcialmente semelhantes aos observados por (FERREIRA et al., 1990).

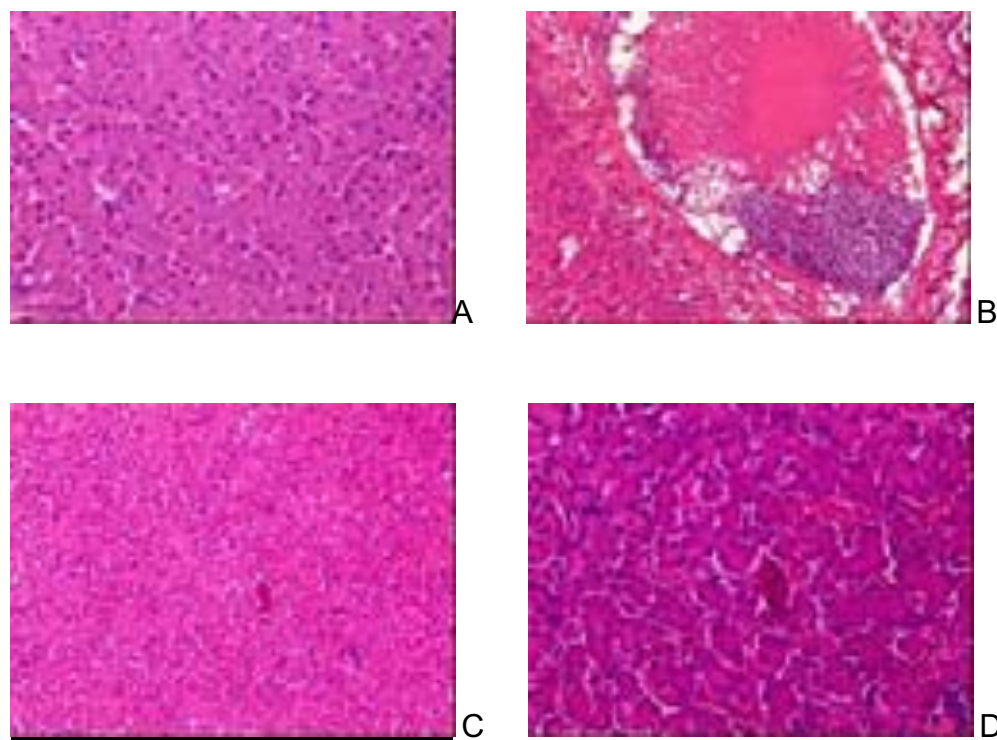


FIGURA 3: A- Degeneração microvacuolar dos hepatócitos; B- presença de êmbolo linfocitário na artéria hepática; C; D- Evidenciação de sinusóides (20X e 40X).

Na análise histopatológica do fígado do grupo controle que recebeu apenas a lactulose por 14 dias (Figura 3), identificou-se discreta dilatação de sinusóides em 40% (2/5), discreta degeneração microvacuolar hepatocitária em 40% (2/5). Já aos 28 dias de idade (Figura 3), evidenciou-se discreta dilatação dos sinusóides hepáticos em 40% (2/5). A alteração descrita como dilatação de sinusóides hepáticos, foi comum às amostras de todos os tratamentos que receberam a lactulose com ou sem o patógeno. Por isso, pode-se inferir que a lactulose promoveu discreta alteração nos sinusóides hepáticos e mesmo após a sua retirada a alteração permaneceu. Essas alterações são compatíveis com um quadro de discreta congestão (HOERR, 1996), entretanto parece ser uma lesão

inespecífica e conforme relataram RANDALL & REECE (1996) o fígado usualmente é selecionado para análise histopatológica, por ser um dos órgãos mais importantes para verificar alterações celulares, entretanto muitas lesões não são específicas.

Assim como os achados histopatológicos, a bioquímica sérica também foi utilizada para avaliar os efeitos sistêmicos da lactulose nas aves (Tabela 3).

TABELA 4- Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT), de frangos de corte recebendo lactulose e/ou *Salmonella* Typhimurium aos 14, 28 e 35 dias de vida.

<b>Tratamentos</b>	<b>AST (U/L)</b>	<b>ALT (U/L)</b>
<b>14 dias de idade</b>		
Placebo	272,71	22,14
Controle positivo (ST)	346,71	13,71
Controle lactulose (L)	324,43	21,85
ST (1ºd) e L (1ºd)	278,43	11,57
L (1ºd) e ST (48h)	342,29	16,71
ST (1ºd) e L (48h)	356,57	8,57
C. V. (%)	45,74	61,98
P	0,8270	0,0720
<b>28 dias de idade</b>		
Placebo	281,57	8,57
Controle positivo (ST)	379,71	8,57
Controle lactulose (L)	360,14	6,42
ST (1ºd) e L (1ºd)	307,29	8,00
L (1ºd) e ST (48h)	282,43	8,57
ST (1ºd) e L (48h)	256,14	6,00
C. V. (%)	31,44	42,95
P	0,1520	0,5030
<b>35 dias de idade</b>		
Placebo	245,43	7,42
Controle positivo (ST)	294,71	6,71
Controle lactulose (L)	280,14	8,57
ST (1ºd) e L (1ºd)	278,86	10,00
L (1ºd) e ST (48h)	369,43	11,85
ST (1ºd) e L (48h)	251,71	7,57
C. V. (%)	28,26	72,66
P	0,0850	0,6600

A; B - médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Aos 14, 28 e 35 dias de idade, não houve diferença ( $P>0,05$ ) para as avaliações das enzimas hepáticas em todos tratamentos realizados. Essas variáveis bioquímicas têm sido usadas como auxiliares do diagnóstico de enfermidades nos animais domésticos, no entanto o diagnóstico das doenças hepáticas em aves, segundo LUMEIJ & WESTERHOF (1987), não é uma prática muito simples, pois nem sempre se observa a correlação entre alterações dos níveis séricos de enzimas hepáticas e a patologia do fígado.

KANEKO (1989) relatou que a elevação dos níveis sérico-enzimáticos atribuída à disfunção hepática pode ser decorrente da ruptura dos hepatócitos, resultantes de necrose, ou das alterações na permeabilidade da membrana celular (ALT, AST e LDH) ou do processo de colestase. Como o citoplasma do hepatócito é rico em alanina aminotransferase (ALT) (MEYER, et al. 1992; KRAMER & HOFFMANN, 1997) uma injúria à membrana por toxina ou mesmo pela hipóxia pode resultar num aumento da ALT sérica. Por outro lado, altos níveis de ALT no tecido hepático e plasmático das aves não são comuns na doença hepatocelular (FUDGE, 2000). Este autor afirmou que um fígado severamente afetado, como na fibrose ou lipidose, pode produzir pouco extravasamento hepatocelular, resultando em níveis normais ou, em alguns casos, diminuídos de AST.

Talvez, por isso, sejam escassos os estudos experimentais com estas variáveis, e na literatura consultada trabalhos sobre os níveis de referência dessas variáveis em aves foram poucos elucidativos.

## **CONCLUSÕES**

A lactulose foi capaz de impedir a infecção sistêmica enquanto estava sendo fornecida, tendo mostrado melhor efeito preventivo; e ainda determinou discreta lesão hepática.

**REFERÊNCIAS**

1. BAILEY, J. S. Integrated colonization control of *Salmonella* in poultry. **Poultry Science**, v.67, p.928-932, 1988.
2. BARCELOS, A. S.; FLÔRES, M. L.; KOMMERS, G. D.; NASCIMENTO, V. P. SEGABINAZI, S. D. Macroscopia, histopatologia e bacteriologia de fígados de frangos (*Gallus gallus*) condenados no abate. **Ciência Rural**, v.36, n.2, 2006.
3. BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J. P.; GROSS, W. B. Colibacillosis. In: SAIF, Y. M. **Diseases of Poultry**, 11 ed., Ames, Iowa: Iowa States Press, p.631-656, 2003.
4. BARROW, P. A. The paratyphoid salmonellae. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 19, n. 2, p. 351-375, 2000.
5. BEAL, R. K.; WIGLEY, P.; POWERS, C.; HULME, S. D. BARROW, P. A.; SMITH, A. L. Age at primary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and subsequent immunity to re-challenge. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.100, p. 151-164, 2004.
6. BERCHIERI JR., A. Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JR., A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, p.185-195, 2000.
7. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 70**. Programa de Redução de Patógenos (PRP), v. 1, Brasília, 2003, 168 p.
8. BRENNER F. W, VILLAR RG, ANGULO FJ, TAUXE R & SWAMINATHAN B. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2465–2467, 2000.
9. COLLETT, S. Nutrição, imunidade e produtividade. In: Ronda Latino-Americana - O Futuro da Alimentação. **Palestras...** Brasil: Alltech, p.20-30, 2000.
10. DELAZARI, I. Abate e processamento de carne de aves para garantia da qualidade. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Campinas, **Anais...** Campinas: FACTA, p. 191-203, 2001.
11. DESMIDT, M.; DUCALETTE, R.; HAESEBROUCK, F. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis phage types four after experimental infection of young chickens. **Veterinary Microbiology**, v. 56, p. 99-109, 1998.
12. FERNÁNDEZ, A.; LARA, C.; LOSTE, A.; CALVO, S.; MARCA, M.C. Control of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 experimental infection by fosfomycin in newly hatched chicks. **Comparative Immunology, Microbiology & Infections Disease**, v. 24, p. 207-216, 2001.

13. FERREIRA, A. J. P.; ITO, N. M.; BENEZ, S. M.; NOTONHA, A. M.B. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, 1990, Campinas. **Anais...**, Campinas: FACTA, 1990, p.171.
14. FERREIRA, C. L. L. F. 1998. Produtos lácteos probióticos: uma realidade. **Revista Leite Derivados**, v.42, p. 66-70, 1998.
15. FRANCO, B. D. G, LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Editora Atheneu, cap. 4, p. 33-81, 1996.
16. FUDGE, A.M. Avian liver and gastrointestinal testing. In: FUDGE, A.M. **Laboratory medicine - avian and exotic pets**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, p.35-55, 2000.
17. GEORGIA POULTRY LABORATORY. **Monitoring and detection of Salmonella in poultry and poultry environments**. Oakwood: Georgia Poultry Laboratory, 1997. 293p. [Workshop]
18. GORHAM, S.L.; KADAVIL, K.; VAUGAHAN, E.; LAMBERT, H.; PERT, B.; ABEL, J. Gross and microscopic lesions in young chickens experimentally with *Salmonella* Enteritidis. **Avian Diseases**, v.38, p.816-821, 1991.
19. HOERR, F. J. Liver. In: RIDDELL, C. **Avian Histopathology**. Pennsylvania: Library of congress, p. 143-166, 1996.
20. HOLZ, P. H.; MIDDLETON, D. R. Prospective Study. **Medical Surgery**, v. 15, n. 1, p. 4-6, 2005.
21. KANEKO, J.J. Clinical biochemistry of domestic animals. 4. ed. San Diego: Academic, 1989. 932p.
22. KRAMER, J.W.; HOFFMANN, W.E. Clinical enzymology. In: KANEKO, J.J. et al. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5 ed. London: Academic Press, p.303-325, 1997.
23. LANA, G. R. Q.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T. A.; LANA, A. M. Q. Efeito da Temperatura Ambiente e da Restrição Alimentar sobre o Desempenho e a Composição da Carcaça de Frangos de Corte. **Revista Brasileira de zootecnia**, v. 29, p.1117-1123, 2000.
24. LEITÃO, M. F. F. Qualidade e segurança alimentar em produtos avícolas. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Campinas, **Anais...** Campinas: FACTA, p. 181-190, 2001.
25. LUMEIJ, J.T.; WESTERHOF, Blood chemistry for the diagnosis of hepatobiliary disease in birds. A review. *Veterinary Q.*, v.9, p.255-61, 1997.
26. LUNA, L. G. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3ed. New York: McGraw-Hill, 1968, 258p.

- 27.
28. McINTOSH, G.H. Probiotics and colon cancer prevention. **Asia Pacif Journal Clinical Nutrition**, Oxfordshire, v. 5, n. 1, p. 48-52, 1996.
29. MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L, J. Medicina de laboratório veterinário: interpretação e diagnóstico. São Paulo: Roca, 1995. 308 p.
30. NURMI, E.; RANTALA, M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. **Nature**, v.241, p.210-211, 1973.
31. RANDALL, C.J.; REECE, R.L. **Color atlas of avian histopathology**. Turin: Mosby-Wolfe, 1996. 232p.
32. REZENDE, C. S. M. **Ácidos Orgânicos em Rações experimentalmente contaminadas com *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium**. Goiânia, 2006. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Sanidade Animal). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. 94 p.
33. REZENDE, C. S. M. **Ocorrência de *Salmonella* em lotes de frangos de corte de agroindústrias goianas: identificação bacteriológica e perfil de sensibilidade a antimicrobianos**. Goiânia, 2002, 73 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Sanidade Animal). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.
34. ROSTAGNO, H. S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos; composição de alimentos e exigências nutricionais**. Viçosa: UFV, Departamento de Zootecnia, 2000. 221p.
35. SALYERS, A. A. Agricultural use of antibiotics and antibiotic resistance in human pathogens. ALLTECH. S ANNUAL SYMPOSIUM, Nottingham. **Proceedings...** Nottingham: Alltech, p.155-171, 1999.
36. SAS Institute. SAS<sup>®</sup> (Statistical Analysis System). User's Guide: Statistics. Cary, NC: SAS Institute INC; 2000.
37. SCHUMANN, Clinical Medical and technological propertie of lactulose. An Update. **European Journal of Nutrition**, v. 41, Suppl. 1, p. 117-125, 2002.
38. TESSARI, E.N.C.; CARDOSO, A.L.S.P.; CASTRO A.G.M.; ZANATTA, G.F.; KANASHIRO, A.M.I. Incidência de *Salmonella* sp. em pintos de corte recém-nascidos. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 3, p. 279-281, 2003.

## CAPÍTULO 5- CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle e a prevenção sanitária são requisitos fundamentais para garantir à avicultura brasileira o mercado internacional para seus produtos. A presença de bactérias, como a *Salmonella Typhimurium* em produtos de origem animal pode representar barreira sanitária ao comércio de produtos avícolas. Embora sua ocorrência tenha diminuído nos últimos anos, é ainda um dos patógenos bacterianos mais comuns, em doenças transmitidas por alimentos de origem avícola para os seres humanos.

Um dos grandes interesses na área de saúde pública é a existência de bactérias que colonizam os animais domésticos e que são resistentes a antimicrobianos. A utilização incorreta de antibióticos na medicina humana, o seu uso na alimentação animal com objetivos terapêuticos, profiláticos e de promoção de crescimento, são tidos como responsáveis pela presença da resistência aos antibióticos em bactérias patogênicas para o homem. Por sua vez, estas bactérias resistentes podem ser transferidas de animais para seres humanos, especialmente nos indivíduos que trabalham diretamente com animais ou em indústrias de processamento tecnológico de produtos de origem animal.

Tendo em vista as questões sanitárias e comerciais, cientistas e indústrias buscam por procedimentos alternativos aos antibióticos promotores de crescimento, cuja ação proporcione melhor desempenho das aves, com atenção à redução e/ou eliminação de salmoneloses na microbiota intestinal. Assim sendo, a lactulose foi estudada na tentativa de controlar estas bactérias, buscando melhoria nutricional e sanitária dos plantéis avícolas.

A partir do experimento realizado, constatou-se que a lactulose melhorou a saúde intestinal, assim como a sistêmica e verificou-se melhor desempenho zootécnico das aves, redução e eliminação bacteriana, embora não tenha impedido posterior infecção, e ainda, apresentou melhor efeito preventivo, que curativo.

O produto utilizado em medicina humana como alimento funcional, não está disponível no mercado como aditivo para alimentação de animais. Isto posto, justifica-se a dificuldade de sua manipulação, pela sua ausência no mercado para esta espécie animal.

Outro aspecto a ser considerado, que foi observado no decorrer do experimento e que contraria a definição de prebióticos foi que esse medicamento não interferiu no pH cecal. Portanto é importante o desenvolvimento de estudos empregando outras concentrações de lactulose, bem como, outras formas de apresentação, vias de administração e tempos de fornecimento do produto. Isto permitirá melhor avaliação quanto à ação bacteriostática, bactericida.

Ainda, o estudo desta substância como aditivo em ração é outra possibilidade a ser considerada; assim como a sua associação com outros produtos prebióticos ou probióticos.

Entretanto, não se pode excluir a importância de ações conjuntas e medidas efetivas de um programa preventivo consistente para a avicultura, pois práticas de biossegurança devem ser aliadas a programas de manejo das aves, contribuindo para obtenção de criações mais saudáveis e conseqüentemente, alimentos mais seguros, o que atenderia aos interesses e necessidades econômicas e sanitárias, resguardando a saúde animal e humana e reduzindo as perdas econômicas, considerando que o Brasil está entre um dos maiores exportadores de carne de frango do mundo.