



EFEITO DA LACTULOSE NA SAÚDE SISTÊMICA DE AVES INOCULADAS EXPERIMENTALMENTE COM *Salmonella Typhimurium*

Eliete Souza Santana¹; Maria Auxiliadora Andrade²; Tatiane Martins Rocha³; Ana Caroline de Souza Barnabé⁴; Fábio Henrique de Oliveira⁵

¹ Docente Universidade Estadual de Goiás, Palmeiras de Goiás, GO
(elietessouza@yahoo.com.br);

² Docente Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO;

³ Médica Veterinária Serviço Oficial- Agrodefesa, Goiânia, GO;

⁴ Doutoranda em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP;

⁵ Doutorando em Ciência Animal da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO

Recebido em: 12/04/2014 – Aprovado em: 27/05/2014 – Publicado em: 01/07/2014

RESUMO

O presente trabalho avaliou os efeitos sistêmicos da lactulose em aves experimentalmente inoculadas com *Salmonella Typhimurium*. 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. Os tratamentos consistiram respectivamente: 1- controle (placebo); 2- recebeu somente a lactulose (L); 3- inoculado somente com *S. Typhimurium* (ST); 4- inoculado com a lactulose e a *S. Typhimurium* no 1º dia de vida [L(1º)+ST(1º)]; 5- recebeu a lactulose e 48h depois a *S. Typhimurium* [L(1º)+ST(4h)]; 6- inoculado com *S. Typhimurium* e 48h depois com a lactulose [ST(1º)+L(48h)]. 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 do fígado sendo, que nos dias 14 e 28 realizaram-se análises histopatológicas de fígado e bioquímica sérica. Os dados paramétricos foram analisados aplicando ANOVA e Tukey (5%) e os dados não paramétricos pelo teste do qui-quadrado. 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 é capaz de impedir a infecção sistêmica tendo mostrado melhor efeito preventivo; e ainda determina discretas alterações hepáticas.

PALAVRAS-CHAVE: bioquímica sérica, biometria, histopatologia hepática, prebiótico.

EFFECT OF LACTULOSE ON THE SYSTEMIC HEALTH OF BROILERS EXPERIMENTALLY INOCULATED WITH *Salmonella Typhimurium*

ABSTRACT

This study evaluated the systemic effects of lactulose in broilers inoculated with *Salmonella Typhimurium*. Broilers were allotted in a completely randomized design, with 630 day-old male chicks distributed in six treatments, with seven replications and 15 broilers each. The treatments were respectively: 1 - control (placebo), 2 - received only lactulose (L), 3 - only inoculated with *S. Typhimurium* (ST) 4 - inoculated with lactulose and

S. Typhimurium on day 1 of life [L (1) + ST (1)], 5 - received lactulose and 48h after the S. Typhimurium [L (1) + ST (4h)], 6 - inoculated with S. Typhimurium and 48 hours later with lactulose [ST (1) + L (48h)]. On day seven, 14, 21 and 28 of age, one broiler per treatment was autopsied and their organs collected and analyzed for bacteriology and biometric liver and that in 14 and 28 were performed pathological examinations of liver and serum biochemistry. Parametric data were analyzed by applying ANOVA and Tukey (5%) and by nonparametric chi-square. It was found that the lactulose prevented infection in the early period of life for broilers, showing a better effect when administered 48 hours before the pathogen inoculation. It was noted also that there was an increase of relative liver weight and mild changes in liver by *Salmonella* Typhimurium in all ages. It can be concluded that lactulose is able to prevent systemic infection and have shown better effect; and still provides discrete liver.

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

INTRODUÇÃO

A questão da segurança alimentar constitui um problema atual e relevante, que preocupa as autoridades sanitárias e os consumidores (ANVISA, 2014). Assim, programas de monitoria e estratégias de controle de patógenos que podem ser veiculados pela carne de frango devem ser estabelecidos nos períodos de pré e pós abate de frangos para se obter um produto de qualidade.

Dentre esses patógenos que podem ser veiculados pela carne, estão sorovares do gênero *Salmonella*, as quais compõem o grupo mais complexo das *Enterobacteriaceae*, com 2.610 sorovares descritos (BARROW et al., 2010; GUIBOURDENCHE et al., 2010; CDC, 2011), considerados importantes em saúde pública por ser uma das principais causas de doenças gastrointestinais em seres humanos em todo o mundo, como resultado principalmente do consumo de carne de aves e ovos contaminados (DESIN et al., 2011) e pode constituir-se ainda em barreira sanitária para o comércio de aves e dos seus produtos (SANTOS et al., 2012).

Entre os principais sorovares, se destaca o Typhimurium que causa gastroenterites, usualmente benignas e auto-limitadas, mas que podem causar surtos e óbitos, principalmente, naqueles indivíduos que desenvolvem a forma sistêmica (KOTTWITZ et al., 2010; DAWOUD et al., 2011).

Os antibióticos promotores de crescimento foram utilizados na produção animal desde décadas e conseguiam melhorar os índices produtivos ao controlar a microbiota entérica (SAKITA, 2014). Porém, seu uso foi proibido a partir de janeiro de 2006 na Europa, devido à possibilidade de geração de resistências a patógenos e consequências negativas à saúde, ao bem-estar animal e à segurança alimentar (GAGGIA et al., 2010; YAN et al., 2011).

Porém, a simples retirada dos antibióticos promotores de crescimento da dieta das aves leva à diminuição média no desempenho de 3% a 7%, além do impacto negativo na saúde animal e no aumento da mortalidade. Desse modo, há necessidade de se introduzirem estratégias novas a fim de contornar tais efeitos. A abordagem nutricional amplamente utilizada é o uso de novos aditivos alimentares que são eficazes na melhoria do desempenho das aves, provavelmente pela modulação da microbiota no trato intestinal (LANGHOUT, 2005; LORENZONI, 2010).

Com o banimento dos antimicrobianos promotores de crescimentos da dieta das aves, produtos alternativos capazes de manter o equilíbrio da microbiota benéfica sem causar prejuízos à saúde do trato gastrintestinal e sem alterar os parâmetros zootécnicos revelam-se de importância e devem ser pesquisados.

Atualmente, compostos vêm sendo utilizados como alternativa aos promotores de crescimento para manter o equilíbrio da microbiota intestinal, especialmente em animais jovens ou em iminente condição de estresse. Entre eles, está a descoberta da década de 50 de que o leite humano possui compostos que atuam como inibidores de adesão de bactérias patogênicas na superfície epitelial (posteriormente identificado como lactulose) e potencializam o crescimento das populações de Bifidobacterias e Lactobacillus, aliviando os sintomas de encefalopatia hepática em bebês (NICOLI & VIEIRA, 2000; WAITZBERG, 2009).

A lactulose, dissacarídeo não digestível, tem sido utilizada na medicina humana há mais 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. Outras experiências sugerem que a lactulose pode ser útil em doenças idiopáticas, bem como em doenças inflamatórias infecciosas do intestino. A lactulose é usada no Japão e nos Estados Unidos em alimentos funcionais e como suplemento nutricional (HOLZ & MIDDLETON, 2005; SANTANA et al., 2012).

A lactulose atua bloqueando os sítios de adesão de bactérias, o que resulta em melhoria na imunidade e permite que os patógenos sejam apresentados às células imunes como antígenos atenuados, podendo assim, substituir o uso de antibióticos não recomendados pelos principais países importadores (AARESTRUP et al., 2010; YAN et al., 2011). Segundo HOLZ & MIDDLETON (2005), a lactulose constitui-se ainda, em uma droga segura e eficaz contra tumores (principalmente no cólon intestinal), com ações antimicrobianas, hipolipidêmica e hipoglicêmica.

Em estudos realizados com a lactulose em animais domésticos, o efeito laxativo e a eliminação de *Salmonella* foram demonstrados como os resultados observados em suínos por KAMPHUES et al. (2003). Quando a lactose, isômero da lactulose, foi adicionada à dieta de perus juntamente com probiótico, estimulou o ganho de peso (TORRES-RODRIGUEZ et al., 2007) e, em perus desafiados com *Salmonella* sp., conseguiu reduzir os níveis de infecção (VICENTE et al., 2007).

Tendo em vista, a exigência de mercado consumidor e com o intuito de que esta substância seja recomendada como aditivo na alimentação animal, a presente pesquisa foi realizada, com o objetivo de avaliar os efeitos sistêmicos da lactulose em frangos de corte, inoculados experimentalmente, via ingluvívio com *Salmonella* Typhimurium.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e manejo experimental

As aves foram alojadas no Núcleo Experimental de Doenças de Aves da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, que possui isolamentos apropriados para inoculações experimentais com patógenos

O protocolo experimental utilizado neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG, sob o nº 103/09, e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

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, num total de 42 unidades experimentais, conforme o delineamento a seguir:

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 ingluvío 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 (ST);

Tratamento 3: constituiu o grupo que recebeu água adicionada com lactulose, na dosagem dose de 0,023 mL/g de peso vivo do primeiro aos 14 dias de vida de alojamento (L);

Tratamento 4: constituiu o grupo inoculado diretamente no ingluvío 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(1⁰) +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 *Salmonella* Typhimurium [(L(1⁰) +ST(48h)];

Tratamento 6: constituiu o grupo inoculado 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 *Salmonella* Typhimurium e que recebeu a lactulose na água, em dose de 0,023 mL/g de peso vivo do primeiro até aos 14 dias [(ST(1⁰) +L(1⁰)).

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*.

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. Para os tratamentos 1, 2 e 3, foram necropsiados cinco animais por idade avaliada, enquanto, para os demais tratamentos, 4, 5 e 6, foram necropsiados sete animais. 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).

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. Para avaliação da função hepática das aves, nos dias 14 e 28 de idade, foram retirados cerca de dois a três mL de sangue, para obtenção de soros e 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 (2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

TABELA 1. Frequência de isolamento de *Salmonella* Typhimurium (ST) de conteúdo de ingluvío, ceco, baço, fígado e coração de frangos de corte que receberam lactulose (L) na água aos sete, 14, 21 e 28 dias de idade

Tratamentos	Inglúvio	Ceco	Fig+Cor	Baço	Total
7 dias de idade					
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 (1td)	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 (1td) + ST (48h)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/28(0%)
Total	4/26(15,4%)	7/26(26,9%)	4/26(15,4%)	4/26(15,4%)	19/144(0,13%)
14 dias de idade					
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 (1td)	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 (1td) + ST (48h)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/28(0%)
Total	0/26(0%)	5/26(19,2%)	6/26(23,0%)	7/26(26,9%)	18/144(0,12%)
21 dias de idade					
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 (1td)	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 (1td) + ST (48h)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/28(0%)
Total	3/26(11,5%)	6/26(23,0%)	3/26(11,5%)	7/26(26,9%)	19/144(0,13%)
28 dias de idade					
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 (1td)	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 (1td) + ST (48h)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/7(0%)	0/28(0%)
Total	2/26(7,6%)	4/26(15,4%)	4/26(15,4%)	3/26(11,5%)	13/144(0,09%)

Observa-se, na Tabela 1, que ocorreu um declínio da frequência relativa à recuperação da bactéria com o avançar da idade no grupo controle positivo (ST) 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. Isso sugere que os mecanismos naturais do organismo tentaram eliminar a *Salmonella*. 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. Segundo BEAL et al. (2014) o mecanismo de resistência idade-dependente, imunidade idade-dependente, está correlacionado ao desenvolvimento natural do sistema imune com a idade e do estabelecimento da microbiota intestinal.

Outros fatores que podem ainda estar envolvidos na patogênese da salmonelose aviária são determinados pela habilidade da bactéria em colonizar o trato gastrointestinal, que parece estar relacionada com a imunidade inata da espécie hospedeira e com a diversidade de genes de virulência codificados pelo patógeno, pelas condições ambientais, grau de exposição, presença de infecções concomitantes (FLORES et al., 2008) e, ainda pela via de inoculação, o tipo de sorovar e a dose do inóculo (MARCQ et al., 2011; SANTANA et al., 2012).

Nas aves inoculadas com *Salmonella* Typhimurium no primeiro dia de vida e que receberam lactulose simultaneamente [ST (1° d) + L (1° d)], o reisolamento da *Salmonella* ocorreu a partir de 14 e até 28 dias o patógeno se manteve num percentual de 10,7 a 17,8%. Esses dados indicam que a lactulose impediu a colonização da bactéria somente na primeira semana. Após esse período sua ação foi reduzida, pois ocorreu a reinfecção dos animais provavelmente, pela via orofecal, que pode ser atribuída ao protocolo experimental, considerando que os animais contaminados foram alojados no mesmo ambiente e que a dose da lactulose foi ajustada para promover efeito discretamente laxante com o objetivo de impedir a colonização da bactéria.

No grupo em que inoculou a *Salmonella* Typhimurium e administrou a lactulose 48 horas após [ST (1° d) + L (48h)] as taxas de recuperação bacteriana apresentaram uma frequência de 10,7% (3/28) e 7,1% (2/28) nos dias 21 e 28 do experimento, respectivamente (Tabela 1). Nota-se que o produto usado atuou, enquanto fornecido e teve uma ação mais discreta até 28 dias de tratamento, já que registrou-se uma baixa frequência de recuperação bacteriana,

Observa-se (Tabela 1), que houve melhor proteção contra a *Salmonella* nos pintos que receberam a lactulose 48 horas antes de serem desafiados. Estes resultados comprovam que a lactulose apresentou efeitos preventivos, promovendo um trânsito mais rápido do conteúdo o, que impediu a aderência do patógeno à mucosa epitelial e conseqüentemente a sua invasão e colonização.

Os grupos que receberam a lactulose e o inóculo bacteriano 48 horas depois [L (1° d) + ST (48h)], apresentaram uma frequência de positividade maior que o grupo que recebeu inicialmente o inóculo bacteriano e a lactulose 48 horas depois [ST (1° d) + L (48h)]. A menor presença de *Salmonella* nos tratamentos em que utilizou a lactulose preventivamente pode ser explicada pelos princípios dos compostos com ações prebióticas, os quais se ligam 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 resulta na ativação dos macrófagos e liberação de citocinas, ativando a resposta imune adquirida.

Outro aspecto que foi evidenciado neste estudo foi a capacidade de invasão da *Salmonella*. Verificou-se que ocorreu uma diminuição na recuperação da bactéria nos *pools* de fígado e coração e nos baços no decorrer do experimento (Tabela 1). Já nas aves que receberam o inóculo no ingluvío e a lactulose na água no primeiro dia de vida [ST (1° d) + L (1° d)], observou 0/28 (0%), 4/28 (14,2%); 3/28 (10,7%) e 3/28 (10,7%) aos sete, 14, 21 e 28 dias, respectivamente. Esses achados indicam

que a lactulose não apresentou efeito sistêmico, pois após a invasão da bactéria, ela permaneceu 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 consistiram, basicamente, na presença de excretas mais liquefeitas que em determinadas situações causaram tamponamento de cloaca. Estes dados confirmam parcialmente as afirmações de BARROW (2010), 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.

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	1,9
Controle positivo (ST)	105	3	2,85
Controle lactulose (L)	105	2	1,9
ST (1ºd) e L (1ºd)	105	1	0,95
L (1ºd) e ST (48h)	105	1	0,95
ST (1ºd) e L (48h)	105	1	0,95
Total	630	10(10/630)	9,50%(10/630)

*Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de qui-quadrado ($P < 0,05$)

Acrescenta-se ainda que durante o período experimental, o índice de mortalidade total foi de 9/630 (9,50%), sendo que o grupo inoculado com *S. Typhimurium* apresentou 3/105 (2,85%) não mostrando diferenças significativas entre os demais tratamentos. Estas observações evidenciam que *Salmonella* Typhimurium e a lactulose nas doses administradas não determinaram mortalidade e que os óbitos ocorreram de forma aleatória e natural dentro da população. Por outro lado o estado de portador assintomático se manteve nos tratamentos (ST), ST (1ºd) + L (1ºd) ST (1ºd) + L (48h) até os 28 dias.

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	16,872	16,8876
P	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

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

Os maiores pesos relativos do fígado foram registrados nos grupos que receberam a inoculação bacteriana, com ou sem a lactulose. Este aumento do peso pode ser resultante do processo infeccioso desencadeado pela *Salmonella* e mesmo pela ação da lactulose. Pois, o fígado tem a função metabólica extremamente importante de regular a concentração no sangue de metabólitos, particularmente carboidratos e aminoácidos, além de ser fisiologicamente responsável por neutralizar diferentes substâncias tóxicas, inclusive as produzidas por 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.

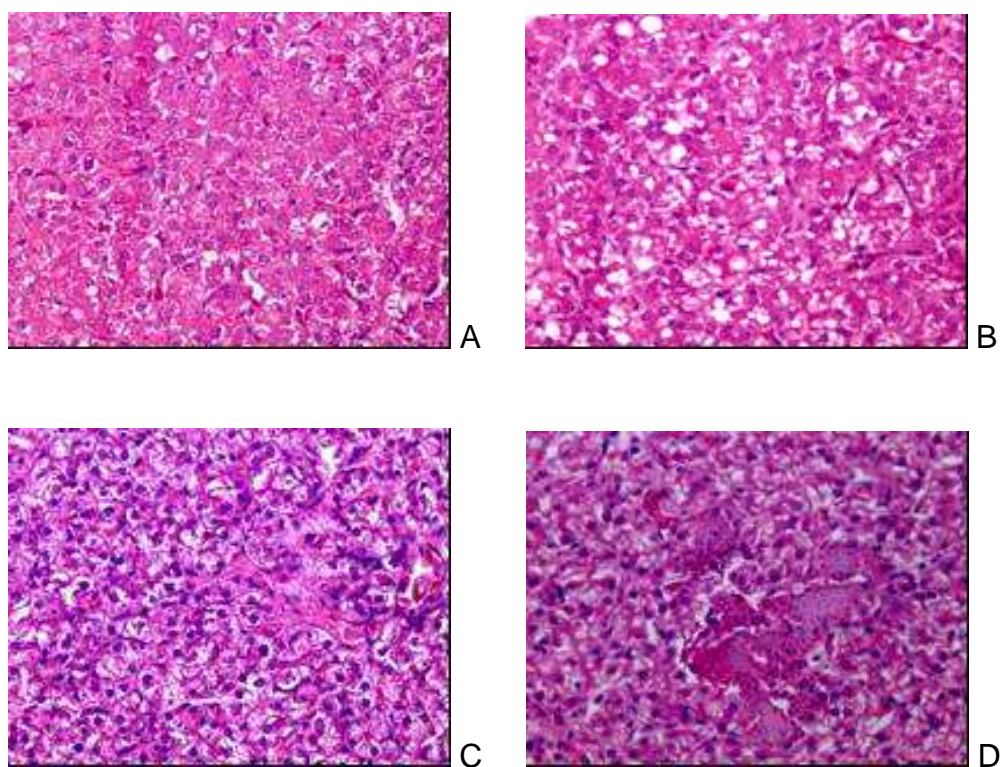


FIGURA 1- A: Necrose hepatocitária difusa; B: Degeneração macrovacuolar hepatocitária; C: Necrose massiva de hepatócitos; D: Granuloma por *Salmonella*.

Nas avaliações histopatológicas do fígado aos 14 dias, do grupo inoculado experimentalmente somente com *Salmonella* Typhimurium (ST), observaram-se hepatócitos intumescidos 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). Estas alterações refletem provavelmente os efeitos da bactéria, entretanto foram diferentes dos resultados obtidos por BARCELOS et al. (2006), que ao analisar fígados infectados com esse patógeno, não observaram lesões microscópicas indicativas de infecção por *Salmonella* sp..

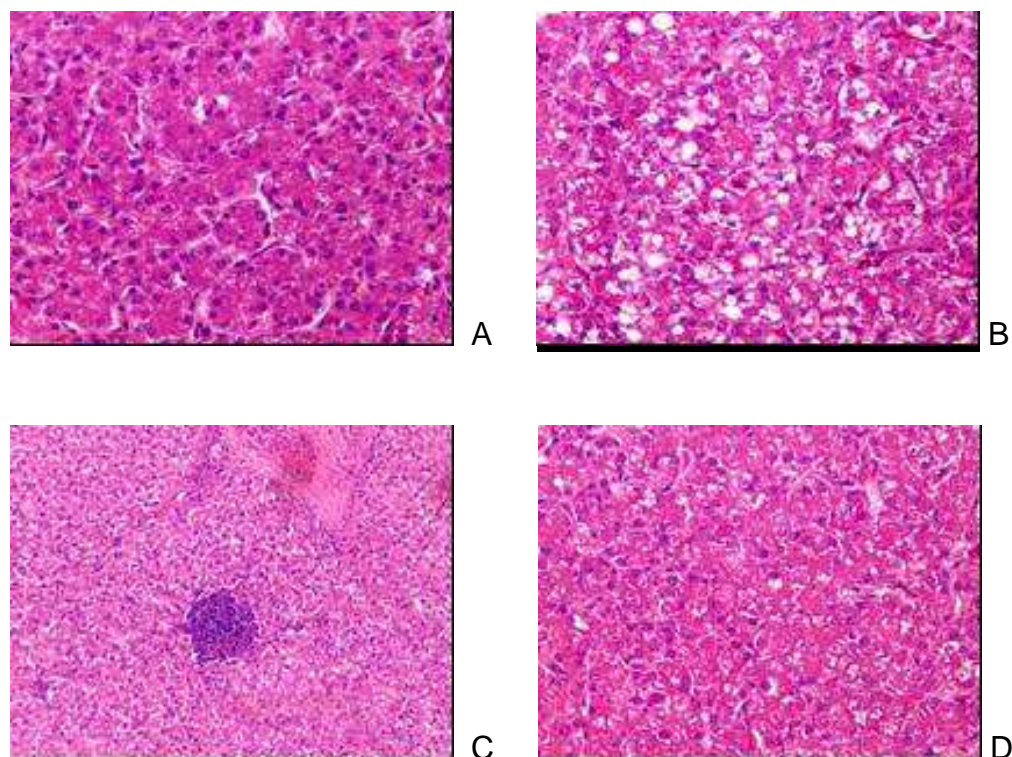


FIGURA 2- A: Dilatação dos sinusóides; B: Degeneração macrovacuolar hepatocitária; C: Infiltrado linfocitário; D: Necrose dos hepatócitos.

Os grupos inoculados com *Salmonella* Typhimurium e lactulose, independentes do momento de inoculação e fornecimento da lactulose, apresentaram aos 14 dias de idade, alterações histopatológicas semelhantes. 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, 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). Esses resultados indicam a ocorrência de uma reação inflamatória, com infiltrados linfocitários e necrose, as quais se assemelham a outras infecções bacterianas agudas. Esses achados foram parcialmente semelhantes aos observados por HOERR (1996), o qual relatou que a infecção por *Salmonella* no fígado se manifesta com zonas de necroses multifocais dos hepatócitos acompanhadas por infiltração linfocítica.

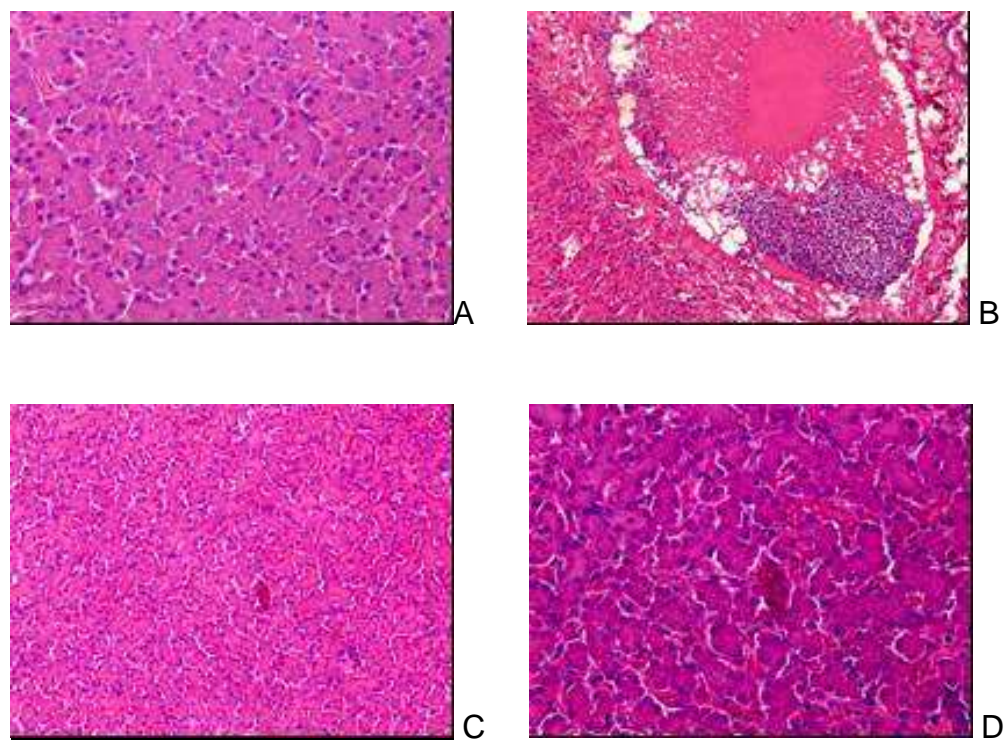


FIGURA 3- A: Degeneração microvacuolar dos hepatócitos; B: presença de êmbolo linfocitário na artéria hepática; C; D: Evidenciação de sinusóides (20X e 40X).

Na análise histopatológica do fígado que recebeu apenas a lactulose (L), identificou-se em 40% (2/5) das amostras, discreta dilatação de sinusóides e degeneração microvacuolar hepatocitária. A dilatação dos sinusóides hepáticos, observada em 40% (2/5) das amostras, foi um achado comum às amostras de todos os tratamentos que receberam a lactulose com ou sem o patógeno, mesmo após a sua retirada. Por isso, pode-se inferir que a lactulose promoveu discreta alteração nos sinusóides hepáticos, que são compatíveis com um quadro de discreta congestão (AGUIAR et al., 2011) sem uma indicação patológica específica. Segundo RANDALL & REECE (1996), as mais importantes alterações celulares de metabólicos tóxicos ocorrem no fígado, daí ter sido o órgão de eleição para realizar a histopatologia.

Assim como os achados histopatológicos, a bioquímica sérica também foi utilizada para avaliar os efeitos sistêmicos da lactulose nas aves (Tabela 4).

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

Tratamentos	AST (U/L)	ALT (U/L)
	14 dias de idade	
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
28 dias de idade		
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

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

Aos 14 e 28 de idade, não houve diferença ($P > 0,05$) para as avaliações das enzimas hepáticas nos diferentes tratamentos. Essas variáveis bioquímicas têm sido usadas, como auxiliares do diagnóstico de enfermidades nos animais domésticos, no entanto, para o diagnóstico das afecções hepáticas em aves, segundo LUMEIJ & WESTERHOF (1987), não é um procedimento adequado, pois nem sempre se tem a correlação entre as alterações dos níveis séricos de enzimas hepáticas e as patologias 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) 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.

CONCLUSÃO

A lactulose, enquanto fornecida na dieta, é capaz de impedir a infecção sistêmica por *Salmonella* Typhimurium, mostrando melhor efeito se administrada preventivamente, embora determine discreta lesão hepática.

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M.; JENSEN, V. F.; EMBORG, H.; JACOBSEN, E.; WEGENER, H. C. Changes in the use of antimicrobials and the effects on productivity of swine farms in Denmark. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 71, n. 7, 2010.

AGUIAR, L. R. F.; NASSIF, P. A. N.; RIBAS, C. A. P. M.; CZECZKO, N. G.; RIBAS, M. M.; MARINHO JÚNIOR, C. H.; WENDLER, E. Regeneração do fígado após hepatectomia parcial em ratos submetidos à hipertensão portal pós-hepática. ABCD, **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 24, n. 2, São Paulo, 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-67202011000200011. Acessado em 10/05/2014.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de alimentos e vigilância sanitária. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/guia_alimentos_vigilancia_sanitaria.pdf. Acessado em 01/05/2014.

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.

BARROW, P. A.; JONES, M.A.; THOMSON, N. Salmonella. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, G.; THOEN, C.O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4 ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. Cap. 14, p. 231-257.

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, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 70**. Programa de Redução de Patógenos (PRP), v. 1, Brasília, 2003, 168 p.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Salmonella serotype Enteritidis**, general information, MMWR, United States, 2011. Disponível em: www.cdc.gov. Acesso em: 07 de abril de 2014.

DAWOUD, T. M.; HERERRA, P.; HANNING, I.; KWON, Y. M.; RICKE, S. C. In vitro invasion of laying hen ovarian follicles by *Salmonella* Enteritidis strains. **Poultry Science**, Champaign, v. 90, p. 1134-1137, 2011.

DESIN, T. S.; WISNER, A. L.S.; LAM, P.S.; BERBEROV, E.; MICKAEL, C. S.; POTTER, A. A.; KOSTER, W. Evaluation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis pathogenicity island-1 proteins as vaccine candidates against *S. Enteritidis*

challenge in chickens. *Veterinary Microbiology*, Miyazaki, v. 148, p. 298-307, 2011.

FERNÁNDEZ, A.; LARA, C.; LOSTE, A.; CALVO, S.; MARCA, M.C. Control of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 experimental infection by fosfomicin in newly hatched chicks. **Comparative Immunology, Microbiology & Infections Disease**, v. 24, p. 207-216, 2001.

FLORES, G. R.; CASAS, F. C.; LÓPEZ, J. A. Q.; PELÁEZ, C. C.; BRAVO, O. U. Patogenia de *Salmonella* Enteritidis FT 13a y *Salmonella* Enteritidis biovar Issatschenko en pollos de engorda. **Veterinária México**, México, v. 39, n. 2, p. 145-160, 2008.

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.

GAGGIA, F.; MATTARELLI, P. Y.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 141, p. 15-28, 2010.

GEORGIA POULTRY LABORATORY. **Monitoring and detection of *Salmonella* in poultry and poultry environment *Salmonella*** Oakwood: Georgia Poultry Laboratory, 1997. 293p. [Workshop]

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEMUHL, J.; GRIMONT, P.A.; WEILL, F. X. Supplement 2003–2007 to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, Paris, n. 47, v. 161, p. 26–29, 2010.

HOLZ, P.H.; MIDDLETON, D.R. Prospective Study. **Medical Surgery**, v. 15, n. 1, p. 4-6, 2005.

KAMPHUES, J.; TABELING, R.; STUKE, O. Possible interesting dietetic effects of lactulose as a feed additive in pig feed. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, Hannover, v. 110, n. 9, p. 365-368, 2003.

KANEKO, J.J. Clinical biochemistry of domestic animals. 4. ed. San Diego: Academic, 1989. 932p.

KOTTWITZ, L. B. M.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; ALCOCER, I.; FARAH, S. M. S. S.; ABRAHÃO, W. S. M.; RODRIGUES, D. P. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum. Health Sciences*, Maringá, v. 32, n. 1, p. 9-15, 2010.

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 TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005, Santos, 2005. **Anais...**, Santos: FACTA. p. 21, 2005.

LORENZONI, G. Salmonellosis. IN: LORENZONI, G. **Poultry diseases influenced by gastrointestinal health**. Thrumpton, Ed. Nottingham, seção IV, p.73-78, 2010.

LUMEIJ, J.T.; WESTERHOF, Blood chemistry for the diagnosis of hepatobiliary disease in birds. A review. **Veterinary Questions and Answers**, v. 9, p. 255-61, 1997.

LUNA, L.G. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3ed. New York: McGraw-Hill, 1968, 258p.

MARCQ, C.; COX, E.; SZALO, I. M.; THÉWIS, A.; BECKERS, Y. *Salmonella* Typhimurium oral challenge model in mature broilers: Bacteriological, immunological, and growth performance aspects. **Poultry Science**, Champaign, n. 90, p. 59-67, 2011.

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.

RANDALL, C.J.; REECE, R.L. **Color atlas of avian histopathology**. Turin: Mosby-Wolfe, 1996. 232p.

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.

SAKITA, G. Z. **Efeito de mananoligossacarídeos sobre parâmetros zootécnicos e histomorfométricos duodenais de ratos wistar**. Presidente Prudente, 2014, 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade do Oeste Paulista.

SANTANA, E. S.; ANDRADE, M. A.; ROCHA, T. M.; STRINGHINI, J. H.; CAFÉ, M. B.; PORTO, R. N. G.; BARNABÉ, A. C. S.; ALCÂNTARA, J.B. Influência da lactulose no desempenho zootécnico e na taxa de reisolamento fecal em frangos de corte experimentalmente inoculados com *Salmonella* Typhimurium. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 8, p. 1884-1889, 2012.

SANTOS, I. I., CORÇÃO, G.; KESSLER, A. M. DE.; LARANJEIRA, V. S. DOS.; LIMA, M. S.; Microbiota ileal de frangos de corte submetidos a diferentes dietas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 41, n. 3, p. 643-647, 2012.

SAS Institute. SAS (Statistical Analysis System). User's Guide: Statistics. Cary, NC: SAS Institute INC; 2009.

SCHUMANN, Clinical Medical and technological propertie of lactulose. An Update. **European Journal of Nutrition**, v. 41, Suppl. 1, p. 117-125, 2002.

TORRES-RODRIGUEZ, S. E.; HIGGINS, J. L. S.; WOLFWNDWN, A. D.; GAONA-RAMIREZ, G.; BARTON, J. T.; TELLEZ, G.; DONOGHUE, A. M.; HARGIS, B. M. Efeito da Lactose como um Prebiótico no peso corporal de perus sob condições comerciais. **Journal of Applied Poultry Research**, Champaign, v. 16, p. 635-641, 2007.

VICENTE, J.; WOLFENDEN, A.; TORRES-RODRIGUEZ, A.; HIGGINS, S.; TELLEZ, G.; HARGIS, B. Effect of a *Lactobacillus* Species-Based Probiotic and Dietary Lactose Prebiotic on Turkey Poultry Performance With or Without *Salmonella* Enteritidis Challenge. **Journal of Applied Poultry Research**, Champaign, v. 16, p. 361-364, 2007.

WAITZBERG, D. L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, v. 2, 2009. 2489 p.

YAN, G. L.; GUO, Y. M.; YUAN, J. M.; LIU, D.; ZHANG, B. K. Sodium alginate oligosaccharides from brown algae inhibit *Salmonella* Enteritidis colonization in broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 90, p. 1441-1448, 2011.