

HISTOPATOLOGIA DA MUCOSA INTESTINAL DE PINTOS TRATADOS COM *Lactobacillus* spp. E DESAFIADAS COM *Salmonella enterica*, SUBESPÉCIE *enterica*, SOROTIPO Enteritidis

ADRIANO SAKAI OKAMOTO,¹ RAPHAEL LUCIO ANDREATTI FILHO,² EDNA TERESA LIMA¹ E JOSÉ CHARL NOUJAIM¹

1. Pós-graduando, Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista. E-mail: sakai@fmvz.unesp.br

2. Docente do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista

RESUMO

Neste trabalho foram verificadas alterações histopatológicas na mucosa intestinal de pintos, causadas pelo desafio com *Salmonella* Enteritidis logo após um tratamento com *Lactobacillus* spp. no primeiro dia de vida. Duzentos e oitenta e oito pintos foram divididos em seis grupos de 48 cada (A, B, C, D, E e F), recebendo tratamento ou não, em diferentes momentos de desafio. Estatisticamente foram realizadas análises de regressão linear e quadrática para as medidas da altura das vilosidades. Reduzido comprimento das vilosidades intestinais (< 86,80% no primeiro desafio

e < 88,56% no segundo desafio) e acentuadas lesões histopatológicas acentuadas (edema, congestão e necrose), sempre foram observados após os desafios com *S. Enteritidis*, recuperando-se, posteriormente, independente do tratamento com *Lactobacillus* spp. Pouca ação benéfica dos *Lactobacillus* spp. diante dos desafios com *Salmonella* Enteritidis pode ser observada, porém a capacidade de regeneração das vilosidades intestinais após os desafios com *Salmonella* Enteritidis, independente do tratamento, está claramente definida.

PALAVRAS-CHAVES: Frangos de corte, lesões histopatológicas, probiótico, vilosidades.

ABSTRACT

HISTOPATHOLOGY OF THE INTESTINAL MUCOSA OF CHICK TREATED WITH *Lactobacillus* spp. AND CHALLENGED WITH *Salmonella enterica*, SUBSPECIE *Enterica*, SOROVAR Enteritidis

In this work alterations were checked histopathological in the intestinal mucous membrane of chicks, caused by the challenge with *Salmonella* Enteritidis soon after a treatment with *Lactobacillus* spp. in first day of life. Two hundred and eighty-eight chicks were divided into six groups of 48 each (A, B, C, D, E and F), receiving treatment or not, at different moments of challenge. Statistically there were carried out analyses of linear and quadratic regression for the measures of the height of the villi. The lesions presented in the villi were necrosis, edema and congestion. The reduced

length of intestinal villi (< 86.80% in the first challenge and < 88.56% in the second challenge) and the accentuated histopathological lesions (edema, congestion and necrosis), always observed after challenges with *S. Enteritidis*, subsequently recuperated independent of treatment with *Lactobacillus* spp. Little beneficial action of *Lactobacillus* spp. faced with *Salmonella* Enteritidis challenges could be observed, despite clearly defined regenerative capacity of intestinal villi after challenge with *Salmonella* Enteritidis independent of treatment.

KEY WORDS: Histopathology lesions, poultry, probiotic, villus.

INTRODUÇÃO

A *Salmonella* spp. é um dos mais importantes patógenos veiculados por alimentos, porque está amplamente distribuída na natureza. Possui um grande número de reservatórios, como as aves silvestres, e também porque apresenta sorotipos inespecíficos quanto ao hospedeiro e cepas multirresistentes aos antimicrobianos (BERSOT, 2006). GAST (1997) afirmou que a grande incidência de intoxicação alimentar em humanos se deve à ingestão de produtos de origem aviária contaminados e/ou indevidamente preparados. Segundo o próprio GAST (1997), as informações sobre a ocorrência e a distribuição dos sorotipos de salmonelas na população de animais silvestres e domésticos são essenciais para relacionar os possíveis reservatórios que possam ser responsáveis pela transmissão desse agente.

A presença de salmonela em amostras de carne, armazenadas a 0°C e -18°C por noventa dias, indica que essas bactérias sobrevivem a períodos longos de armazenamento, mesmo sob baixas temperaturas (FORTUNA & FRANCO, 2005).

Dentre as infecções alimentares, a salmonelose é a de maior ocorrência no Brasil e no mundo (FRANCISCO et al., 2007; MEHRABIAN & JABERI, 2007), sendo, por sua vez, uma doença autolimitada, apresentando cólicas abdominais, vômito, febre e diarreia em humanos, mas particularmente nas crianças e idosos pode se tornar grave (SAMUEL et al., 2007).

Durante a infecção sistêmica, a *Salmonella* spp. interage com macrófagos e fagócitos polimorfonucleares, sendo a habilidade para se multiplicar dentro dessas células um pré-requisito para virulência (MASTROENI et al., 1995). Embora aves adultas sejam relativamente resistentes à multiplicação sistêmica, ocorre a colonização do trato digestório na ausência da doença. Independente da presença de manifestações clínicas, os sorotipos relacionados com o paratifo aviário estão associados a casos de infecção alimentar no homem (BARROW, 1999).

Microbiota normal são aqueles microrganismos que se encontram habitualmente na superfície das mucosas sadias dos tratos gastrointestinal e

genital (BARBÉS, 2001). O efeito protetor da microbiota intestinal contra a colonização por patógenos é conhecido há muitos anos e tem sido amplamente aceito (PARRA, 1994). Os mecanismos através dos quais os probióticos reduzem as bactérias patogênicas seriam a produção de substâncias bactericidas, competição por nutrientes e sítios de ligação, alteração do metabolismo microbiano, estimulação do sistema imunológico local e sistêmico a partir da capacidade de adesão à mucosa intestinal e a modificação da atividade metabólica do trato intestinal (BARBÉS, 2001). Muitos trabalhos vêm sendo realizados com a finalidade de verificar os efeitos do tratamento com probióticos, apresentando, em muitos casos, benefícios com o uso deles.

Nos últimos anos, a utilização de probióticos na indústria alimentícia, em especial aqueles contendo *Lactobacillus*, vem crescendo muito. O objetivo deste trabalho foi verificar possíveis alterações histopatológicas da mucosa intestinal de pintos tratados com *Lactobacillus* spp. e desafiadas com *Salmonella* Enteritidis, mensurando o comprimento das vilosidades e lesões histopatológicas da porção proximal do duodeno.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se 288 pintos de corte com um dia de idade de linhagem comercial, sem qualquer tipo de tratamento. Estes foram alojados em gaiolas de arame, em isolamento e aquecidos, recebendo água e ração não medicada *ad libitum*, divididas em seis grupos de 48 aves cada, conforme Tabela 1.

Foram utilizadas amostras de *Lactobacillus acidophilus*, *L. fermentum*, *L. reuteri* e *L. salivarius*, isoladas de ingluvío e cecos de matrizes pesadas de linhagem comercial em produção através de cultivo anaeróbio em meio de cultura DeMan-Rugosa-Sharpe (MRS), específico para *Lactobacillus*. Identificaram-se as amostras através do teste de hidróxido de potássio, coloração pelo método de Gram, produção de catalase, formação de gás a partir da glicose e teste de fermentação de carboidratos utilizando o API 50 CH[®]. Todas as amostras de *Lactobacillus* foram

cultivadas separadamente em tubos contendo caldo MRS, a 37°C por 48 horas em anaerobiose. Posteriormente, 1mL de caldo MRS cultivado foi retirado de cada tubo e misturado com os demais, formando o inóculo na concentração de 2×10^9 UFC/mL. Utilizou-se amostra de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis fagotipo 4, isolada de fígado de matrizes pesadas, sorotipada pelo Instituto Adolfo Lutz em São Paulo-SP, mutante resistente ao ácido nalidíxico (Nal) e rifampicina (Rif).

Os inóculos, em todos os experimentos, foram constituídos de culturas da amostra de *S. Enteritidis* em caldo infusão de cérebro e coação (BHI) incubados a 40°C por doze horas. Administraram-se os inóculos mediante depósito direto no esôfago/inglúvio com o auxílio de pipeta graduada de 1,0mL na quantidade de 0,5mL/pinto no terceiro ($1,5 \times 10^8$ UFC/ave) e no 21º dia de vida ($1,6 \times 10^7$ UFC/ave).

Determinaram-se as concentrações dos inóculos por meio do plaqueamento das diluições seriadas em solução salina fosfatada tamponada (PBS) dos cultivos de *Lactobacillus* spp. e *Salmonella* Enteritidis.

Nos momentos de 14, 21, 28 e 35 dias de idade, oito pintos de cada grupo foram eutanasiados por deslocamento cervical, necropsiados de forma asséptica e retirada a porção proximal do duodeno para exame histopatológico e medição das vilosidades. Amostras individuais de aproximadamente um centímetro de comprimento da porção proximal do duodeno foram coletadas, abertas pela margem mesentérica, estendidas pela túnica serosa e fixadas em solução de Bouin durante dezoito horas. Posteriormente, foram recortadas e lavadas em álcool etílico 70% e desidratadas em série crescente de álcool etílico. Após desidratação, foram diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Em cada lâmina histológica, colocou-se segmento do duodeno de cada pinto, com seis cortes semisseriados com 5µm de espessura, sendo que entre cada corte foram desprezados seis cortes (JUNQUEIRA et al., 2002).

Nos cortes corados segundo a técnica da hematoxilina – eosina (HE) procedeu-se a cinco medidas do comprimento das vilosidades de cada

corde, totalizando trinta medidas por lâmina (pinto). A análise morfométrica do intestino delgado foi realizada em sistema analisador de imagens (ZEISS) contendo o programa KS-300, através de microscopia de luz, em aumento de cinquenta vezes.

TABELA 1. Unidades formadoras de colônia (UFC) no tratamento com *Lactobacillus* spp. e desafio com *S. Enteritidis* em cada grupo experimental

Grupo	Tratamento com <i>Lactobacillus</i> spp		Desafio com <i>S. Enteritidis</i>
	1*	3	21
A	$2,0 \times 10^9$ **	$3,0 \times 10^8$	$3,3 \times 10^7$
B	$2,0 \times 10^9$	--	--
C	$2,0 \times 10^9$	--	$3,3 \times 10^7$
D	$2,0 \times 10^9$	$3,0 \times 10^8$	--
E	--	--	$3,3 \times 10^7$
F	--	$3,0 \times 10^8$	--

* Idade das aves (dias).

** UFC/mL.

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada por intermédio do programa Statistical Analyses System-SAS (SAS, 1988), procedendo-se a análises de regressão linear e quadrática para as medidas da altura das vilosidades.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve mortalidade nas aves infectadas por *S. Enteritidis* neste experimento, concordando com observações realizadas por SURESH et al. (2006), em que as salmonelas paratifoides geralmente apresentam quadro clínico autolimitante com reversão espontânea em 48 horas. A exceção foi para pintos imunocomprometidos ou em condições de estresse (GAST, 1997).

Foram medidas trinta vilosidades em cada pinto, totalizando 240 medidas em cada tratamento/momento, obtendo-se a média do comprimento/ave (Tabela 2). Todos os grupos experimentais demonstraram médias crescentes da medida de vilosidade intestinal no decorrer dos momentos, devido ao desenvolvimento dos pintos.

TABELA 2. Medida das vilosidades do duodeno (μm) de aves tratadas com *Lactobacillus* spp. e desafiadas com *S. Enteritidis*. Médias das vilosidades em cada tratamento e momento de coleta

Tratamento	Momento (dias)			
	14	21	28	35
A	822,9* A b**	1136,5 B b	1246,9 C c	1487,4 D c
B	761,2 A b	802,4 A a	1271,7 B c	1556,1 C d
C	1035,3 A d	1110,9 B b	1214,9 C b	1405,9 D b
D	1016,1 A d	1136,3 B b	1407,0 C d	1565,9 D d
E	700,9 A a	807,4 B a	1100,5 C a	1320,3 D a
F	947,7 A c	1146,7 B b	1422,7 C d	1571,3 D d

* Média aritmética de oito repetições da média de trinta medidas de vilosidade/ave para cada tratamento/momento. Médias seguidas de pelo menos uma letra igual não diferem significativamente ($P>0,05$).

** Letras minúsculas comparam médias de tratamentos em cada momento (coluna) e letras maiúsculas comparam médias de momentos em cada tratamento (linha).

No primeiro momento (14 dias), os grupos que foram desafiados com *S. Enteritidis* apresentaram médias significativamente menores que os outros grupos e, dentre estes, o grupo que não recebeu tratamento com *Lactobacillus* spp. apresentou a menor média. Os grupos somente tratados com *Lactobacillus* spp. apresentaram médias significativamente maiores que os demais grupos. As medidas das vilosidades duodenais apresentaram-se menores nos grupos desafiados no terceiro dia e mensurados no 14º dia, por causa, principalmente, das lesões determinadas pela *S. Enteritidis*.

No segundo momento (21 dias), os grupos B (tratado com *Lactobacillus* spp. e desafiado com *S. Enteritidis* no terceiro dia) e E (somente desafiado com *S. Enteritidis*) apresentaram médias significativamente menores que os demais.

Os grupos que não foram desafiados com *S. Enteritidis* (grupos D e F) apresentaram as maiores vilosidades duodenais no terceiro momento (28 dias), enquanto o grupo somente desafiado (grupo E) apresentou a menor média entre todos os grupos experimentais. Já com 35 dias de idade (quarto momento), os grupos B (tratado com *Lactobacillus* spp. e desafiado com *S. Enteritidis* no terceiro dia de idade), D (somente tratado) e F (sem tratamento ou desafio) apresentaram as maiores vilosidades intestinais quando comparados com os demais grupos. Nesse mesmo momento, o grupo E (somente

desafiado) apresentou as médias das vilosidades intestinais significativamente menores entre os demais grupos, e os grupos que não receberam o segundo desafio (21 dias) apresentaram vilosidades maiores do que as observadas nos grupos desafiados, mostrando que o desafio recente com *S. Enteritidis*, além de determinar lesão à vilosidade, também diminui o seu comprimento.

Ficou demonstrado que, com o passar do tempo, a vilosidade se restabelece, voltando ao tamanho normal, o que pode ser observado no grupo B, que recebeu apenas o primeiro desafio e, após 32 dias deste, recuperou o seu comprimento, mostrando-se semelhante aos grupos que não receberam desafio.

Essa regeneração das vilosidades após algum tempo do desafio demonstra a característica autolimitante da salmonelose paratífica, seguida por uma eliminação do agente.

Não foi observada diferença na medida de vilosidades entre os grupos tratados com *Lactobacillus* spp. e não desafiados com o grupo sem tratamento e sem desafio, demonstrando que a adição dessas bactérias à ração não afeta o tamanho da vilosidade, conseqüentemente a superfície de absorção do nutrientes. Segundo KALAVATHY et al. (2003), essas bactérias podem proporcionar um aumento do ganho de peso e melhorar a conversão alimentar dos animais suplementados.

O exame histopatológico de pintos tratadas com *Lactobacillus* spp. e desafiadas com *S. Enteritidis* em cada tratamento/momento de coleta está apresentado na Tabela 3.

TABELA 3. Exame histopatológico do duodeno de aves tratadas com *Lactobacillus* spp. e desafiadas com *S. Enteritidis* em cada tratamento e momento de coleta. Somatória das lesões observadas em oito repetições

Tratamento	Momento (dias)			
	14	21	28	35
A	Necrose moderada Edema moderado Congestão	Necrose acentuada Edema acentuado Congestão	Edema moderado Congestão	Congestão
B	Necrose leve Edema moderado	Necrose moderada Edema acentuado Congestão	Edema leve Congestão	SLA*
C	SLA	SLA	Necrose acentuada Edema acentuado	Necrose leve Edema
D	Edema moderado Congestão	Edema leve Congestão	SLA	SLA
E	Necrose moderada Edema moderado Congestão	Necrose leve Edema moderado Congestão	Edema leve Congestão	SLA
F	SLA	SLA	SLA	SLA

* Sem lesão aparente

As lesões nos grupos desafiados apresentaram intensidade decrescente com o decorrer da idade dos pintos e concomitante com a regeneração das vilosidades intestinais. Esta observação também foi verificada por ANDREATTI FILHO et al. (2000), demonstrando a capacidade de recuperação por parte da ave às lesões causadas pela *Salmonella* spp. (paratifoide) no decorrer da idade.

O grupo C (tratado e desafiado no 21º dia), até o segundo momento (21 dias), e o grupo F (não tratado e não desafiado), em todos os momentos, não apresentaram lesão aparente, devido à ausência de desafio. Em relação ao grupo apenas tratado com *Lactobacillus* spp. (grupo D), também se observaram lesões, porém sem muita severidade e desaparecendo rapidamente. Já o grupo que recebeu tratamento e os dois desafios com *S. Enteritidis* (grupo A) apresentou as lesões mais acentuadas.

O efeito benéfico dos *Lactobacillus* spp. com ação probiótica frente à colonização bacte-

riana já foi anteriormente comprovado (MAASSEN et al., 2000). Porém, neste trabalho, não foi observado esse efeito em alguns grupos. Diversas variáveis existentes nos protocolos experimentais empregados, como tempo de cultivo, número de passagens no meio de cultura, espécies de bactérias utilizadas, via de administração, sorotipo de *Salmonella* desafio, dose infectante, entre outras, podem ter concorrido para os resultados obtidos.

CONCLUSÕES

No presente experimento, foi observada pouca ação dos *Lactobacillus* spp., contra a *Salmonella* Enteritidis, e a capacidade de regeneração das vilosidades intestinais após o desafio foi verificada independente do tratamento.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro

para realização deste projeto e ao incentivo à pesquisa.

ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Este experimento se encontra de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp de Botucatu, protocolado sob o número 66/2002-CEEA.

REFERÊNCIAS

- ANDREATTI FILHO, R.L.; SILVA, E. N.; RIBEIRO, A. R.; KONDO, N.; CURI, P. R. Use of anaerobic cecal microflora, lactose and acetic acid for the protection of broiler chicks against experimental infection with *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis, **Brazilian Journal Microbiology**, v. 31, p. 107-112, 2000.
- BARBÉS, M. C. Microbiota and gastrointestinal system. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, Madrid, v. 93, p. 325-327, 2001.
- BARROW, P. A. *Salmonella* em avicultura: problemas e novas idéias sobre possibilidades de controle. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 1, p. 9-16, 1999.
- BERSOT, L. C. *Salmonella* no Brasil: sua importância no abate de aves. In: SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA DA UFMS, 5., 2006, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFMS, p. 90-94, 2006.
- FORTUNA, J. L; FRANCO, R. M. Pequeno dossiê epidemiológico da *Salmonella*, como causadora de infecções alimentares. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n. 128, p. 33-44, 2005.
- FRANCISCO, D. C.; NASCIMENTO, V. P.; LOGUER-CIO, A.P.; CAMARGO, L. Caracterização do consumidor de carne de frango em Porto Alegre. **Ciência Rural**, v. 37, n.1, p. 253-258, 2007.
- GAST, R. K. Paratyphoid Infections. In: CALNEK, B. W. (Ed.), **Diseases of poultry**. 10. ed. Ames: Iowa State University, 1997. p. 81-121.
- JUNQUEIRA, O. M.; SILZ, L. Z. T.; LIMA, F. R.; MORETTI, A. D.; ARAÚJO, L. F. **Substituição da proteína do leite em pó desnatado pelo isolado protéico de soja sobre características morfométricas intestinais de leitões no período de 21 a 35 dias de idade**. 2002. Jaboticabal. Disponível em: <http://www.sian.info.br/porcinos/publicaciones/viencuent/mack.htm>. Acesso em: 21 maio 2002.
- KALAVATHY, R.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S.; HO, Y. W. Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 44, n. 1, p. 139-144, 2003.
- MAASSEN, C. B. M.; van HOLTEN-NEELEN, C.; BALK, F.; den BAK-GLASHOUWER, M. J.; LEER, R. J.; LAMAN, J. D.; BOERSMA, W. J.; CLAASSEN, E. Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strain. **Vaccine**, v. 18, p. 2613-2623, 2000.
- MASTROENI, P.; SKEPPER, J. N.; HORMAECHE, C. E. Effect of anti-tumor necrosis factor alpha antibodies on histopathology of primary *Salmonella* infections. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 3674-3682, 1995.
- MEHRABIAN, S.; JABERI, E. Isolation, identification and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from meat products in Tehran. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 11, p. 122-126, 2007.
- PARRA, F. E. Exclusion competitiva in Salmonellosis: revisão. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PATOLOGIA AVIAR, 1994, Athenas. **Anais...** Athenas, 1994. p. 433-469.
- SAMUEL, C. M.; VUGIA, D.J.; KOEHLER, K.M.; MARCUS, R.; DENNEN, V.; DAMASKE, B.; SHIFERAW, B.; HADLER, J.; HENAO, O.L.; ANGULO, F.J. Consumption of risky foods among adults at high risk for severe foodborne diseases: room for improved targeted prevention messages. **Journal of Food Safety**; v. 27, p. 219-232, 2007.
- SAS – STATISTICAL ANALYSES SYSTEM. **Language guide for personal computer**. Cary: 1988. p. 603.
- SURESH, T.; HATHA, A. A. M.; SCREENIVASA, D. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis and other salmonellas in the eggs and egg-storing trays from retail markets of Coimbatore, south India. **Food Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 294-299, 2006.