

UFRRJ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

TESE

**Controle de *Campylobacter* sp.em Frangos de Corte
pelo Uso de Probióticos e Simbióticos como Alternativa
aos Antibióticos**

Gabriela Viana da Silva

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**CONTROLE DE *Campylobacter* sp. EM FRANGOS DE CORTE
PELO USO DE PROBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS COMO
ALTERNATIVA AOS ANTIBIÓTICOS**

GABRIELA VIANA DA SILVA

Sob a Orientação da Professora

Rosa Helena Luchese

e Co-Orientação

Douglas McIntosh

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ
Dezembro de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S581c Silva, Gabriela Viana da, 1986-
Controle de Campylobacter sp.em Frangos de Corte
pelo Uso de Probióticos e Simbióticos como Alternativa
aos Antibióticos / Gabriela Viana da Silva. - 2017.
76 f.: il.

Orientadora: Rosa Helena Luchese.
Coorientador: Douglas McIntosh.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Ciência e Tecnologia de Alimentos,
2017.

1. Campylobacter. 2. Probióticos. 3. Frangos de
Corte. I. Luchese, Rosa Helena , 1957-, orient. II.
McIntosh, Douglas, 1964-, coorient. III Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Ciência e Tecnologia
de Alimentos. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

GABRIELA VIANA DA SILVA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Ciência de Alimentos.

TESE APROVADA EM: 12/12/2017.

Ph.D. Rosa Helena Luchese UFRRJ
Orientadora

D.Sc. Marcos Fábio de Lima- IFRJ

D.Sc. Janine Passos Lima da Silva – CTAA/EMBRAPA

D.Sc. Ligia Fatima Lima Calixto- UFRRJ

Ph.D. José Francisco Martins- UFRRJ

DEDICATÓRIA

Antes de tudo dedico a Deus por ter me dado essa oportunidade, toda honra e toda glória seja dada a Ele.

Ao meu marido Alexandre e a minha filha Mariana pelo amor incondicional, companheirismo, apoio e por serem o meu refúgio.

Aos meus pais Gabriel Henrique e Maria José pela educação que eu tive, a qual me proporcionou chegar até este momento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Rosa Helena Luchese e ao meu co-orientador Douglas McIntosh, por terem me aceitado orientar, me dando, um voto de confiança e a oportunidade de progredir na carreira acadêmica.

Agradeço a todos os professores que passaram na minha vida acadêmica até aqui, cada um contribui de uma maneira especial para a minha formação.

Agradeço à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) por fazer parte da minha vida.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio à pesquisa e pela bolsa de estudos.

Agradeço à Coordenação do Curso de Pós-Graduação por toda a presteza ao longo desses anos de curso.

Agradeço à Sheila Duque, Wagner Tadeu e toda equipe do laboratório de Campylobacter da Fundação Osvaldo Cruz pelo conhecimento transferido e pela disponibilidade em sanar as minhas dúvidas.

Agradeço ao Marcos Fábio de Lima por viabilizar o experimento de campo e por todo conhecimento passado sobre avicultura.

Agradeço à toda equipe do LAAB em especial Edlene, Roberto e Ivan por todo suporte para que este trabalho pudesse ser desenvolvido.

Agradeço ao Noédson Machado pelo auxílio na execução da estatística.

RESUMO

SILVA, Gabriela Viana. **Controle de *Campylobacter* sp. em Frangos de Corte pelo Uso de Probióticos e Simbióticos como Alternativa aos Antibióticos.** 2017. 67p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Bactérias do gênero *Campylobacter* são reconhecidas como causa comum de gastroenterite em humanos em todo o mundo, ultrapassando a salmonelose. Os produtos de origem animal, especialmente os avícolas, são considerados o principal veículo de campylobacteriose em humanos. Com a proibição do uso de antibióticos como melhoradores de crescimento na alimentação animal em diversos países devido a possível indução de resistência bacteriana, e a pressão dos consumidores por produtos de qualidade tem-se buscado alternativas para sua substituição. Como alternativa ao uso de antibióticos a utilização de probióticos, prebióticos e simbióticos tem sido bastante enfatizada na alimentação animal. Esta pesquisa objetivou avaliar o efeito dos probióticos, simbióticos e antibióticos no controle da colonização de *Campylobacter* spp. e nos índices de desempenho (ganho de peso, conversão alimentar e consumo de ração, além do rendimento de carcaça e de cortes) em frangos de corte. Foram utilizados 720 pintos fêmeas de um dia de idade da linhagem Cobb, criados numa densidade populacional de 10 aves/m² por 42 dias de idade, em um delineamento inteiramente casualizado, composto por 4 tratamentos: controle (sem aditivos), antibiótico, probiótico e simbiótico e 6 repetições. Ao final dos 42 dias de vida foram coletados swabs cloacais para detecção e identificação de *Campylobacter* spp. utilizando métodos convencionais de cultivo e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Não houve influência significativa dos tratamentos para nenhum dos parâmetros avaliados aos 7 dias de idade das aves. Aos 21 dias de idade o consumo de ração foi significativamente menor no grupo controle. Aos 42 dias houve diferença estatística nos parâmetros peso corporal e ganho de peso, tendo os grupos tratados com simbiótico e probiótico os menores valores respectivamente. O rendimento da carcaça, dos cortes e das vísceras não foi afetado pelos tratamentos. A colonização por *Campylobacter* spp. não foi afetada por nenhum dos tratamentos. Foram identificadas apenas duas espécies, com predominância de *C. coli* (60%) contra 40% de *C. jejuni*. Houve correlação de 100% entre as espécies identificadas pela metodologia convencional de cultivo e pela análise direta no PCR. Nas condições do experimento a utilização de probióticos e simbióticos resultou no controle da colonização de *Campylobacter* spp. comparáveis aos antibióticos. Adicionalmente o desempenho zootécnico também não foi prejudicado pela utilização dos aditivos.

Palavras-chave: aditivos; avicultura; desempenho.

ABSTRACT

SILVA, Gabriela Viana. **Control of *Campylobacter* sp. in Broiler by the use of Probiotics and Symbiotics as an Alternative to Antibiotics.** 2017. 67p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Bacteria of the genus *Campylobacter* are recognized as common cause of gastroenteritis in humans around the world, surpassing salmonellosis. Products of animal origin, especially poultry, are considered the main vehicle of campylobacteriosis in humans. With the ban on the use of antibiotics as growth promoters in animal feed in several countries due to possible induction of bacterial resistance, and consumer pressure for quality products, alternatives have been sought for its replacement. As an alternative to the use of antibiotics the use of probiotics, prebiotics and symbiotics has been strongly emphasized in animal feed. This study aimed to evaluate the effect of probiotics, symbiotics and antibiotics on the control of *Campylobacter* spp. colonization and on growth performance (body weight gain, feed conversion ratio, feed intake and carcass yield and cuts) in broilers. A total of 720 day-old female Cobb broilers, reared at a population density of 10 birds / m² for 42 days of age, were used in a completely randomized design consisting of 4 treatments: control (without additives), antibiotic, probiotic and symbiotic, and 6 replicates. . At the end of the 42 days of life cloacal swabs were collected to detect and identify *Campylobacter* spp. using conventional culture methods and Polymerase Chain Reaction (PCR). There was no significant influence of treatments for any of the parameters evaluated at 7 days of age. At 21 days of age the feed intake was significantly lower in the control group. At 42 days there was a statistical difference in body weight and weight gain, and the groups treated with symbiotic and probiotic had the lowest values, respectively. Carcass yield, cuts and viscera were not affected by treatments. The colonization of *Campylobacter* spp. was not affected by any treatment. Only two species were identified, with predominance of *C. coli* (60%) versus 40% of *C. jejuni*. There was a 100% correlation between the species identified by the conventional culture methodology and the direct PCR analysis. The use of probiotics and symbiotics resulted in the zootechnical performance and control of the colonization of *Campylobacter* spp. comparable to antibiotics. Under the conditions of the experiment, no significant effects of any of the performance enhancers tested were observed.

Key-words: additives; poultry; performance.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Galpão experimental do Centro de Pesquisa Avícolas do IFRJ. Vista externa.....	21
FIGURA 2 – Galpão experimental do Centro de Pesquisa Avícolas do IFRJ. Vista interna.....	22
FIGURA 3 - Sistema de aquecimento e ventilação do galpão experimental do Centro de Pesquisa Avícolas do IFRJ.....	22
FIGURA 4 - Aves alojadas com 1 dia de idade.....	23
FIGURA 5 - Frequência de isolamento de <i>Campylobacter</i> spp. em nos tratamentos controle, antibiótico, probiótico e simbiótico.....	40
FIGURA 6 - PCR das amostras, genes <i>hipO</i> (735pb) e <i>ceuE</i> (462pb). (PM) Peso Molecular 100pb. (2, 3, 4, 5) <i>C. jejuni</i> ; (13 a18) <i>C. coli</i>	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Composição percentual e calculada da dieta inicial.....	24
TABELA 2 - Quantidade adicionada de probiótico em função da fase de criação da ave.....	25
TABELA 3 - Quantidade adicionada de simbiótico em função da fase de criação da ave.....	26
TABELA 4 - Quantidade adicionada de antibiótico em função da fase de criação da ave.....	26
TABELA 5- Tratamentos e total do número de aves criadas e avaliadas para a presença de <i>Campylobacter</i>	27
TABELA 6 - Oligonucleotídeos e programas de amplificação utilizados.....	32
TABELA 7 - Condições da master mix para os diferentes genes.....	33
TABELA 8 - Médias das variáveis zootécnicas de aves da linhagem Cobb com 7 dias de idade tratadas com avilamicina, probiótico, simbiótico e ração controle sem aditivos.....	34
TABELA 9 - Médias das variáveis zootécnicas de aves da linhagem Cobb com 21 dias de idade tratadas com avilamicina, probiótico, simbiótico e ração controle sem aditivos.....	35
TABELA 10 - Médias das variáveis zootécnicas de aves da linhagem Cobb com 42 dias de idade tratadas com avilamicina, probiótico, simbiótico e ração controle sem aditivos.....	36
TABELA 11 - Médias e desvio padrão do rendimento de cortes comerciais de frangos de corte (peito, dorso, coxas, sobrecoxas, asas) avaliados no abate aos 42 dias de idade.....	39
TABELA 12 - Médias e desvio padrão do rendimento das vísceras avaliadas no abate de frangos de corte de 1 a 42 dias de idade.....	39
TABELA 13 - Frequência de espécies de <i>Campylobacter</i> spp. identificadas nos tratamentos controle, antibiótico, probiótico e simbiótico.....	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Perfil Bioquímico de <i>C. coli</i> e <i>C. jejuni</i>	30
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 JUSTIFICATIVA	02
3 OBJETIVOS	03
3.1 Objetivo Geral.....	03
3.2 Objetivo Específico.....	03
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
4.1 <i>Campylobacter</i> spp.....	04
4.1.1 Histórico.....	04
4.1.2 Caracterização do gênero <i>Campylobacter</i>	05
4.1.3 <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i>	07
4.2 Ocorrência de <i>Campylobacter</i> spp. em Aves.....	07
4.3 <i>Campylobacter</i> spp. em Alimentos.....	10
4.4 Aditivos na Alimentação das Aves.....	13
4.4.1 Antibióticos.....	13
4.4.2 Probióticos.....	15
4.4.3 Prebióticos.....	18
4.4.4 Simbióticos.....	19
5 MATERIAL E MÉTODOS	21
5.1 Aspectos Éticos.....	21
5.2 Criação das aves.....	21
5.2.1 Local do Experimento.....	21
5.2.2 População de estudo.....	22
5.2.3 Manejo das aves.....	23
5.2.4 Dietas experimentais: Tratamentos.....	24
5.2.5 Aditivos.....	25
5.3 Índices Zootécnicos.....	26
5.4 Obtenção das Amostras e Delineamento Experimental.....	27
5.5 Detecção e Identificação Fenotípica de <i>Campylobacter</i>	28
5.5.1 Semeadura em placas e isolamento.....	28
5.5.2 Manutenção dos isolados.....	28
5.5.3 Identificação dos isolados.....	29
5.6 Detecção e Identificação Genotípica de <i>Campylobacter</i>	30
5.6.1 Extração do DNA.....	31
5.6.2 Reação em Cadeia polimerase (PCR).....	31
5.7 Análise Estatística.....	32
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6.1 Desempenho Zootécnico dos Animais.....	33
6.2 Rendimento dos Cortes e Vísceras.....	37
6.3 Frequência de Isolamento de <i>Campylobacter</i> spp.....	41
6.3.1 Análise molecular do conteúdo cecal.....	43

7 CONCLUSÃO	46
8 SUGESTÕES E RECOMENDAÇÕES	47
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXOS	64
ANEXO A - Descrição dos aditivos utilizados na formulação das rações experimentais.....	65
ANEXO B - Solução FBP.....	66
ANEXO C - Croqui do Galpão Experimental do Centro de Pesquisa Avícolas do IFRJ (Campus Pinheiral).....	67

1 INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Campylobacter* são reconhecidas por causarem gastroenterite em humanos em todo o mundo, e os produtos de origem animal especialmente os avícolas, são considerados o principal veículo de infecções em humanos por *Campylobacter*.

O trato intestinal das aves domésticas é um reservatório de *Campylobacter* spp. e as carcaças e vísceras comestíveis podem se contaminar durante o abate e nos processos de escalda, depena, e evisceração.

Estudos de caso indicam que a manipulação ou o consumo de carne de aves é uma importante fonte de campilobacteriose, representando cerca de 20 a 40% dos casos em países onde existem dados disponíveis. No Brasil não dispomos de dados exatos sobre a campilobacteriose, existindo subnotificação da doença.

Campylobacter spp. são onipresentes na maioria dos ambientes, e a transmissão horizontal é considerada a principal via para a colonização de frangos de corte. A redução da prevalência de *Campylobacter* spp. em frangos de corte é considerado chave para o controle de contaminação ao longo de toda a cadeia de produção de alimentos, incluindo o ambiente de fazenda, e, posteriormente, o controle da campilobacteriose em humanos.

O controle da contaminação bacteriana é realizado com o uso de antibióticos que são utilizados como melhoradores de desempenho em frangos. No entanto, existe uma preocupação crescente de que o uso de doses sub-clínicas de antibióticos na alimentação animal atue como fator de risco à saúde humana, devido a presença de resíduos em produtos animais para o consumo humano, que podem produzir reações alérgicas, toxicidade ou indução de surgimento de resistência bacteriana. Com base nesse pressuposto, a União Europeia, vetou o uso de antibióticos como melhoradores de desempenho na alimentação dos animais de produção no ano de 2006 e essa proibição fez com que muitos países, incluindo o Brasil, se adaptassem à nova legislação para continuar exportando para esse bloco econômico. Com isso a utilização de probióticos, prebióticos e simbióticos tem ganhado espaço cada ano que passa com o intuito de melhorar o ganho de peso, a conversão alimentar e melhorar a integridade da parede do trato gastrointestinal que é vital ao sistema de defesa do animal contra uma série de microrganismos patogênicos.

Considerando a dinâmica da avicultura e a necessidade de desenvolvimento de alternativas aos antimicrobianos melhoradores de desempenho para atender novos nichos de mercado e a importância que o *Campylobacter* spp. assume como causador de doenças de origem alimentar torna-se de grande relevância avaliar os efeitos da utilização de probióticos, simbióticos e antibióticos incorporados à ração na redução da colonização de *Campylobacter* spp. em aves de corte.

2 JUSTIFICATIVA

Campylobacter spp. é a causa mais comum de doença diarreica bacteriana veiculada por aves de corte em todo o mundo. Por serem os produtos avícolas uma importante fonte de infecções por *Campylobacter* spp., e os graves problemas de saúde pública que gera a campilobacteriose em humanos, esforços devem ser feitos para desenvolver medidas estratégicas para diminuir a colonização de aves por essa bactéria durante a produção primária.

Exigências quanto a retirada de determinados aditivos melhoradores de crescimento da ração das aves implicam na necessidade de pesquisas em busca de novos produtos e de resultados promissores que possam substituir os antibióticos. O controle da contaminação necessita ser feito com produtos que não prejudiquem o animal e que sejam seguros para consumo humano. Portanto, várias abordagens foram conduzidas para reduzir o número de *Campylobacter* em aves de corte nos últimos anos. Por exemplo, vacinação, ou imunização passiva de galinhas, bacteriocinas, ácidos orgânicos ou seus derivados. No entanto, até à data, não existe uma medida de intervenção efetiva, confiável e prática disponível para reduzir a colonização do intestino de frango pelo *Campylobacter*. Uma possível maneira segura de reduzir *Campylobacter* seria a utilização de probióticos e simbióticos e pesquisas realizadas, como a descrita por Mohan (2015), apontam estes como uma boa opção para substituição dos antibióticos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito dos antibióticos, probióticos e simbióticos no controle da colonização de *Campylobacter* spp. e no desempenho zootécnico de frangos de corte.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a eficiência da utilização de antibióticos, probióticos e simbióticos como melhoradores de desempenho e equilibradores da flora de frangos de corte no controle de *Campylobacter* spp. em frangos de corte.
- Avaliar o efeito dos antibióticos, probióticos e simbióticos nos parâmetros de desempenho zootécnicos: ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e rendimento de carcaça de frangos de corte;
- Isolar e identificar por métodos fenotípicos e genotípicos isolados de *Campylobacter* spp. de *swabs* de cloaca de frangos de corte aos 42 dias de idade;
- Comparar os resultados obtidos para detecção de *Campylobacter* spp. pelos métodos fenotípicos e genotípicos.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 *Campylobacter* spp

4.1.1 Histórico

O primeiro registro de uma possível infecção por *Campylobacter* ocorreu na Alemanha, em 1886 descrito pelo pesquisador Theodor Escherich quando observou organismos semelhantes a *Campylobacter* sp. Em sua pesquisa foram usadas amostras provenientes de cólon de crianças que apresentaram diarreia e morreram devido à enfermidade e também de gatos com diarreia. Com auxílio apenas de microscópio foram encontradas nestas amostras, bactérias de forma espiralada a princípio denominadas de *Vibrio felinus* (FERNADEZ & FARACE, 2003; BUTZLER, 2004). Em 1913, McFaydean e Stockman identificaram espécies microaerófilas semelhantes morfológicamente às espécies do gênero *Vibrio* em tecidos fetais de ovelhas e vacas que haviam abortado, sendo confirmado através de testes realizados em 1918 quando Smith isolou microrganismos bastante similares em fetos de bovinos e denominaram de *Vibrio fetus* (FERNADEZ & FARACE, 2003; MOORE, 2005). Jones et al. (1931) identificaram um vibrião microaerófilo, como o agente causal da disenteria invernal do bovino e o denominaram de *Vibrio jejuni*. Em 1944 Doyley descreveu um microrganismo isolado do intestino de suínos com diarreia e o denominou de *Vibrio coli* (FERNADEZ & FARACE, 2003).

Em humanos a infecção foi reconhecida somente em 1947, quando *Vibrio fetus* foi isolado do sangue de mulheres grávidas que apresentaram febre e abortos (BUTZLER, 2004; VINZENT et al., 1947). As pesquisas continuaram e em 1957, Elizabeth King reconheceu e descreveu importantes diferenças bioquímicas e antigênicas de um grupo de microrganismos curvos, móveis e microaerófilos que a autora denominou “relacionados a vibriões” em amostras de sangue de crianças com diarreia aguda (MOORE, 2005). Finalmente no ano de 1963 o gênero *Campylobacter*, que significa bactéria encurvada, foi proposto por Sebald e Véron. Estes pesquisadores englobaram nesse gênero as bactérias antes denominadas de *Vibrio fetus*, *Vibrio jejuni* e *Vibrio coli*, isto porque os pesquisadores avaliaram que este microrganismo apresentava características muito diferentes do *Vibrio* spp., tanto no metabolismo quanto na composição dos pares de bases do material genético (MOORE, 2005).

Entretanto, os avanços necessários para que a infecção viesse a ser reconhecida como uma doença de importância médica em humanos, ocorreram a partir da década de 70, com o desenvolvimento de técnicas que permitiram o isolamento de *Campylobacter*. A bactéria *Campylobacter* spp. foi isolada pela primeira vez, em 1972 pelos microbiologistas Dekeyser e Butzler (1972) que conseguiram isolar *Campylobacter* a partir de fezes de pacientes com enterite aguda através de um método de filtração com posterior inoculação em meios de cultura. Em 1977, Skirrow confirmou os achados dos microbiologistas belgas descrevendo um meio de cultura seletivo com três antimicrobianos (vancomicina, trimetoprim e polimixina) e incubando as amostras em microaerofilia, que favoreceu o crescimento de *Campylobacter*. Em pouco tempo *Campylobacter* spp. foi estabelecido como um patógeno humano (ALTEKRUSE, et al., 1999), principalmente pela capacidade de produzir diarreia no homem (FERNADEZ, 1992). Nos anos 1980 houve uma explosão de informações sobre esta bactéria. Na edição de 1984 do Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, o gênero *Campylobacter* era composto de apenas oito espécies e subespécies. A partir de então,

os estudos de taxonomia e da importância clínica desse grupo têm aumentado o número de espécies associadas (NACHAMKIN, 2001).

4.1.2 Caracterização do gênero *Campylobacter*

A família *Campylobacteraceae* é composta por 3 gêneros, *Campylobacter*, *Arcobacter* e *Sulfurospirillum*, sendo os dois primeiros comensais de humanos e animais domésticos. A estrutura taxonômica do gênero *Campylobacter* já sofreu algumas alterações. Previamente, eram classificadas como pertencentes ao gênero *Vibrio*, sendo reorganizadas após inúmeras pesquisas que empregaram técnicas moleculares para identificação das espécies (WINN & KONEMAN, 2008). As espécies de *Campylobacter* foram incluídas no atual gênero em 1963 (ADAM & MOSS, 1997).

A quantidade de espécies que o compõe ainda gera controvérsias. Segundo Debruyne et al. (2008), existem 14 espécies e segundo Fernández et al. (2008) existem 20 espécies e subespécies dentro do gênero. Atualmente, 24 espécies compõem o gênero *Campylobacter* (ON, 2013). As espécies que já foram isoladas de humanos são: *C. coli*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. fetus*, *C. hominis*, *C. hyointestinalis*, *C. jejuni*, *C. lanienae*, *C. lari*, *C. mucosalis*, *C. rectus*, *C. showae*, *C. sputorum* e *C. upsaliensis* (DEBRUYNE et al., 2008). *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis* representam o grupo de bactérias denominadas termofílicas, ou seja, com capacidade de crescimento ideal a 42-43°C (ON, 2013; SILVA et al., 2011), enquanto a morte celular ocorre entre 56 e 57°C (NGUYEN et al., 2006). Apesar de sua natureza termofílica, a temperatura do corpo humano parece ser a ideal para o crescimento e quimiotaxia, constituindo-se nos patógenos mais frequentemente isolados de enterites animais e humanas (FOSTER et al., 2004; KHANNA et al., 2006).

O gênero *Campylobacter* é composto por pequenos bacilos gram-negativos (0,2-0,8µm X 0,5-5µm) curvos e finos, dispostos em espiral, não formadores de esporos, microaerófilos, não hemolíticos e com colônias frequentemente não pigmentadas. A maioria das espécies possui motilidade, graças a um flagelo único preso a uma das extremidades da bactéria. Os flagelos podem medir até três vezes o comprimento da célula e são responsáveis pelo movimento característico em “sacarolhas” ou “vaivém”, que pode ser observado em microscópio de campo escuro (BUTZLER, 2004; DEBRUYNE et al., 2008; HOLT et al., 1994; SILVA et al., 2011).

São organismos quimiorganotróficos e apresentam metabolismo respiratório microaerófilo. Não fermentam ou oxidam açúcares, obtendo energia através de aminoácidos e produtos intermediários do Ciclo de Krebs (MOURA, 2010; SILVA et al., 2011; VANDAMME, 2000).

Ao contrário de outros microrganismos transmitidos por alimentos, como *Salmonella* e *Shigella*, possuem um crescimento fastidioso e requerem um ambiente de microaerofilia para se multiplicarem, tendo seu crescimento inibido em concentrações de oxigênio menor que 3% e maior que 15%. São capnofílicas, ou seja, não crescem na ausência de dióxido de carbono e requerem cerca de 10% de CO₂ para multiplicarem-se (BUTZLER, 2004; KETLEY, 1997). Obtendo crescimento máximo em atmosfera contendo aproximadamente 5% de O₂, 10% de CO₂ e 85% de N₂ (SILVA et al., 2011).

São facilmente inativadas quando expostas ao ar atmosférico, ressecamento, pH abaixo de 4,9 e acima de 9,0, à presença de NaCl, sendo essa sensibilidade variável em função da temperatura e armazenamento prolongado (BOUFLEUR, 2009; DOYLE & ROMAN, 1982; MOURA, 2010; SILVA et al., 2011). Além disso, não sobrevivem bem em exposição aos raios ultravioletas (OBIRI-DANSO et al., 2001) e à pressão hidrostática (SOLOMON e HOOVER, 2004).

As colônias de *Campylobacter* spp. nos diversos meios de cultura são semelhantes. Usualmente são planas, podendo apresentar-se lisas, convexas e brilhantes, com bordas perfeitas, ou planas; translúcidas e lustrosas, com bordas irregulares e espalhadas (GODOI et al., 2010). Possuem tanto aspecto de secas como de úmidas. Geralmente são incolores, levemente creme ou acinzentadas e podem apresentar brilho d'água ao refletir a luz ambiental. Existe uma tendência das colônias apresentarem crescimento confluyente ao longo da linha de semeadura nos meios sólidos e reações hemolíticas não são observadas em ágar sangue (QUINN et al., 2005).

Em culturas jovens quando uma ou mais células se agrupam formam uma estrutura característica do gênero, em formato de “S” ou “V”, também chamado de asa de gaivota. Possuem a característica de mudar seu formato espiral e assumir formas esféricas ou cocóides em situações desfavoráveis ao seu crescimento ou em culturas velhas, com mais de 48 horas (DEBRUYNE et al., 2008; HOLT et al., 1994; PARK et al., 2002; SILVA et al., 2011). Essa forma corresponde à forma viável mas não cultivável (HAZELEGER et al., 1994), ocorrendo a captação de aminoácidos e manutenção de uma membrana externa intacta, porém os microrganismos são incapazes de crescer em meios de cultura seletivos (ALTEKRUSE et al., 1999). Já outros autores acreditam que essa é uma forma degenerativa da bactéria, que contém baixos níveis de ácidos nucleicos e peptídeos, o que leva a uma alteração na integridade da membrana celular (PARK et al., 2002). Reezal et al. (1998) ressaltaram a dificuldade da recuperação dessas células cocóides, mesmo viáveis, quando são utilizadas técnicas de cultura convencionais.

Com relação às provas bioquímicas Debruyne et al. (2008) afirmam que esta bactéria não fermenta ou oxida os carboidratos, não produz as enzimas lipase e lecitinase, há ausência de formação de produtos finais ácidos ou neutros, não produz indol e acetoina ou qualquer tipo de pigmento. A maioria das espécies reduz nitratos. *Campylobacter* spp. não hidrolisam gelatina, caseína, tirosina e hipurato, sendo este último somente hidrolisado pela *C. jejuni*. O teste é negativo para vermelho de metila ou o teste de Voges-Proskauer. A oxidase é positiva para praticamente todas as cepas, com exceção do *C. gracilis*. O teste da urease também é negativo para a maioria das espécies de *Campylobacter* com exceção de algumas cepas de *C. lari*.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido bastante utilizada como prova complementar ou alternativa aos métodos fenotípicos tradicionais utilizados para a identificação e diferenciação de espécies de *Campylobacter* spp., sendo um método preciso e de simples execução, diminuindo o tempo de diagnóstico e aumentando a sensibilidade, pela detecção de sequências específicas de DNA (ácido desoxirribonucleico). Essa técnica pode ser utilizada para a confirmação em nível molecular, podendo ser empregada para a identificação de gênero, bem como para diferenciação entre espécies (DENIS et al., 1999; KORCZAK et al., 2006; MOORE et al., 2005).

Estudos envolvendo *Campylobacter*, em sua maioria, a técnica do PCR é utilizada para a confirmação de espécie sendo o DNA extraído a partir de colônias isoladas. Contudo *Campylobacter* possui um crescimento fastidioso *in vitro* e pode facilmente perder a capacidade de ser cultivado devido à exposição a condições desfavoráveis (PARK, 2002). Métodos convencionais para a detecção de *Campylobacter* com base na cultura são demorados e laboriosos. Quando as amostras são cultivadas em placas de ágar seletivo, o crescimento do *Campylobacter* é favorecido seletivamente. No entanto, o sucesso deste passo de crescimento depende unicamente da viabilidade do *Campylobacter* na amostra. Acredita-se que esses microrganismos tenha baixa taxa de sobrevivência se exposto à temperatura ambiente e ao ar atmosférico

(WANG et al., 2013). Isso, em combinação com um longo tempo de transporte potencial, desde a coleta de amostras até a análise de amostras, pode reduzir a viabilidade de amostras de diagnóstico de rotina. Tendo isso em vista a detecção do *Campylobacter* através de metodologias da biologia molecular se torna uma grande ferramenta visto que não há necessidade de cultivo prévio.

4.1.3 *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*

Entre as espécies de *Campylobacter* que causam gastroenterites em humanos, as mais importantes associadas a doenças transmitidas por alimentos é *C. jejuni*, seguida de *C. coli* (CDC, 2005; ZILBAUER et al., 2007). Segundo Maziero & Oliveira (2010) *C. jejuni* e *C. coli* são responsáveis por 95% dos casos de campilobacteriose em humanos.

As espécies *C. jejuni* e *C. coli* são estreitamente correlatas, sendo seus mecanismos de patogenicidade muito semelhantes. Existem duas subespécies de *C. jejuni* reconhecidas, *C. jejuni* subs. *jejuni* e *C. jejuni* subs. *doylei*. *C. jejuni* subs. *doylei* se caracteriza bioquimicamente pela ausência da redução de nitrato, resistência à cefalotina e fraca reação da enzima catalase, ao contrário das cepas de *C. jejuni* subs. *jejuni*. O papel patogênico de *C. jejuni* subs. *doylei* é desconhecido. Quando isolado, apesar de infrequente, é obtido de amostras clínicas de humanos, frequentemente associado à bacteremia em crianças (DEBRUYNE et al., 2008).

Campylobacter coli e *Campylobacter jejuni* subs. *jejuni* podem ser diferenciados bioquimicamente pela sua habilidade de hidrolisar o hipurato, a qual *C. coli* é negativo, assim como todas as outras espécies do gênero *Campylobacter*, que não possuem o gene da hipuricase (*hip*), não são capazes de hidrolisar o mesmo substrato (LINTON et al., 1997). No entanto, cepas de *Campylobacter jejuni* subs. *jejuni* que não hidrolisam hipurato são comuns.

4.2 Ocorrência de *Campylobacter* spp. em Aves

Os plantéis de frangos no Brasil são na grande maioria de criações livres das principais doenças avícolas. No entanto, bactérias como *Campylobacter* não são detectadas como problema para avicultura no campo, sendo consideradas comensais no intestino das aves, uma vez que não causam grandes prejuízos aos padrões zootécnicos dos animais (BACK, 2010). Devido o frango infectado por *Campylobacter* spp. não apresentar sintomas clínicos de doença, representa um problema higiênico-sanitário importante na linha de produção (PARK, 2002).

A contaminação ambiental é apontada como a rota mais comum de transmissão de *Campylobacter* spp. para as aves (MEAD, 2004). A colonização das aves ocorre por várias fontes, como água, ração, lotes de aves com idade avançada, contato com outras espécies de animais e fezes de outras aves ou animais presentes no galpão, funcionários, equipamentos e veículos (OLIVEIRA et al., 2008; PATTISON, 2001.)

Campylobacter spp. geralmente coloniza o trato gastrointestinal de aves sem causar alterações patológicas. Segundo Oliveira (2008) a presença do patógeno é restrita à mucosa intestinal, que é um local que favorece o crescimento do microrganismo. Mas Lee et al. (2006) reportou que nas aves, o *Campylobacter* pode ser isolado do baço, fígado e sangue. Carvalho et al. (1997) pesquisaram *C. jejuni* no fígado, baço e bile de aves com diarreia em fazendas da região de Ribeirão Preto –SP e isolou *C. jejuni* em duas (6,89%) amostras de bile, em 12 (35,29%) amostras de baço e em 40 (54,79%) amostras de fígado.

A infecção por *Campylobacter* em frangos conduz a um alto nível de colonização do trato intestinal podendo excretar 10^4 a 10^8 células por grama de fezes (MAZIERO & OLIVEIRA, 2010), em uma associação aparentemente comensal, com pouca ou nenhuma patologia (SMITH et al., 2008). Surtos de hepatite aviária já foram relatados, porém o papel patogênico de *Campylobacter* spp. não é claro. Uma possível exceção foi a morte de avestruzes associada ao *Campylobacter* e enterite em aves jovens (OIE, 2008).

O comensalismo da bactéria em frangos é discutido em virtude da eliciação de alguma resposta imune e capacidade de invadir e persistir em órgãos internos da ave. Foi estimado que as doses mínimas de *Campylobacter* para colonização em frangos de corte estão aproximadamente entre 35 UFC e 10^4 UFC (LINE et al., 2008) e mesmo para um alto nível de colonização, 10^9 UFC por exemplo, é possível um pequeno nível de invasão das células do trato intestinal sem ocorrência de problemas pela resposta inflamatória. É provável que se a bactéria não invadir em número suficiente para causar inflamação severa, poderá causar inflamação local, a qual pode ser suficiente para controlar o *Campylobacter* e direcionar uma resposta imune adaptativa, sendo que tal resposta pode ser auto-limitante e não permitir a ocorrência de uma patologia severa. Neste contexto, o aparecimento de *C. jejuni* em órgãos, durante infecção em aves demonstra não ser somente uma infecção superficial como parece ser o caso de outras bactérias comensais e sua colonização não é unicamente baseada em replicação rápida e eficiente no muco intestinal (Van DEUN et al., 2008).

No que diz respeito à *Campylobacter* em ovos, estes parecem não ser significantes como fontes de transmissão, sendo a transmissão vertical considerada rara ou inexistente por alguns pesquisadores. Por isso, até o momento, entende-se que é de baixa importância epidemiológica (FONSECA, 2006; SAHIM, et al., 2003), contudo as poedeiras comerciais podem albergar *Campylobacter* nos folículos ovarianos, baço e cecos (COX, et al., 2009). Neste sentido, é possível encontrar lotes de frangos negativos originados de matrizes positivas e, através de estudos de caracterização molecular, já foram identificadas diferenças entre linhagens de *Campylobacter* isoladas de reprodutoras e de sua progênie (van de GIESSEN, et al., 1998; BULL, et al. 2006).

A viabilidade de *Campylobacter* em ovos comerciais foi verificada por Paula et al. (2009) através da inoculação “in ovo” ou submersão destes em água peptonada com 10^5 UFC/mL de *C. jejuni*, e armazenados por 24h a temperatura de 25°C. Em nenhuma das amostras analisadas foi observado o crescimento de *C. jejuni*, demonstrando que nas condições experimentais utilizadas, a bactéria não foi capaz de sobreviver e multiplicar no interior de ovos comerciais. Para analisar a possibilidade de transmissão vertical, Fonseca et al. (2006) realizou estudo em *swabs* cloacais de ovos de matrizes, sendo o resultado 100% negativo para todas as amostras coletadas (140 amostras). Com isso, sugere-se que a capacidade de *Campylobacter* spp. de alcançar o interior e/ou sobreviver dentro do ovo é bastante limitada. Embora seja controversa e alvo de discussões, para Cox et al. (2012) a possibilidade de transmissão vertical não pode ser excluída.

É provável que a transmissão vertical seja um evento incomum em aves reprodutoras e que há outras rotas de infecção para estes animais, pois *Campylobacter* podem ser encontradas em embriões em desenvolvimento, penugem e *swabs* colhidos em incubatórios e pintos recém-eclodidos. Ainda, foi recuperada de órgãos linfóides de pintos de um dia inoculados, deste modo levantando o questionamento a ser respondido: "quando, como e se" *Campylobacter* se estabelece naturalmente nestes tecidos, sendo que um melhor entendimento da imunologia das aves e dos mecanismos de

sobrevivência que *Campylobacter* utiliza para movimentar em todo o corpo das aves é essencial para a compreensão de sua ecologia dentro destes hospedeiros.

Em lotes de frango de corte, bactérias do gênero *Campylobacter* usualmente aparecem na segunda ou terceira semana de vida dos mesmos. A principal característica da infecção é ser eficaz na transmissão horizontal. As aves podem ser colonizadas por uma baixa concentração de *Campylobacter* e, uma vez que passam a excretá-lo, a disseminação é muito rápida, atingindo quase a totalidade do lote no período que antecede o abate. Já foi demonstrado que após uma semana da primeira detecção da bactéria num lote de frangos de corte já é possível detectar altos níveis nas fezes, como $6,1 \log_{10}$ (BULL et al., 2006).

Quanto a colonização por diferentes cepas de *C. jejuni* em frangos algumas considerações foram publicadas por Konkell et al.(2007), os quais citam que na colonização por *C. jejuni* algumas cepas são hábeis em competir e inibir uma segunda cepa no estabelecimento da colonização, porém a concomitância de várias cepas em um mesmo frango é possível. Shibiny-El et al. (2007) citam que a ideia corrente dos fatores que permitem uma espécie ou cepa se tornar dominante no intestino de frangos parece mais complicado do que o simples fato de ser a primeira cepa que se estabelecer a cepa dominante na colonização. Também citam não ser comum o isolamento de mais de uma espécie ou subtipo a partir da mesma ave. Na conclusão de seus estudos com *C. jejuni* e *C. coli* em frangos de corte, as duas espécies competem igualmente e colonizam as aves até os 35 dias de idade, independentemente da ordem ou do dia de inoculação. A partir dos 35 dias de idade dos frangos a espécie *C. jejuni* declinou e a *C. coli* tornou-se dominante nos isolados. Se não houver competição *C. jejuni* não declina em frangos com esta idade, o que leva a sugerir que o declínio observado foi devido em parte pela competição com *C. coli*, mas também provavelmente influenciado pelas mudanças no desenvolvimento dos frangos (imunidade e flora intestinal) a partir desta idade (BORSOI, 2011).

Um estudo conduzido na Dinamarca apontou que os frigoríficos que apresentaram os menores índices de contaminação por *Campylobacter* foram os mesmos que controlaram a contaminação por *Salmonella*, relacionando à ocorrência de contaminação no frigorífico aos procedimentos adotados durante o abate e também nas granjas fornecedoras (WEDDERKOPP et al., 2000). Portanto, o controle do *Campylobacter* envolve intervenções não só na indústria, mas também no campo, onde se busca reduzir o nível da bactéria no conteúdo intestinal das aves. De modo geral, as medidas para combater a transmissão horizontal do *Campylobacter* podem ser efetivas no controle da bactéria e na redução do risco de infecção das aves, mas não impedem seu reaparecimento em ciclos de produção subsequentes (van de GIESSEN et al., 1998). Na prática, é difícil ou quase inviável a produção de lotes de frango de corte livres de *Campylobacter*, bem como a manutenção dessa condição. Entre os fatores de risco para maior contaminação estão: os meses de verão, as criações tipo *free-range*, ou seja, mantida ao ar livre na maior parte do tempo e orgânica, lotes com mais de 15.000 aves, presença de outros animais nas propriedades, bandeja de bebedouro tipo *nipple* e as caixas de carregamento para o abate e o abate propriamente dito (BORSOI, 2011).

O controle de *Campylobacter* na cadeia alimentar, especialmente na produção de frangos, tornou-se um dos principais alvos de esforços na prevenção e controle, mas no Brasil, apesar de ser o maior exportador mundial de carne de frango, são limitadas as informações sobre esta bactéria na cadeia de produção de aves. A Legislação Brasileira em vigor não estabelece padrões microbiológicos para *Campylobacter* em alimentos (BRASIL, 2001). Existe apenas uma menção a este microrganismo como patógeno na legislação número 451 de 19 de setembro de 1997 da Agência Nacional de Vigilância

Sanitária. Os casos de campilobacteriose são subdiagnosticados e subnotificados e não há fácil acesso a dados epidemiológicos.

Estudos na Europa têm demonstrado uma prevalência média de 71% nos lotes de frango, podendo chegar, no caso de Espanha aos 88%. Com isso foi aprovado o projeto CAMPYBRO "Controle de infecção por *Campylobacter* em frangos de corte por meio de estratégia em duas etapas: nutrição e vacinação", financiado pelo sétimo Programa Marco da União Europeia. O objetivo deste projeto é o desenvolvimento de estratégias em duas etapas, a fim de reduzir os níveis de contaminação por *Campylobacter* na produção de aves: i) as intervenções dietéticas nutricionais (aditivos alimentares), ii) o potencial de desenvolvimento de um vacina por vacina reversa (FERREIRA, 2014).

Os poucos dados a cerca da contaminação de produtos avícolas deve-se ao fato que a presença de *Campylobacter* é monitorada apenas em países desenvolvidos e naqueles em que houve grandes surtos de campilobacteriose em humanos. Nesses países já foram impostas leis e restrições. No Brasil ainda não há um acompanhamento regular deste patógeno na indústria de carne, a menos que exigido pelo cliente externo.

4.3 *Campylobacter* spp. em Alimentos

Bactérias do gênero *Campylobacter* têm sido reconhecidos como agentes infecciosos há quase um século, porém, somente em 1972 esses microrganismos foram reconhecidos como potenciais patógenos em alimentos. A partir desse ano, a presença de *Campylobacter* passou a ser monitorada, e a incidência da campilobacteriose só tem aumentado a cada ano, sendo reconhecido como o principal patógeno de origem alimentar nos países desenvolvidos (PARK et al., 2002).

Campylobacter spp. são comumente isoladas de diversos alimentos, incluindo leite não pasteurizado, água e carne crua ou mal processada de suínos, bovinos e de aves (FDA, 2012) sendo o frango e seus derivados a principal forma de aquisição da gastroenterite em todo o mundo, estimando-se sua implicação em 50 a 70% das infecções esporádicas humanas (THOMÉ, 2006).

Campylobacter geralmente está presente em baixa densidade celular e pode tornar-se injuriado em alimentos e água. Mas mesmo o alimento contendo baixas quantidades da bactéria, 500 células são suficientes para causar a colonização e a infecção humana (ALTEKRUSE, 1999). O consumo e o manuseio de carne de frango inadequadamente cozida são considerados os principais fatores de risco para a doença, além da contaminação cruzada devido à manipulação inadequada de alimentos no ambiente doméstico, em que durante a preparação de um alimento contaminado, o microrganismo acaba atingindo outros alimentos ou objetos que não estavam contaminados (BAKER, et al., 2007; MYLIUS et al., 2007; MATTICK et al., 2003). Para Carvalho et al. (2001), o processo de descongelamento possui grande importância na contaminação cruzada, pois a água de degelo pode entrar em contato com alimentos ingeridos *in natura* e, como a dose infectante de *Campylobacter* é muito baixa, uma gota de água de degelo contaminada pode causar enterites em humanos. A necessidade de alertar o consumidor sobre como manipular e preparar adequadamente a carne de frango levou a Agência Nacional de Vigilância Sanitária a editar a Resolução RDC n° 13 de janeiro de 2001. Essa Resolução é um Regulamento Técnico com instruções de uso, preparo e conservação de carne de aves e seus miúdos crus, resfriados e congelados, que devem constar nos rótulos desses produtos.

A incidência e a quantidade de *Campylobacter* em carcaças e cortes de frango variam com as condições de manejo durante a criação e com as medidas higiênico-sanitárias nas operações de abate e subsequente manipulação das carcaças. A contaminação das carcaças de frango por *Campylobacter* tem sido definitivamente

relacionada à presença da bactéria no conteúdo intestinal das aves, que por meio de manipulação e operações de abate mal conduzidas e sem a observação de práticas higiênicas, contaminam a carcaça e as vísceras (MOURA, 2011).

Em carne de frangos de corte, a ocorrência de amostras contaminadas varia de 12,5% a 93,7%. Geralmente, os pesquisadores isolam este microrganismo a partir de carne de frango resfriados ou congeladas. As partes do frango de maior frequência de isolamento de *Campylobacter* são o pescoço, pele e sobrecoxa. Na parte interna da carcaça a bactéria já foi isolada de coração, fígado e moela. O Painel dos Riscos Biológicos apresentados pela EFSA (2010) revelou elevada prevalência de *Campylobacter* spp. em lotes de frangos, com estimativa alarmante e equivalente a oito carcaças contaminadas em cada 10 frangos analisados na Europa.

Em estudo realizado no estado do Rio de Janeiro – Brasil, Medeiros (2011) analisou 30 carcaças refrigeradas, detectando a presença de *Campylobacter* spp. em 21 (70%). Dessas, seis (28,57%) foram provenientes de abatedouros, oito (38,10%) de supermercados e sete (33,33%) de feiras livres. Dos 21 isolados, dois (9,52%) foram identificados como *C. coli* e 18 (85,71%) como *C. jejuni*. Em outra pesquisa realizada por Medeiros (2009), no município do Rio de Janeiro, ao analisar dez amostras de sobrecoxas de frango, identificou 7 (70%), como positivas para *Campylobacter* spp.

No estado de São Paulo também foi isolado *Campylobacter*, Carvalho et al. (2010) analisaram 80 amostras de sobrecoxas colhidas em diferentes pontos comerciais (feiras livres e hipermercados) do município de São Paulo, 10/80 (12,5%) mostraram-se contaminadas com *Campylobacter* spp. Treze estirpes de *Campylobacter* spp. foram isoladas, sendo quatro estirpes de *Campylobacter jejuni* e nove de *Campylobacter coli*, verificando-se, portanto, que em três amostras de sobrecoxa foi possível isolar mais de uma espécie ou estirpe de *Campylobacter* spp.

O isolamento do *Campylobacter* se dá em âmbito nacional. Para conhecer a ocorrência de patógenos em carne de frango exposta ao consumo, Freitas & Noronha (2007) analisaram 16 amostras (quatro de fígado, quatro de moela, duas de coração, duas de pele, uma de pescoço, duas de carcaça e uma mistura de pele de pescoço e musculatura da cavidade abdominal), coletadas em abatedouros-açougues clandestinos, feiras-livre e supermercados em Belém - PA. *Campylobacter* spp. foi isolado em 14 (93,7%) e identificado em 12 (87,5%) amostras. Demonstrando que amostras procedentes de abatedouros clandestinos, assim como amostras oriundas de abate sob vigilância sanitária, estavam contaminadas por *Campylobacter* spp.

Em um estudo realizado em Londrina, Paraná, Brasil, 93,3% das carcaças de frango examinadas estavam contaminadas por *Campylobacter* spp. e 50% das amostras frescas examinadas após o enriquecimento foram positivas para *C. jejuni* (MAZIERO & OLIVEIRA, 2010). Alves & Oliveira (2013) analisaram cinquenta amostras de cortes refrigerados de frango cru (peito, coxa e sobrecoxa), provenientes de frigoríficos com Serviço de Inspeção Federal (SIF), adquiridas em dois supermercados de Londrina - PR em suas embalagens originais. Das 50 amostras de carne de frango analisadas, 28 (56%) estavam contaminadas com *Campylobacter* spp.

A maioria dos patógenos de origem alimentar é considerada microrganismos robustos, já que precisam sobreviver em ambiente hostil, tanto no processamento, quanto na aplicação de técnicas de conservação de alimentos (PARK, 2002). Neste contexto, *Campylobacter* parece improvável ser um patógeno de origem alimentar, uma vez que dentro de tal categoria de agentes patogênicos, *C. jejuni* e *C. coli* são considerados microrganismos de crescimento fastidioso, possuindo singulares exigências para seu crescimento e uma sensibilidade incomum ao estresse ambiental. Dificilmente, se multiplicam fora de um organismo hospedeiro ou durante

processamentos ou estocagem de alimentos. Não crescem em ambientes com atividade de água inferior a 0,987 e são facilmente inativados pelo calor. O congelamento também é prejudicial ao seu crescimento, inativando o microrganismo em menos de 3 dias, a -15°C, apesar de não eliminá-lo (SILVA et al., 2011). Apesar de serem termofílicas em seus requisitos de crescimento, *C. jejuni* e *C. coli* não resistem a altas temperaturas e, conseqüentemente, não sobrevivem no alimento que foi pasteurizado ou cozido adequadamente (PARK et al., 2002). A capacidade de *Campylobacter* sobreviver nos alimentos e causar um grande número de doenças levaram muitos pesquisadores a investigar a capacidade de *C. jejuni* formar biofilmes (TRACHOO et al., 2002; JOSHUA et al., 2006; GUNTHER & CHEN, 2009).

Apesar de não se multiplicar em temperaturas abaixo de 30°C, a sobrevivência de *Campylobacter* em alimentos é, geralmente, melhor em temperaturas abaixo da temperatura ambiente e são metabolicamente ativos, com produção de ATP, em temperaturas abaixo de 4°C (PARK et al., 2002). Maziero et al. (2010) avaliaram o efeito da temperatura na sobrevivência de *C. jejuni* em carcaças de frangos estocadas por 7 dias, a 4°C, e 28 dias, a -20°C; entretanto, não encontraram diferença significativa em relação a reativação desta bactéria. No mesmo sentido, Sampers et al. (2010) não observaram redução quantitativa significativa ao manter carne de frango resfriada por 14 dias. Porém houve redução de 1 log₁₀ UFC⁻¹ no primeiro dia de congelamento (-20°C) de amostras de carne de frangos, quando as amostras foram congeladas por 14 dias.

Embora *Campylobacter* reduza seu crescimento em temperaturas abaixo de 30°C, é capaz de sobreviver em superfícies de carne crua a temperaturas de refrigeração e assim constitui em risco para o consumidor. Ligowska et al. (2011) destacaram que a constituição da superfície da carne de frango prolonga a sobrevivência de *C. jejuni* a 5 °C, em comparação com meios de cultura em laboratório, sugerindo que os compostos presentes na carne de frango influenciam na adaptação do microrganismo a baixas temperaturas, assim como a transcrição de genes associados à sobrevivência prolongada de *C. jejuni*.

É fato que a carne de frango e produtos derivados serem o principal veiculador de *Campylobacter* à humanos. A presença natural deste patógeno em animais, a alta incidência na avicultura e os graves problemas de saúde pública que gera, a campilobacteriose em humanos tem recebido a atenção através de programas específicos de controle na avicultura, em diversos países. Em função das exigências cada vez maiores do mercado internacional da carne de frango, as indústrias de alimentos prontos e os abatedouros no Brasil vêm apresentando um maior interesse no controle de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* com o monitoramento e o controle da contaminação das carcaças (SCARCELLI et al., 2005; MADALOZZO et al., 2007). A busca de novos mercados e alimentos mais seguros tem levado as indústrias de produtos de origem animal a implementar uma melhoria contínua na qualidade microbiológica de toda a cadeia produtiva (MADALOZZO et al., 2007). As estratégias de controle de *Campylobacter* spp. em alimentos devem focar nas limitações fisiológicas do microrganismo, como sensibilidade ao ressecamento, congelamento e oxigênio (SILVA et al., 2011), além da implementação de programas como Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (MOORE et al., 2005). Como os produtos de origem aviária constituem a principal fonte de contaminação do microrganismo, aliado ao fato destes produtos serem amplamente consumidos devido ao seu alto valor nutritivo e ao seu baixo custo, esses alimentos também devem receber atenção especial no controle da campilobacteriose em humanos (SILVA et al., 2011).

4.4 Aditivos na Alimentação das Aves

Segundo a redação da Instrução Normativa nº 15 de 26/05/2009, aditivo para produtos destinados à alimentação animal é a substância, microrganismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizada normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios e atenda às necessidades nutricionais ou tenha efeito anticoccidiano.

De acordo com a Instrução Normativa nº 13 de 01/12/2004 os aditivos zootécnicos devem ter efeitos sobre a eficiência do desempenho animal e da qualidade dos produtos de origem animal. Dentre os aditivos zootécnicos - incluem os seguintes grupos funcionais:

- a) digestivo: substância que facilita a digestão dos alimentos ingeridos, atuando sobre determinadas matérias-primas destinadas à fabricação de produtos para a alimentação animal; como por exemplo as enzimas que são proteínas ligadas ou não a co-fatores e que possuem propriedades catalíticas específicas.
- b) equilibradores da flora: microrganismos que formam colônias ou outras substâncias definidas quimicamente que têm um efeito positivo sobre a flora do trato digestório; tendo como representante os probióticos, os prebióticos e os acidificantes
- c) melhoradores de desempenho: substâncias definidas quimicamente que melhoram os parâmetros de produtividade.

Segundo Butolo (1999), aditivos são definidos como substâncias adicionadas à ração em pequenas quantidades, que possuem função pró-nutricional, condicionadora ou profilática, não sendo prejudicial ao animal e não deixando resíduos nos produtos de consumo, desde que utilizados sob determinadas normas. Nesse contexto, outras prerrogativas também devem ser preenchidas na classificação de aditivos como: melhorar o desempenho zootécnico dos animais, terem eficiência em pequenas dosagens, não apresentar resistência cruzada com outros aditivos como, permitirem a manutenção da flora gastrointestinal normal, não serem tóxicos aos animais e nem aos seres humanos nas doses recomendadas, não serem mutagênicos ou carcinogênicos e não causarem efeitos deletérios ao meio ambiente (LIMA, 2003).

4.4.1 Antibióticos

No início da avicultura industrial, por volta de 1950, a utilização de antimicrobianos (antibióticos e quimioterápicos) tinha o intuito de prevenir enfermidades e com o passar do tempo, pesquisadores descobriram que dosagens subclínicas de antibióticos nas rações melhoravam o crescimento e a eficiência de produção dos animais. O primeiro trabalho científico relacionado com o uso de antimicrobianos em animais foi publicado em 1949, onde se demonstrou o efeito benéfico do uso de clortetraciclina em níveis subterapêuticos para aves. Os resíduos excedentes da fermentação dessa tetraciclina provaram melhorar o crescimento e a saúde dos animais (GUARDABASSI & KRUSE, 2008). Os antibióticos passaram, então, a serem utilizados como melhoradores de desempenho na produção de frangos de corte sustentando a cadeia avícola, melhorando o desempenho animal e reduzindo a mortalidade causada por infecções subclínicas (FUKAYAMA et al., 2005; DIBNER & RICHARDS, 2005).

Segundo Ito et al. (2005), os antibióticos melhoradores de desempenho são prescritos para controlar ou equilibrar a proliferação de bactérias Gram positivas que liberam metabólitos tóxicos que comprometem o ganho de peso ou outras formas de

agressão geradas pela superproliferação bacteriana, que causam competição por nutrientes com o hospedeiro e estímulo excessivo do sistema imune local.

De acordo com Haese & Silva (2004), o efeito estimulador de crescimento que os antibióticos exercem sobre os animais podem ser explicados pelas seguintes hipóteses: Inibição do desenvolvimento de microrganismos específicos; Melhora a relação microflora desejável: microflora indesejável; Aumento da digestão do amido; Redução da produção de toxinas enterogênicas; Redução da renovação das células da mucosa intestinal; Aumento do número de bactérias necessárias para a síntese de proteína; Redução de bactérias que consomem vitaminas do complexo B; Diminuição da espessura da parede do intestino delgado, aumentando a irrigação sanguínea e a absorção de nutrientes e consequentemente melhorando o consumo de ração, ganho de peso e a conversão alimentar.

Desta forma, os antibióticos são usados em larga escala na formulação das rações como melhoradores de desempenho em várias fases do ciclo de produção das aves e tem contribuído para maximizar a produtividade nesta espécie, pelo fato deles proporcionarem principalmente a manutenção da saúde intestinal e consequente melhora no aproveitamento do alimento pelos animais (BELLAVAR, 2000). Em relatório emitido pelo *Food and Drug Administration*, no ano de 2013 constatou-se que os animais destinados à alimentação humana consumiram mais de 14 mil toneladas de antimicrobianos (FDA, 2015).

O uso destas substâncias de forma subterapêutica, aliado ao melhoramento genético, conhecimento das exigências nutricionais e novas técnicas de manejo, permitiu a maximização dos lucros na cadeia produtiva e o destaque da avicultura brasileira no cenário mundial. Promovendo assim, o barateamento do custo do alimento para o consumidor, pois causam o encurtamento dos dias de abate para o mercado, fazem que haja mais ciclos produtivos por unidade de tempo, menor desperdício e potencial redução no impacto ambiental e redução da incidência de doenças (GÓRNIK & SPINOSA, 2007).

Apesar dos grandes benefícios obtidos pelo uso de níveis subterapêuticos dos antibióticos na criação animal, têm surgido críticas severas em relação ao uso rotineiro deste aditivo, por parte de órgãos oficiais de saúde pública, de organizações não governamentais, de profissionais ligados à área de produção animal e da população de maneira geral, principalmente na Europa (FLEMMING & FREITAS, 2005). O uso abusivo e sem critérios de antibióticos na alimentação animal proporcionou o aparecimento de resistência microbiana, bem como a presença de resíduos na carne e derivados, fizeram com que autoridades e órgãos internacionais de saúde passassem a se preocupar com as rações animais que continham esses produtos (PELICANO et al., 2004). Para McMullin (2004) e Górnika & Spinosa (2007) os antibióticos melhoradores de desempenho podem acarretar problemas potenciais à saúde do homem, como toxicidade, alergia e desenvolvimento de resistência, razão pela qual vêm sendo criticados severamente. Além disto, causam efeitos teratogênicos, carcinogênicos e mutagênicos, o que tem trazido preocupações à saúde pública. Autores como Deckert et al. (2010) e Bardon et al. (2011) associam a resistência de *Campylobacter* aos antimicrobianos ao uso indevido destes na produção animal de aves para a terapia e prevenção de doenças.

Vários países importadores de carne de frango têm aumentado as exigências quanto à utilização de melhoradores de desempenho. Em 1999, a União Européia banii o uso de cinco antibióticos melhoradores de crescimento (avoparcina, bacitracina de zinco, espiramicina, virginamicina e tilosina) e em janeiro de 2006 também foram proibidas a utilização de mais quatro substâncias: monensina, salinomicina, avilamicina

e flavofosfolipol. Essas proibições impostas sobre os antibióticos melhoradores de crescimento na União Europeia vem promovendo intensas mudanças no cenário produtivo avícola brasileiro, levando ao estudo por parte de cientistas e empresas de potenciais produtos alternativos a estes (OLIVEIRA, 2008).

A avilamicina é um dos antibióticos mais utilizados no Brasil, por seu uso ainda ser permitido pelo Ministério da Agricultura. Entretanto, há possibilidade de os microrganismos adquirirem resistência ao antibiótico com sua adição contínua em dose subterapêutica nas dietas das aves (ALBINO, 2006). Yoshimura et al. (2000) observaram que os antibióticos avilamicina e virginiamicina, quando usados como melhoradores de desempenho em rações para frangos de corte, provocaram o aparecimento de culturas de *Enterococcus faecium* com 12,4 e 27,4% de resistência, respectivamente.

Segundo Albino et al. (2006) é inquestionável que a relação custo: benefício favorece a escolha do uso de antibióticos como aditivo melhorador de crescimento. Todavia em consequência do banimento dos antimicrobianos na ração dos animais, na Europa, tornaram-se necessários o conhecimento e a criação de meios de manipulação da microbiota intestinal, para compensar as perdas de produtividade com a retirada dos antimicrobianos melhoradores de crescimento da dieta.

Com o banimento dessas drogas as empresas de produção de carne de frango tiveram que se adaptar, melhorando práticas de gestão e biossegurança, seleção genética, controle ambiental das instalações e mudanças na composição da dieta e no programa alimentar das aves (COSTA et al., 2011). Desta forma, há necessidade em substituir os antibióticos por substâncias naturais, que garantam a eficácia nutricional das empresas produtoras de frangos de corte sem deixar resíduos mantendo os altos índices de produtividade e qualidade dos produtos finais (AGROBRASIL, 2008). Dentro desse contexto, a utilização de probióticos, prebióticos, simbióticos, ácidos orgânicos, entre outros têm recebido atenção por parte de pesquisadores como eventuais substitutos dos antibióticos utilizados como aditivos alimentares, pois não deixam resíduos nas carcaças (MENTEN & PEDROSO, 2005).

4.4.2 Probióticos

Os transtornos entéricos dos animais associados à proibição do uso de melhoradores de crescimento levaram os pesquisadores a desenvolver alternativas, e dentre elas uma das mais viáveis é a cultura de microrganismos desejáveis, que povoem o tubo digestivo, associada a fatores que favoreçam a multiplicação desses, proporcionando uma condição de equilíbrio. Microrganismos probióticos devem ser capazes de se multiplicarem e se adaptarem rapidamente ao meio intestinal da maioria dos animais e ainda inibir a proliferação daqueles considerados indesejáveis (FLEMMING & FREITAS, 2005).

As pesquisas sobre o uso de probióticos em ração animal tiveram início em 1973, quando pesquisadores finlandeses observaram em frangos, que, quando o conteúdo intestinal de aves adultas era ministrado em pintainhos de um dia, havia alteração da sensibilidade a *Salmonella* spp., prevenindo o estabelecimento deste patógeno no intestino das aves (BATISTA, 2005). Ao afetar a microbiota digestiva de forma positiva, protegem o organismo contra a colonização por bactérias nocivas (GAGGIA et al., 2010).

Probióticos são microrganismos vivos, que geram benefícios quando introduzidos no trato gastrointestinal, competindo com a flora patogênica por nutrientes, locais de adesão no epitélio intestinal e sintetizando metabólitos (ácidos orgânicos) que criam resistência ao crescimento de organismos patogênicos podendo realizar a

“exclusão competitiva” de bactérias indesejáveis criando resistência ao crescimento de organismos patogênicos (ITO et al., 2005; JUNQUEIRA & DUARTE, 2005). Tem como características ideais: ser do hospedeiro de origem; não patogênico; resistir ao ácido gástrico e bile; aderir no epitélio e muco; persistir no trato intestinal; produzir componentes inibitórios; modular a resposta imune, e alterar a atividade microbiana local (PATTERSON & BURKOLDER, 2003). Segundo Fuller (1989) para serem considerados probióticos, “os microrganismos deveriam ser produzidos em larga escala, permanecerem estáveis e viáveis em condições de estocagem, devem ser capazes de sobreviver no ecossistema intestinal e possibilitar, ao organismo, os benefícios da sua presença”.

Quando suplementados na dieta, tem o objetivo de colonizar o trato gastrointestinal com microrganismos benéficos por meio de exclusão competitiva, garantindo melhoria na saúde do animal e maior eficiência no aproveitamento dos nutrientes da ração. Além da exclusão competitiva, também são observados antagonismo direto e melhoria da resposta imune humoral. O termo “exclusão competitiva” é utilizado para descrever a inabilidade de uma população microbiana estabelecer-se no intestino devido à presença de outra população. A exclusão competitiva é uma importante ferramenta na prevenção das doenças intestinais, principalmente àquelas causadas por *E. coli* e *Salmonella* spp. (CORCIONIVOSCHI et al., 2010).

Os principais microrganismos bacterianos considerados como probióticos pertencem ao grupo das bactérias lácticas, especialmente as dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, além de espécies enterocócicas, *Enterococcus faecalis* e *E. faecium*. Entre os probióticos para aves que não pertencentes ao grupo das bactérias lácticas, destacam-se espécies dos gêneros *Escherichia*, *Propionibacterium* e *Bacillus* (MORAIS & JACOB, 2006). Alguns outros probióticos são fungos microscópicos, como espécies de leveduras pertencentes a espécies de *Saccharomyces cerevisiae* (LUTFUL KABIR, 2009).

De acordo com Ferreira (2000), quanto maior for à heterogeneidade de microrganismos que compõe a cultura, maior a eficácia do probiótico, ou seja, a atuação está dependente da quantidade e características das cepas dos microrganismos utilizados na elaboração. *Bacillus subtilis*, *B. natto*, *B. megaterium*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. casei*, *Streptococcus lactis*, *S. faecalis*, *S. termophilus* e *Saccharomyces cerevisiae*, são exemplos destes microrganismos.

Sabe-se que os mecanismos de ação dos probióticos, está relacionada à competição por sítios de ligação (exclusão competitiva), ou seja, os microrganismos probióticos ocupam sítios de ligação na mucosa intestinal, formando uma barreira física às microrganismos patogênicos. Além deste mecanismo, aos microrganismos probióticos competem por aminoácidos e açúcares, auxiliando a inibição de bactérias enteropatogênicas. Podendo ainda, produzir ácidos orgânicos e bacteriocinas que reduzem o pH intestinal e não permitem o desenvolvimento bacteriano. Além disto, podem estimular o sistema imune a produzir anticorpos, pela ativação de macrófagos, proliferação de linfócitos (LUQUETTI et al., 2005).

Para uma boa eficiência, deve-se utilizar os probióticos já nos primeiros dias de vida, no início da colonização da microbiota intestinal, para que ocorra a exclusão competitiva, principalmente beneficiando um bom equilíbrio entre os microrganismos benéficos e para se obterem, assim, melhores resultados (JUNQUEIRA et al., 2001; LORENÇON et al., 2007). Segundo Andreatti Filho & Silva (2008), a administração dos probióticos logo na chegada das aves ao aviário ou mesmo, ainda, no incubatório, é a mais indicada diante a possibilidade cada vez mais frequente da contaminação precoce

por *Salmonella* spp. O modo de administração dos probióticos pode ser o mais variado possível (adicionado na ração, em água de bebida, pulverização sobre as aves, inoculação em ovos embrionados, através da cama usada em cápsulas gelatinosas e via oro-esofágica), e determina uma melhor ou pior capacidade de colonização intestinal pelas bactérias presentes no produto utilizado (ANDREATTI FILHO & SILVA, 2008).

Os probióticos podem melhorar o aproveitamento dos alimentos e reduzir a excreção de nutrientes. O uso de probióticos com alta atividade enzimática fornece benefícios adicionais nos termos de reduzir-se o custo do suplemento enzimático (YU et al., 2007). Gaggia et al. (2010) também definiram algumas características esperadas e critérios de segurança dos probióticos: não-tóxico e não-patogênico; identificação taxonômica precisa; habitante natural da espécie alvo; produção de substâncias microbianas; antagonismo com bactérias patogênicas; modulação de resposta imune; capacidade de exercer pelo menos uma propriedade promotora de saúde cientificamente comprovada; estabilidade genética; receptividade da estirpe e estabilidade das características desejadas durante o processamento, armazenamento e fornecimento; viabilidade em altas populações; propriedades organoléptica e tecnológica desejáveis quando incluídos em processos industriais e colonização, sobrevivência e ser metabolicamente ativo no sítio de ação (resistência ao suco gástrico e bile; persistência no trato gastrointestinal; adesão ao epitélio ou muco e competição com a microbiota residente).

Os resultados encontrados em pesquisas na produção de frangos de corte, relativas ao uso de probióticos, são contraditórios. Essa contradição observada entre os trabalhos justifica-se mediante os dados obtidos em relação à idade do animal, tipo de probiótico utilizado, níveis de dose, composição da dieta, estratégia de alimentação, interação com drogas e viabilidade de microrganismos a serem agregados às rações e as condições de armazenamento delas (ARAÚJO et al., 2007; CLOSE, 2000). Além disso a maioria dos conceitos sobre o mecanismo de ação dos probióticos são baseados em pesquisas realizadas em mamíferos, sendo muitos deles não aplicáveis às aves. Nestes animais, estima-se que a influência da microbiota do trato gastrointestinal na produtividade e sanidade seja mais evidente que em outras espécies monogástricas (CORCIONIVOSCHI et al., 2010).

Para Stern (2008), o uso de exclusão competitiva de mucosa em pintos no dia do nascimento parece não ter influência na capacidade de colonização de *Campylobacter*. Segundo Macari & Furlan, 2005 os probióticos, apresentam-se não como substitutos, mas como alternativa aos antibióticos melhoradores de desempenho.

Waititu et al. (2013) avaliaram o efeito de uma mistura de 3 cepas de *Bacillus* e uma de *Propionibacterium* spp. sobre o desempenho e resposta imune na produção de aves de corte e concluíram que ambos microrganismos mostraram um efeito antiinflamatório no íleo, mas a constituída de *Bacillus* teve mais efeitos sobre a imunidade local e sistêmica.

Arsi et al. (2015) utilizaram isolados bacterianos de *Bacillus* spp. com atividade anti- *Campylobacter in vitro* e avaliaram sua eficácia *in vivo* após inoculação oral ou intracloacal em pintinhos. Eles demonstraram que, quando administrados por via oral, apenas um isolado reduziu 1 log na contagem de *Campylobacter* cecal, enquanto que quando administrado intracloacalmente, seis isolados produziram uma redução de 1-3 log em cecal *Campylobacter* em galinhas de 14 dias. Santini et al. (2010) observaram que concentração de *C. jejuni* foi reduzida nos animais em que *Bifidobacterium longum* foi administrada, sendo que sua presença nas excretas das aves era elevada mesmo após seis dias sem ser fornecido. Sen et al., (2012), ao investigarem o efeito da suplementação dietética de *B. subtilis* em frangos de corte, verificaram que houve

melhorias no desempenho das aves e na retenção de nutrientes, além de aumentar a altura das vilosidades do duodeno e íleo e reduzir o número de clostrídios no ceco.

Robyn et al. 2013 observaram que contrariamente às experiências *in vitro*, nas quais *E. faecalis* inibiu o crescimento de *C. jejuni*, não foi observada inibição *in vivo* independentemente da quantidade de inóculo.

4.4.3 Prebióticos

Embora o termo prebiótico tenha sido adotado somente em 1995 (GIBSON & ROBERFROID, 1995) os estudos sobre estes componentes são bem mais antigos. Na década de 1950, a descoberta de que o leite humano possui compostos que atuam como inibidores da adesão de bactérias patogênicas na superfície epitelial, e que estes ingredientes potencializam a multiplicação das populações de bifidobactérias e lactobacilos incentivaram outras explorações sobre o efeito do consumo de prebióticos e sua influência sobre a microbiota intestinal benéfica (STRICKLING, 2000).

O termo prebiótico é utilizado para designar um ou mais grupos de ingredientes alimentares, que não são digeridos pelas enzimas digestíveis normais, mas que atuam estimulando (alimentando) seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou mais espécies de bactérias benéficas no intestino e induzindo a efeitos desejáveis sistêmicos ou na luz intestinal (ANDREATTI FILHO, 2008). Em 2007, Roberfroid novamente definiu um prebiótico como "um ingrediente seletivamente fermentado que permite mudanças específicas, tanto na composição e / ou atividade na microflora gastrointestinal que confere benefícios ao bem-estar e à saúde do hospedeiro". Alguns açúcares absorvíveis ou não, fibras, álcoois de açúcares e oligossacarídeos estão dentro deste conceito (JUNQUEIRA & DUARTE, 2005). Os oligossacarídeos são carboidratos constituídos de cadeias curtas de polissacarídeos, compostos de três a dez açúcares simples ou ligados entre si que apresentam função prebiótica (ANDREATTI FILHO & SILVA, 2008).

A principal forma de ação dos prebióticos é sobre a modulação benéfica da microbiota nativa presente no hospedeiro e os efeitos resultantes do uso de prebióticos são evidenciados pela multiplicação das populações microbianas benéficas, pela melhora nas condições luminais, aumentando seu valor osmótico (IMMERSEEL et al., 2004), nas características anatômicas do trato gastrointestinal, promovendo o aumento da superfície de absorção da mucosa intestinal, e no sistema imune e, em alguns casos, pela melhora no desempenho animal (SILVA & NÖRNBERG, 2003).

Gibson et al. (2004) e Roberfroid et al. (2007) qualificaram os critérios para um prebiótico como: 1) resistência à acidez gástrica, à hidrólise por enzimas de mamíferos, e à absorção gastrointestinal; 2) fermentação por microbiota intestinal; e 3) estimulação seletiva da multiplicação e atividade das bactérias intestinais que contribuem para a saúde e o bem-estar.

Os prebióticos mais importantes são hexoses como glicose, frutose, galactose e manose e pentoses como ribose, xilose e arabinose (IMMERSEEL et al., 2004), sendo que frutose e manose são componentes dos dois mais importantes grupos de prebióticos utilizados atualmente: frutoligossacarídeos (FOS) e mananoligossacarídeos (MOS), respectivamente. De acordo com Silva & Nörnberg (2003) foi constatado que, nem todos agiam como estimuladores seletivos do desenvolvimento dos microrganismos benéficos no trato gastrointestinal. O fato de não serem digestíveis, mas fermentáveis, não significava que iriam atuar como prebióticos (MacFARLANE & CUMMINGS, 1999). Compostos resistentes à digestão por ácidos, sais e enzimas produzidos pelo

organismo animal, mas potencialmente fermentáveis (celulose, hemiceluloses, amido resistente, oligossacarídeos, compostos fenólicos, etc).

As substâncias que mais têm sido estudadas como aditivos alimentares prebióticos são os oligossacarídeos, especialmente os frutoligossacarídeos (FOS), glucoligossacarídeos (GOS) e mananoligossacarídeos (MOS). FOS são polímeros ricos em frutose podendo ser naturais derivados de plantas (inulina) ou sintéticos resultantes da polimerização da frutose (GIBSON & ROBERFROIDE, 1995). GOS e MOS são obtidos da parede celular de leveduras, tendo em sua constituição, principalmente proteína e carboidrato. O MOS consiste de fragmentos de *Saccharomyces cerevisiae* com uma estrutura complexa de manose fosforilada, glicose e proteína (MACARI & FURLAN, 2005).

Segundo Passos & Park (2003) FOS são conhecidos como prebióticos, por promover o crescimento de probióticos, como *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidus* e *Enterococcus faecium*, promovendo, estabilizando e aumentando a proliferação dessas bactérias benéficas no trato gastrointestinal do hospedeiro. A incorporação de FOS na dieta ou uma suplementação intensifica a viabilidade e adesão dessas bactérias benéficas no trato gastrointestinal (TGI), mudando a composição de sua microbiota. Ao mesmo tempo, bactérias patogênicas incluindo *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e outras são inibidas. Enquanto os MOS, parecem ter características específicas que permitem impedir a colonização intestinal por patógenos (METEN, 2005). Muitos desses patógenos utilizam fimbrias para adesão à mucosa intestinal e esta adesão ocorre em receptores constituídos de mananos. Os MOS adicionados à dieta podem aderir às fimbrias bacterianas bloqueando a adesão dessas bactérias à superfície intestinal.

Os prebióticos têm sido apontados como possíveis substitutos aos antibióticos e têm seus efeitos baseados na redução da multiplicação de muitas bactérias enteropatogênicas pela redução do pH, resultante do aumento da produção de ácido láctico nos cecos (BELLAYER, 2005). Albino (2006) constatou que o uso de aditivo nas rações melhorou o desempenho de frangos de corte e que prebióticos à base de mananoligossacarídeo podem substituir o antibiótico avilamicina em rações para frangos de corte. Rocha (2010) concluiu que os prebióticos à base de mananoligossacarídeos, combinados ou não com ácidos orgânicos fumárico e propiônico, podem substituir os antibióticos avilamicina e colistina nas rações de frangos de corte.

Estudos utilizando MOS demonstram que esses compostos tem potencial de estimular a multiplicação de bactérias benéficas além de inibir as patogênicas como *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*, possuindo efeito positivo sobre a saúde intestinal e desempenho das aves (SPRING et al., 2000; ALBINO et al., 2006; BAURHOO et al., 2009, CORRIGAN et al., 2011). Em seu estudo, KIM et al., (2011) adicionaram prebiótico em diferentes dosagens na ração de frangos de corte e verificaram que as populações de *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli* foram reduzidas, enquanto a de *Lactobacillus* apresentaram crescimento significativo.

O efeito dos prebióticos sobre a integridade intestinal das aves foi positiva no estudo conduzido por Silva et al. (2008), assemelhando-se ao apresentado pelos antibióticos melhoradores de desempenho. No entanto, Ramos et al. (2011) relataram que o uso dos prebióticos diminuiu a altura das vilosidades no duodeno das aves.

4.4.4 Simbióticos

Os simbióticos são definidos como uma mistura de probióticos e prebióticos que agem beneficiando o hospedeiro ao melhorar a sobrevivência dos suplementos

dietéticos microbianos no trato gastrointestinal. Estes compostos atuam estimulando seletivamente a multiplicação e/ou metabolismo de certo grupo de microrganismo (GIBSON & ROBERFROID, 1995).

A combinação entre prebióticos e probióticos podem melhorar a taxa de sobrevivência dos probióticos durante sua passagem no trato gastrointestinal, contribuindo para a estabilização e/ou aperfeiçoamento dos efeitos probióticos (AWAD et al., 2008). Os benefícios do uso dos simbióticos incluem: 1) reforço da resposta imune; 2) aumento da permeabilidade intestinal; 3) equilíbrio da microbiota intestinal; 4) melhora da função imunológica da barreira intestinal e 5) regulação de citocinas pró-inflamatórias (USAMI et al., 2010).

Os suplementos simbióticos são uma mistura de espécies probióticas, atuantes no intestino delgado, com prebióticos, que estimulam as bactérias já existentes no cólon e constituem um novo conceito na utilização de aditivos em dietas para aves (JUNQUEIRA & DUARTE, 2005; PATTERSON & BURKHOLDER, 2003). Desta forma, pode-se fornecer componentes da microbiota intestinal e também substâncias prebióticas específicas que, em conjunto, podem estimular o desenvolvimento e a atividade desta mesma microbiota, podendo potencializar o efeito de ambos os componentes.

Para Immerseel et al. (2004) a combinação entre probiótico e prebiótico poderia melhorar a sobrevivência do primeiro, pela disponibilidade do seu substrato. Isto resultaria em vantagens para o hospedeiro, tanto pela presença da microbiota benéfica quanto pela fermentação, que atuam também no desenvolvimento fisiológico e imunológico do trato digestório, melhorando a digestibilidade, absorção de alimentos e resistência às infecções e toxinas (ANDREATTI FILHO & SILVA, 2008). Maiorka et al. (2001) afirmaram que as bactérias benéficas, tanto exógenas (do probiótico) como as endógenas, têm a sua sobrevivência e colonizações aumentadas no trato gastrointestinal superior, graças à presença de um substrato adequado para a sua nutrição. Desse modo, a presença da bactéria benéfica, exógena e/ou endógena, se consolida, podendo exercer todas as suas ações fisiológicas.

Abaza et al. (2008) avaliaram a adição de *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformes* na dieta de frangos comparando com bacitracina de zinco e virginamicina. A adição do simbiótico nas dietas de frangos propiciou aumento no ganho de peso corporal, diminuiu o percentual de gordura abdominal e melhorou o coeficiente de digestibilidade da matéria seca e da proteína bruta. Também Caramori Júnior et al., (2008) verificaram que a suplementação de simbióticos melhoraram a conversão alimentar das aves. Já Muralolli (2008), pesquisando o efeito de probióticos, prebióticos e simbióticos sobre o desempenho de frangos de corte, observou que, durante o período total de criação, de 1 a 42 dias, e nas condições que foram criados, não foi possível mostrar a influência dos aditivos testados, segundo os parâmetros zootécnicos avaliados.

Segundo Junqueira & Duarte (2005) a inoculação constante de simbióticos reduz a incidência de enterites, controla patógenos intestinais como *Salmonella*, *Clostridium* spp., *Campylobacter* spp., melhorando a absorção de nutrientes, a eficiência alimentar, a taxa de crescimento e uniformidade dos lotes.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Aspectos Éticos

Este estudo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, sob o protocolo número 008/2016.

5.2 Criação das aves

5.2.1 Local do Experimento

O experimento foi realizado no período de janeiro e fevereiro de 2017, no Centro de Pesquisas Avícolas do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ) localizado no município de Pinheiral, RJ. O aviário utilizado possui construção mista, de alvenaria e madeira, com telhado em duas águas, posicionado no sentido leste oeste. As laterais são teladas com tela de arame galvanizado, malha duas polegadas e revestidas por lonas impermeabilizadas de cor azul (Figura 1) O centro é constituído por um aviário formado por 36 boxes experimentais com as dimensões de 2,0 X 1,5 metros por box (Figura 2). As aves foram alojadas em densidade de 10 aves/metro quadrado (m^2). A ambiência do aviário experimental foi mantida através de sistema ventilação (ventiladores convencionais), refrigeração (nebulizadores) e aquecedor automático a gás (Figura 3). Os bebedouros foram automáticos e comedouros “tipo tubular”.



Figura 1 - Galpão experimental do Centro de Pesquisa Avícolas do IFRJ. Vista externa.



Figura 2 - Galpão experimental do Centro de Pesquisa Avícolas do IFRJ. Vista interna.



Figura 3 - Sistema de aquecimento e ventilação do galpão experimental do Centro de Pesquisa Avícolas do IFRJ.

5.2.2 População de estudo

Foram utilizados 720 frangos de corte, fêmeas, da linhagem Cobb. As aves foram obtidas com 1 dia de idade (Figura 4). Os pintos foram provenientes de matrizes vacinadas contra doença de Gumboro, Bronquite Infecciosa das Aves, doença de

Newcastle, Encefalomielite, Coriza infecciosa, Varíola aviária e Bouba e vacinados ainda no incubatório, contra Doença de Marek.



Figura 4 - Aves alojadas com 1 dia de idade.

5.2.3 Manejo das aves

O manejo das aves obedeceu aos padrões da avicultura industrial, com limpeza diária de comedouros e bebedouros. O manejo foi padronizado durante todo experimento. O substrato utilizado como cama foi maravalha reutilizada por três lotes, visando aumentar o desafio de campo e imitar uma prática comum nas criações comerciais.

A temperatura do ambiente foi mantida na zona de conforto das aves durante todo período experimental. As temperaturas máximas e mínimas foram observadas, utilizando termômetro de bulbo seco localizado em dois pontos distintos e extremos do galpão. As rações experimentais foram formuladas e elaboradas no Centro de Pesquisas Avícolas a base de milho, farelo de soja, suplemento vitamínico e mineral, para atender às exigências nutricionais da linhagem Cobb preconizadas por Rostagno et al., (2011) conforme tabela 1, sendo fornecidas *ad libitum* durante todo o experimento.

Tabela 1- Composição percentual e calculada da dieta inicial.

Ingredientes	%
Milho (7,5%)	52,000
Farelo de soja (45,60%)	41,000
Óleo de soja	2,620
Fosfato bicálcio	2,050
Calcário calcítico	0,900
Cloreto de sódio	0,550
DL-metionina	0,350
L-lisina HCl	0,210
L-treonina	0,060
Suplemento vitamínico ¹	0,100
Suplemento mineral ²	0,100
Cloreto de colina	0,050
Antioxidante ³	0,010
Total %	100,00
Composição calculada	
Energia metabolizável (Kcal/Kg)	2960,00
Proteína bruta (%)	22,900
Cálcio (%)	0,960
Fósforo disponível (%)	0,490
Sódio	0,220
Lisina total (%)	1,410
Lisina digestível (%)	1,300
Metionina total (%)	0,690
Metionina digestível (%)	0,660
Metionina +cistina total (%)	1,050
Metionina + cistina digestível (%)	0,960
Treonina total (%)	0,960
Treonina digestível (%)	0,840
Triptofano total (%)	0,290
Triptofano digestível (%)	0,260
Ácido linoléico	2,740

¹ Níveis de garantia por quilo do produto: vitamina A, 10.000.000 UI; vitamina D3, 2.000.000 UI; vitamina E, 30.000 UI; vitamina K3, 3.000,0 mg; vitamina B1, 2.000,0 mg; vitamina B2, 2.500,0 mg; vitamina B6, 4.000,0 mg; vitamina B12, 5.000,0 mg; ácido pantotênico, 12.000,0 mg; niacina, 12.500,0 mg; ácido fólico, 1000,0 mg; biotina, 100,0 mg;

² Manganês, 16,0g; zinco, 100,0g; ferro, 100,0g; cobre, 20,0g; iodo, 2,0 g; selênio, 0,25g; nicarbazina, 125g; e veículo q. s. p. – 1000,00g.

³ Antioxidante Beta Hidroxi-butil Tolueno (BHT)

As rações foram suplementadas com diferentes aditivos de acordo com o grupo de tratamento que será descrito no tópico 5.2.4 a seguir.

5.2.4 Dietas experimentais: Tratamentos

As aves foram pesadas no primeiro dia de experimento e alojadas nos boxes de forma inteiramente casualizada e distribuídas em 4 diferentes grupos de tratamento: Probiótico, Simbiótico (Probiótico + Prebiótico), Antibiótico e Controle. Foram 6 repetições (boxes) para cada tratamento, na densidade de 10 aves por metro quadrado

(m²), sendo o total de 30 aves por box, onde as aves permaneceram até a data da coleta dos *swabs* que ocorreu aos 42 dias de idade.

Os tratamentos foram distribuídos da seguinte forma:

- a) Probiótico: grupo alimentado com ração suplementada com probiótico administrado durante todo o período de criação das aves.
- b) Simbiótico: grupo alimentado com ração adicionada de simbiótico administrado durante todo o período de criação das aves.
- c) Antibiótico: grupo alimentado com ração adicionada de antibiótico.
- d) Controle: grupo alimentado apenas com dieta basal sem qualquer aditivo.

5.2.5 Aditivos

Foram utilizados probióticos e prebióticos comerciais disponíveis no mercado. O produto foi misturado na ração conforme indicação do fabricante durante todo período de vida das aves.

5.2.5.1 Probiótico

Foi utilizado o probiótico comercial Protexix Concentrate[®] da Novartis composto pelas cepas *Lactobacillus plantarum* 1.26 x 10⁸ UFC/g, *Lactobacillus bulgaricus* 2.06 x 10⁸ UFC/g, *Lactobacillus acidophilus* 2.06 x 10⁸ UFC/g, *Lactobacillus rhamnosus* 2.06 x 10⁸ UFC/g, *Bifidobacterium bifidum* 2.00 x 10⁸ UFC/g, *Streptococcus thermophilus* 4.10 x 10⁸ UFC/g e *Enterococcus faecium* 6.46 x 10⁸ UFC/g.

Tabela 2 - Quantidade adicionada de probiótico em função da fase de criação da ave.

Fase	Quantidade g/ton de ração
Inicial (1-21 dias)	150
Crescimento (22-34 dias)	100
Finalização (35-42 dias)	50

5.2.5.2 Prebiótico

Foi utilizado o prebiótico BioMos da NutriCamp que tem como princípio ativo um mananoligossacarídeo derivado da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

5.2.5.3 Simbiótico

Foi utilizado o probiótico comercial Protexix Concentrate[®] adicionado do prebiótico BioMos[®] da NutriCamp.

Tabela 3 - Quantidade adicionada de simbiótico em função da fase de criação da ave.

Fase	Quantidade g/ton de ração
Inicial (1-21 dias)	150 (Protexin)/ 100 (BioMos)
Crescimento (22- 34 dias)	100 (Protexin)/ 100 (BioMos)
Finalização (35-42 dias)	50 (Protexin)/ 100 (BioMos)

5.2.5.3 Antibiótico

O grupo antibiótico foi suplementado com o melhorador de desempenho avilamicina.

Tabela 4 - Quantidade adicionada de antibiótico em função da fase de criação da ave.

Fase	Quantidade g/ton de ração
Inicial (1-21 dias)	125
Crescimento (22- 34 dias)	125
Finalização (35-42 dias)	Não foi utilizado

5.3 Índices Zootécnicos

O peso das aves e o consumo da ração foram quantificados por meio de pesagens semanais com o objetivo de determinar as variáveis de desempenho nos intervalos: 01-07 dias; 01-21 dias; 01-42 dias. As variáveis mensuradas em todos os boxes foram: ganho de peso médio (GP), consumo médio de ração (CR), conversão alimentar (CA) e mortalidade (M).

Ganho de peso médio (g) – determinado pela diferença entre o peso médio inicial das aves e o peso médio final do respectivo intervalo. As pesagens foram realizadas seguindo-se o mesmo horário e sequência de pesagem durante todo experimento.

Consumo médio de ração (g) – obtido pela diferença entre o peso da ração fornecida durante o respectivo intervalo e o peso da sobra ao final do deste, que é dividido pelo número de aves do box.

Conversão alimentar (g/g) – obtida pela relação entre o consumo médio de ração e o ganho de peso médio no respectivo intervalo de criação.

Mortalidade (%) - anotada diariamente. Calculada pela relação entre o número de aves que morreram durante o respectivo intervalo e o número inicial de aves, que é multiplicada por cem.

Também foi avaliado o rendimento de carcaça, cortes e vísceras, para isso ao final dos 42 dias de idade foi realizado um período de jejum e dieta hídrica de 8h. Posteriormente, duas aves de cada unidade experimental (box) foram selecionadas, pesadas e identificadas por etiquetas plásticas numeradas. As aves foram eutanasiadas, sob supervisão de um Médico Veterinário, por meio de deslocamento cervical e procedeu os processos de exsanguinação, escaldagem e retirada das penas, cabeça e pés para realização da avaliação do rendimento de carcaça e cortes comerciais (peito, dorso, coxa + sobrecoxa e asa).

As carcaças evisceradas (sem cabeça e sem pés) foram submetidas a cortes comerciais (peito, dorso, coxas, sobrecoxas, asas). As vísceras comestíveis (fígado, coração e moela) foram separadas para pesagem em balança digital, sendo que a moela foi pesada após a sua abertura e eliminação do conteúdo alimentar presente. O rendimento percentual dos cortes e vísceras comestíveis foi calculado em função do peso da carcaça eviscerada (sem cabeça e pés), pela fórmula %R cortes ou vísceras = (Peso do corte ou víscera x 100) / Peso Carcaça.

5.4 Obtenção das Amostras e Delineamento Experimental

As amostras foram colhidas através de *swabs* de Cary & Blair estéreis diretamente das cloacas das aves e imediatamente depositadas em tubos estéreis contendo 2 mL de solução salina peptonada 0,1% identificados com correspondência numérica e mantidos em caixa isotérmica com gelo reciclável por 3 horas até o processamento no laboratório. Foram coletados aleatoriamente, 10 *swabs* de cloaca de cada repetição dos tratamentos perfazendo um total de 240 *swabs* (Tabela 2).

Tabela 5 – Tratamentos e total do número de aves criadas e avaliadas para a presença de *Campylobacter*.

Tratamento	Nº de aves criadas	Nº de aves avaliadas
Probiótico	180	60
Simbiótico	180	60
Antibiótico	180	60
Controle	180	60
Total	720	240

No laboratório procedeu-se o plaqueamento direto das amostras para detecção de *Campylobacter* conforme recomendado para isolamento de material fecal (ISO/DIS 10.272-1, 2015). Concomitantemente uma alíquota de 1 mL de cada tubo de amostra foi transferida para tubo Eppendorf e centrifugado por 5 min 12.900 rpm, descartado o sobrenadante e o *pellet* congelado para posterior extração do DNA e realização dos ensaios de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

5.5 Detecção e Identificação Fenotípica de *Campylobacter*

As amostras foram processadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos no Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFRRJ. Ao chegarem ao laboratório os *swabs* coletados foram submetidos aos procedimentos referentes à semeadura e posterior isolamento para caracterização fenotípica de *Campylobacter*.

5.5.1 Semeadura em placas e isolamento

Após a homogeneização por vortex foi realizada a semeadura direta das amostras de *swabs* de cloaca por espalhamento de alíquotas de 0,1mL da solução salina peptonada 0,1% em placas contendo Ágar Columbia (Difco) adicionada de carvão ativado (0,4 g%) e 5% de solução redutora de radicais superóxidos (FBP), conforme Filgueiras & Hofer (1989) e suplemento seletivo de Bolton (Fluka).

Após incubação das placas por 48 h em atmosfera de microaerofilia gerada pela passivação do cobre (85% N₂, 10% CO₂, 5% O₂) a 42° C, foram avaliadas quanto à presença de colônias presuntivas de *Campylobacter* (espraiadas, crescendo ao longo da estria, geralmente com brilho d'água). A seguir as colônias suspeitas foram isoladas e identificadas mediante exames morfológicos (coloração de Gram, observação de motilidade em microscópio de campo escuro) e testes bioquímicos. A ausência de colônias características foi considerada negativa para o método bacteriológico. Nos casos de tratar-se de bastonetes Gram negativos delgados, em forma de vírgula, foi pesquisada a presença das enzimas catalase e oxidase.

5.5.1.1 Produção da catalase

O teste de produção de catalase foi realizado misturando-se em uma lâmina de vidro a cultura proveniente do Ágar Columbia (5.5.1) com aproximadamente 50 µl de peróxido de hidrogênio a 3% (v/v). A produção de catalase é evidenciada pela ação sobre o peróxido de hidrogênio decompondo-o, podendo ser observada uma efervescência rápida e marcante (KONEMAN et al., 2001). A produção de bolhas em 30 segundos indica a produção da catalase.

5.5.1.2 Teste da oxidase

O teste de oxidase é baseado na produção intracelular da enzima oxidase pela bactéria

Foi realizado em papel de filtro estéril, impregnado com solução aquosa a 1% de oxalato de paramino-dimetilamina. Com auxílio de uma alça de plástico, espalhou-se a colônia a ser testada sobre o papel de filtro e observou-se se houve formação imediata da cor rosa, indicando positividade para o teste.

5.5.2 Manutenção dos isolados

Para a realização das provas bioquímicas os isolados foram mantidos em Agar Brucella semi-sólido na temperatura de 37°C por até 15 dias.

5.5.3 Identificação dos isolados

Uma vez caracterizadas como pertencentes ao gênero *Campylobacter* pelos métodos presuntivos, foram determinadas as espécies e subespécies por provas bioquímicas: fermentação da glicose, redução do nitrato a nitrito, crescimento ou não em presença de glicina (1%) e de cloreto de sódio (3,5%), formação de gás sulfídrico (H₂S) em TSI (meio de Tríplice Açúcar Ferro), hidrólise do hipurato, tolerância às temperaturas de 25 e 42°C e sensibilidade ao ácido nalidíxico (30 µg) e à cefalotina (30 µg) (HOLT et al., 1994; OIE, 2008). Como controles foram utilizadas as cepas de *Campylobacter jejuni*/ CCAMP 419 e *Campylobacter coli*/ CCAMP 1003.

5.5.3.1 Sensibilidade ao ácido nalidíxico e cefalotina

A partir de colônias isoladas do crescimento em Ágar Columbia (5.5.2) foi preparada uma suspensão, equivalente a 0,5 na escala McFarland, em caldo Brucella. Uma alíquota de 0,2 µL foi semeada em ágar Muller-Hinton suplementado com 5% de sangue de carneiro. Em seguida foram adicionados os discos de ácido nalidíxico e cefalotina com concentração de 30 µg cada. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em atmosfera de microaerofilia. A ocorrência de crescimento ao redor do disco foi classificada como resistente e a presença de halo de inibição de crescimento, de qualquer tamanho, foi classificada como sensível.

5.5.3.2 Hidrólise do hipurato de sódio

Para avaliar a capacidade dos isolados bacterianos em hidrolisar o hipurato foi feita uma suspensão da cultura proveniente do Ágar Columbia (5.5.2) em solução de hipurato de sódio 1%. Os tubos foram homogeneizados e incubados a 37 °C por 4 horas. Em seguida foi adicionado 0,2 mL de ninidrina 3,5%. As amostras foram novamente incubadas a 37°C por 10 minutos. O aparecimento de coloração violeta escuro indica reação positiva para hidrólise do hipurato de sódio.

Quadro 1 – Perfil bioquímico de *C. coli* e *C. jejuni*

Provas Bioquímicas	<i>C. coli</i>	<i>C.jejuni</i>
Catalase	+	+
Oxidase	+	+
Fermentação da glicose	-	-
Redução do nitato	+	+
Crescimento em glicina	+	+
Crescimento em NaCl	-	-
Produção de H ₂ S	-	-
Suscetibilidade ao ácido nalidíxico (30µg) e cefalotina (15µg)	resistente	resistente
Hidrólise do hipurato	-	+

5.5.4 Armazenamento e estocagem dos isolados

As culturas estoque foram mantidas congeladas a -20°C em caldo Brucella adicionado de 20% (vol/vol) de glicerol estéril.

5.6 Detecção e Identificação Genotípica de *Campylobacter*

As etapas de extração do DNA e da identificação genotípicas a seguir foram realizadas no Laboratório Multi-usuário de Biologia Molecular (BIOMOL) localizado no prédio Projeto Sanidade Animal UFRRJ/EMBRAPA.

Todas as amostras coletadas foram submetidas à análise da identificação das espécies de *Campylobacter* por PCR. A extração e purificação do DNA foi realizada com o auxílio do método de extração utilizando guanidina e sílica seguindo protocolo próprio. Posteriormente foram procedidas as técnica de PCR e eletroforese em gel de agarose.

5.6.1 Extração do DNA

As amostras obtidas como descrito em 5.4, foram descongeladas e ressuspensas com 100 µL de tampão de lise (0,5 M EDTA, 1M Tris-HCl, 6M NaCl, dH₂O, SDS 10%) e colocadas em estufa a 56°C por 15 minutos. Após foi adicionado 300 µL de tampão *Binding* (tiocianato de guanidina - GuSCN, dH₂O, 1M Tris, 0,5M EDTA, Triton X-100) e 40 µl de terra diatomácea (dH₂O, *Diatomaceous Earth*, TE) e colocadas em estufa com agitação 56°C/ 950 rpm por 15 minutos. Terminado esse tempo foi centrifugado por 2 minutos 12900 rpm. Descartou-se o sobrenadante por inversão dos tubos e o *pellet* foi lavado duas vezes com 300µL de etanol 95% sempre com centrifugações a 12.900 rpm por 2 min. Após o descarte do sobrenadante os tubos foram incubados destampados a 70°C por 10 minutos e após a secagem os *pellets* foram ressuspensos com 100 µL de tampão TE. As amostras foram incubadas a 56°C por 10 minutos e centrifugadas a 12900 rpm por 5 minutos e armazenadas a -20 °C até o momento realização dos ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR).

5.6.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para estabelecer o limite de detecção da PCR foram realizados testes com culturas puras de *Campylobacter jejuni* - CCAMP 419) e *Campylobacter coli* - CCAMP 1003 em suspensões contendo quantidade decrescente de células.

5.6.2.1 Amplificação dos genes

Após terem sido estabelecidos os limites de detecção e a padronização da PCR, foram testados cinco primers: um primer para detecção do gênero *Campylobacter* (16SRNA) e dois específicos para cada uma das espécies de *C. jejuni* (*mapA* e *hipO*) e *C. coli* (*ask* e *ceuE*). Os iniciadores das PCR para detecção do gênero *Campylobacter*, *C. jejuni* e *C. coli* estão listados na Tabela 6, juntamente com as condições de ciclagem. Todos os iniciadores foram sintetizados pela Invitrogen (São Paulo, Brasil).

Tabela 6 - Oligonucleotídeos e programas de amplificação utilizados.

Primers	Programa	Gene Alvo	Tamanho	Referência
C412F 5'-GGATGACACTTTTCGGAGC-3' C1228R 3'-CATTGTAGCACGTGTGTC-5'	25 ciclos 94°C -1 min 55°C 1 min 72°C 1 min	16SRNA (<i>Campylobacter</i>)	816pb	Linton et al., 1996
Hip400f 5'-GAAGAGGGTTTGGGTGGTG-3' Hip1134r 3'-AGCTAGCTTCGCATAATAACTTG-5'	25 ciclos 94°C - 1min 66°C - 1min 72°C - 1min	<i>hipO</i> (<i>C. jejuni</i>)	735pb	Linton et al., 1997
MDmapA1Upper 5'- CTATTTTATTTTGGAGTGCTTGTG -3' MDmapA2Lower 3'- GCTTTATTTGCCATTTGTTTTATTA-5'	35 ciclos 94°C - 1min 55°C - 1 min 74°C - 1 min 74°C 5- min extensão final	<i>mapA</i> (<i>C. jejuni</i>)	589pb	Stucki et al., 1995
CC18F 5'- GGTATGATTTCTACAAAGCGAG- 3' CC519R 3'-ATAAAAGACTATCGTCGCGTG- 5'	25 ciclos 94°C - 1min 60°C - 1 min 74°C - 1min	<i>ask</i> (<i>C. coli</i>)	500pb	Linton et al., 1997
COL3 5'-ATTTGAAAATTGCTCCAATATG - 3' MDCOL2 5'-TGATTTTATTATTTGTAGCAGCG- 3'	1ciclo 95°C – 10min 35 ciclos 95°C- 30s 59°C - 1min 30s, 72°C - 1min 72°C – 10 min extensão final	<i>ceuE</i> (<i>C. coli</i>)	462pb	Gonzales et al. 1997; Denis et al., 1999

Cada reação de PCR foi preparada conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7 - Condições da master mix para os diferentes genes.

Componente	Volume/Reação	Volume/Reação	Volume/Reação
	genes 16SRNA, <i>ask</i> e <i>hip</i>	gene <i>ceuE</i>	gene <i>mapA</i>
Água	7.05 µL	7.18 µL	7.3 µL
Tampão 10X	1.25µL	1.25µL	1.25µL
MgCl ₂	0.625 µL	0.5 µL	0.375 µL
dNTP	0.75 µL	0.75 µL	0.75 µL
Primer	0.75 µL	0.75 µL	0.75 µL
<i>taq</i> polimerase	0.075µL	0.075µL	0.075µL
DNA molde	2.0 µL	2.0 µL	2.0 µL
Volume total	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL

Após a PCR com condições de mix e tempo/temperatura descritas, respectivamente, nas tabelas acima, foi adicionado em cada reação de amplificação 2,5 µL de tampão Ficoll 400 15% e azul de bromofenol 0,25%. O volume total do produto da reação foi aplicado em gel de agarose 1,5% (75 V durante 40 min) para separação dos segmentos através da eletroforese, utilizando o marcador 100pb, para quantificação dos pares de base (pb). Como controle positivo foi utilizado as cepas de *Campylobacter jejuni*/ CCAMP 419 e *Campylobacter coli*/ CCAMP 1003 nas diluições de 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶. Após a migração, os produtos foram corados por imersão do gel em solução de brometo de etídio (1,0%), visualizados em sistema de foto documentação e, em seguida, digitalizadas e salvas em banco de dados.

5.7 Análise Estatística

As variáveis estudadas foram submetidas à análise de variância utilizando o modelo linear do programa de análises estatísticas SISVAR (FERREIRA, 2003). O teste de média Tukey a 5% de probabilidade foi utilizado para comparação das diferenças entre os tratamentos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Desempenho Zootécnico dos Animais

No período pré-inicial (1-7 dias de idade) observou-se que os tratamentos não influenciaram significativamente ($P>0,05$) nenhum dos parâmetros zootécnicos analisados (Tabela 8).

Tabela 8 – Médias das variáveis zootécnicas de aves da linhagem Cobb com 7 dias de idade tratadas com avilamicina, probiótico, simbiótico e ração controle sem aditivos.

Tratamentos	Médias				
	Peso Corporal (g)	Ganho de Peso (g)	Consumo de Ração (g)	Conversão Alimentar (Kg/Kg)	Viabilidade (%)
Probiótico	191.33 ^a	144.54 ^a	239.33 ^a	1.63 ^a	98.33 ^a
Simbiótico	189.52 ^a	145.18 ^a	236.01 ^a	1.56 ^a	99.16 ^a
Antibiótico	197.25 ^a	149.52 ^a	229.19 ^a	1.65 ^a	98.33 ^a
Controle	189.78 ^a	149.83 ^a	244.03 ^a	1.78 ^a	99.16 ^a
Coefficiente de variação (%)	4.19	4.12	5.71	12.74	1.61

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes foram encontrados por Barbieri (2015) que ao utilizar *Bacillus amyloliquefaciens* e avilamicina de maneira isolada ou associada em frangos da linhagem Cobb criados na densidade de 12 aves/m², não obteve diferença ($P>0,05$) para nenhuma das variáveis estudadas por ele.

O fato dos resultados serem semelhantes para todos os grupos pode ser explicado pelo curto tempo para atuação efetiva dos aditivos junto ao trato gastrointestinal da ave. Contudo, para incrementar sua eficiência, a suplementação exógena de aditivos como os probióticos deve ser feita desde o primeiro dia de vida para promover o bom desempenho dos frangos de corte antes de serem contaminados por patógenos (LEANDRO et al., 2010; LORENÇON et al., 2007).

Assim que o embrião eclode em ambiente contaminado por bactérias, vírus e protozoários começa a desenvolver sua própria microbiota intestinal de proteção. O trato gastrointestinal da ave é desprovido de microrganismos no momento da eclosão e a colonização e estabelecimento da microbiota intestinal em aves inicia nos primeiros momentos, sendo necessário de 5 a 7 dias após a eclosão para que a população saudável de bactérias produtoras de ácido láctico se estabeleça no intestino e até 40 dias para sua completa formação assumindo importância fundamental no desempenho e na manutenção da saúde da ave (EDENS, 2003). Quando equilibrada, constitui uma barreira eficaz contra a colonização de patógenos, produz substratos metabólicos (como vitaminas e ácidos graxos de cadeia curta) e estimula o sistema imune de forma não inflamatória. (GAGGIA et al., 2010). A formação desta população pode ser influenciada

por vários fatores, incluindo idade, dieta, uso de antibióticos/probióticos (BRISBIN et al., 2008).

Analisando os dados para as características de desempenho, na fase de criação inicial (1 – 21 dias), foi observada influencia significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$) somente para consumo de ração, que foi menor pelo grupo controle (Tabela 9).

Tabela 9 – Médias das variáveis zootécnicas de aves da linhagem Cobb com 21 dias de idade tratadas com avilamicina, probiótico, simbiótico e ração controle sem aditivos.

Tratamentos	Médias				
	Peso Corporal (g)	Ganho de Peso (g)	Consumo de Ração (g)	Conversão Alimentar (Kg/Kg)	Viabilidade (%)
Probiótico	885.41 ^a	838.62 ^a	1046.95 ^b	1.19 ^a	100.00 ^a
Simbiótico	905.91 ^a	860.91 ^a	978.08 ^b	1.15 ^a	99.16 ^a
Antibiótico	914.16 ^a	867.45 ^a	983.29 ^b	1.13 ^a	98.23 ^a
Controle	884.08 ^a	836.83 ^a	945.37 ^a	1.19 ^a	98.33 ^a
Coeficiente de variação (%)	3.80	3.89	4.73	5.86	1.65

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

A microbiota intestinal das aves é composta por inúmeras espécies de bactérias, formando um complexo dinâmico. Aquelas que colonizam o trato gastrointestinal inicialmente tendem a persistir ao longo da vida da ave, passando a compor a população microbiana residente. Embora Hooge et al. (2004) tenham relatado que a suplementação contínua de bactérias probióticas na ração dos frangos melhora o desempenho das aves, baseados na hipótese de que colonização precoce influencia na eficiência inicial dos processos digestivos e absorptivos, neste estudo não foram observadas diferenças significativas. Loddi et al. (2000) também constataram em suas pesquisas que a utilização de probióticos e simbióticos não resultou em efeitos significativos sobre os parâmetros produtivos nessa fase em virtude da capacidade de colonização do trato gastrointestinal pelas bactérias dos probióticos ser baixa e ao baixo desafio a que as aves foram submetidas.

Boratto et al. (2004), observaram neste mesmo período, maior consumo de ração pelo grupo que recebeu probiótico em relação ao controle. As bactérias probióticas necessitam de substrato para sobreviverem e colonizarem o trato gastrintestinal, fato este que provavelmente explica o maior consumo de ração dos frangos que receberam a cultura durante a criação até os 21 dias de idade. Por outro lado Correa et al. (2013) ao testar diferentes probióticos na dieta de frangos de corte da linhagem comercial Hy Yield, observaram um menor consumo de ração no tratamento que recebeu o simbiótico Estibon[®] em relação ao controle no período de 1-21 dias de idade. Entretanto não foi observada diferença significativa na conversão alimentar entre os tratamentos no período de 21 dias. Da mesma forma Rigobelo et al. (2011) e Ramos et al. (2011) não encontraram diferenças significativas no período de 1 a 21 dias, entre os tratamentos com antibiótico e probióticos. Apesar do maior consumo de ração não foi observada diferença significativa de ganho de peso, o que pode explicar, em parte, a ausência de

efeitos na conversão alimentar, mostrando uma eficiência alimentar que não se difere independente de ser suplementado com antibiótico, prebiótico ou simbiótico.

Alguns autores como Pelicano et al. (2004) observaram que a conversão alimentar apresentou diferenças entre os tratamentos estudados no período de 1 a 21 dias de idade, como melhores resultados para os grupos de frangos alimentados com prebiótico. Já para Santos et al. (2004) a pior conversão alimentar em frangos foi observada nas aves que recebiam prebióticos nas dietas. De acordo com Caramori Junior et al. (2008) existe a possibilidade de que divergências nos resultados encontrados na literatura podem estar associados aos tipos de bactérias que compõem o prebiótico ou à quantidade de prebiótico oferecida.

Em contraste com os resultados encontrados nesta pesquisa, Silva et al. (2011) verificaram que o uso de prebiótico composto por *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* e *Bifidobacterium bifidum*, antibiótico flavomicina e halquinol, prebiótico inulina e simbiótico na alimentação de frangos de corte na fase de 1 a 21 dias, resultou em peso vivo significativamente menor das aves tratadas com antibiótico. Assim como no presente trabalho esses pesquisadores utilizaram frangos da linhagem Cobb, contudo a densidade de criação foi relativamente maior, 16 aves m² proporcionando maior desafio as aves.

Na variável ganho de peso médio também não foi observado diferença estatística. Da mesma forma, Caramori Junior et al. (2008) concluíram que em todas as fases, o ganho médio de peso das aves, não foi influenciado pela suplementação do simbiótico na ração.

Analisando os dados para as características de desempenho (Tabela 10), no período total da criação (1 a 42 dias), observou-se efeitos significativos ($P < 0,05$) para peso corporal e ganho de peso.

Tabela 10 – Médias das variáveis zootécnicas de aves da linhagem Cobb com 42 dias de idade tratadas com avilamicina, probiótico, simbiótico e ração controle sem aditivos.

Tratamentos	Médias				
	Peso Corporal (g)	Ganho de Peso (g)	Consumo de Ração (g)	Conversão Alimentar (Kg/Kg)	Viabilidade (%)
Probiótico	2223.20 ^{ab}	2046.02 ^a	2945.78 ^a	1.52 ^a	98.33 ^a
Simbiótico	2207.57 ^a	2162.37 ^b	3156.76 ^a	1.43 ^a	97.50 ^a
Antibiótico	2295.67 ^{ab}	2248.68 ^b	3216.05 ^a	1.43 ^a	98.33 ^a
Controle	2396.69 ^b	2322.40 ^b	2911.88 ^a	1.30 ^a	99.16 ^a
Coefficiente de variação (%)	3,84	4,13	8,48	7,27	1,83

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

O ganho de peso dos frangos foi significativamente menor ($P < 0,05$) no tratamento probiótico quando comparada com os tratamentos contendo outros fatores de crescimento e o grupo controle. O menor peso no grupo suplementado com probiótico pode ser associado ao menor consumo de alimento no período, podendo ter um impacto negativo na ação dos probióticos. A inclusão de organismos desejáveis (probióticos), suplementados na dieta, possibilita o rápido desenvolvimento de bactérias benéficas no trato digestório do hospedeiro, melhorando o desempenho destes (EDENS, 2003). De acordo com Guillot (2000) para que um probiótico seja efetivo é necessário que proporcione um número mínimo de 10^6 UFC/g de conteúdo intestinal. Este número representa uma estimativa do tamanho da população bacteriana a ser alcançada para se obter um efeito benéfico. Além da quantidade empregada outro fator que interfere na ação benéfica é a espécie a ser utilizada. Estes resultados são divergentes dos obtidos por Schwarz et al. (2001) que não encontraram diferença estatística entre tratamentos com antimicrobianos frente aos probióticos, com relação ao ganho de peso das aves. Por outro lado, Yun et al. (2017) observaram que o uso de probióticos, constituídos de espécies de *Bacillus*, *Lactobacillus* e *Aspergillus niger*, na ração de frangos de corte resultou em aumento do ganho de peso significativo nas aves suplementadas com esses microrganismos.

Para a conversão alimentar os resultados encontrados não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Resultados semelhantes foram encontrados por Flemming & Freitas (2005) que ao testar uma associação de probióticos (*Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*) em comparação ao antibiótico avilamicina, não observaram diferença na conversão alimentar, entre os aditivos, porém ao compará-los com o tratamento controle houve um maior ganho de peso daqueles.

Pelicano et al. (2004) avaliando o desempenho de frangos de corte de 1 a 42 dias recebendo probiótico *Bacillus subtilis*, observaram melhor conversão alimentar no período de 22 a 35 dias, porém, este efeito não foi observado nas demais fases, concluindo que este aditivo alimentar não afetou o desempenho das aves. Dibner & Richards (2005) indicam que a utilização de melhoradores de desempenho melhoram a conversão alimentar dos frangos, citando que a base biológica para os efeitos dos antibióticos sobre a eficiência do crescimento animal considera os efeitos sobre a microbiota intestinal, fato esse não observado nesse experimento.

A União Brasileira de Avicultura recomenda que a densidade máxima de aves por metro quadrado seja de 39kg/m², o que equivale a uma média de 15 aves por metro quadrado (UBA, 2008). Mas esse valor muitas vezes chega a 17-18 aves por m², densidade essa muito maior do que a praticada no presente trabalho e o que sugere que não seja compulsório em granjas comerciais que adotem boas práticas agropecuárias. Certamente o estresse decorrente da alta densidade populacional influencia nos índices zootécnicos e sanidade dos animais. Provavelmente se fossem reproduzidas as condições que são encontradas em muitas granjas comerciais, os resultados dos desempenhos seriam diferentes. Para Lima et al. (2003) a ação dos probióticos parece estar relacionada principalmente a dois fatores: ao número correto de microrganismos vivos utilizados e à presença de estresse nas aves devido às condições de criação. As condições ambientais inadequadas reduzem o desempenho das aves afetando diretamente a resposta imune e conseqüentemente diminuindo o ganho de peso vivo e a ingestão alimentar nesse sentido a inclusão de probióticos na dieta poderia melhorar as mudanças induzidas através de imunoestimulação convertendo na melhora do desempenho (TAKAHASHI et al., 1997).

Considerando o período de criação, não foi possível demonstrar nenhuma influência (P>0,05) da inclusão ou ausência dos aditivos na mortalidade. Esse resultado diverge do encontrado por Pelicano et al. (2005) que em estudo do uso de uma combinação de *Bacillus* e *Lactobacillus* e *Saccharomyces cerevisiae* como simbiótico em frango de corte, observou maior viabilidade com o uso destes aditivos na dieta.

Os resultados das pesquisas utilizando diferentes melhoradores e equilibradores de desempenho como os antibióticos, probióticos, prebióticos e simbióticos, são bastante conflitantes. Tais contradições podem ser justificadas pelo fato das pesquisas terem sido realizadas utilizando diferentes antibióticos, bem como probióticos com diferentes composições de microrganismos e, mesmo aqueles pertencentes à mesma espécie podem ter diferentes cepas. Provavelmente, o tipo de interação entre as diferentes cepas que deve ser do tipo mutualista e não competitivo, é outro fator essencial a ser considerado na escolha de cepas na formulação de um probiótico. Desta forma a eficácia dos produtos testados é estritamente dependente da quantidade e características das cepas dos microrganismos utilizados na elaboração do aditivo alimentar (RAMOS et al., 2011).

Embora os aditivos não tenham influenciado o desempenho, este se manteve dentro dos padrões zootécnicos esperados.

6.2 Rendimento dos Cortes e Vísceras

Não foram observadas diferenças significativas (P>0,05) entre os tratamentos para o rendimento de carcaça e de suas partes (Tabela 11 e 12). Para ser considerada uma alternativa aos antibióticos os promotores de crescimento devem melhorar o desempenho animal em níveis comparáveis (HUYGHEBAERT et al., 2010). Nas condições do experimento, a utilização de probióticos e simbióticos como fator de

crescimento mostrou a mesma eficiência dos antibióticos com relação a rendimentos dos cortes e da carcaça.

Tabela 11 – Médias e desvio padrão do rendimento de cortes comerciais de frangos de corte (peito, dorso, coxas, sobrecoxas, asas) avaliados no abate aos 42 dias de idade.

Tratamento	Rendimento de carcaça	Rendimento de Peito (%)	Rendimento de Coxa e Sobrecoxa (%)	Rendimento de Asa (%)	Rendimento de Dorso (%)
Probiótico	72.909279 ^a	40.033620 ^a	29.791137 ^a	11.244315 ^a	18.622022 ^a
Simbiótico	75.796548 ^a	38.385976 ^a	30.355102 ^a	11.624767 ^a	19.252548 ^a
Antibiótico	71.917114 ^a	38.923622 ^a	30.297502 ^a	11.344067 ^a	19.480460 ^a
Controle	71.626563 ^a	38.366177 ^a	30.133104 ^a	11.720168 ^a	19.320527 ^a
Coefficiente de variação (%)	7.85	6.60	5.68	11.25	8.17

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 12 – Médias e desvio padrão do rendimento das vísceras avaliadas no abate de frangos de corte de 1 a 42 dias de idade.

Tratamento	Rendimento da Moela (%)	Rendimento do Fígado (%)	Rendimento do Coração (%)
Probiótico	1.656133 ^a	2.850864 ^a	0.416283 ^a
Simbiótico	1.711063 ^a	2.703781 ^a	0.447243 ^a
Antibiótico	1.741357 ^a	2.557741 ^a	0.42879 ^a
Controle	1.692838 ^a	2.712758 ^a	0.410295 ^a
Coefficiente de variação (%)	13.31	19.88	36.70

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos corroboram com as observações encontradas por Aristides et al. (2012), que concluíram que a utilização de aditivos bioativos (probióticos e simbióticos como *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium* em combinação com mananoligossacarídeos não afetou negativamente o rendimento de cortes comerciais de frangos (asas, pernas, peito e dorso) em nenhum dos tratamentos utilizados. Domingues et al. (2014) avaliaram a eficácia da utilização do probiótico *Bacillus subtilis* sobre o desempenho zootécnico, rendimento de carcaça e de partes da carcaça de frangos de corte nas diferentes fases de criação e igualmente não observaram diferenças significativas ($P>0,05$) entre os tratamentos, quanto às características de carcaça.

Santos et al. (2004) verificaram que aves suplementadas com simbiótico e antibiótico, apresentaram maior rendimento de sobrecoxa, em comparação aos tratamentos com enzimas e sugeriram que o resultado foi decorrente de uma maior deposição de nutrientes em relação aos demais tratamentos com consequências na maior taxa de crescimento e altas taxas de retenção proteica.

Albino et al. (2006), conduziram um estudo utilizando apenas prebióticos (mananoligossacarídeos) em diferentes concentrações combinados ou não o melhorador de crescimento (avilamicina), e observaram que os tratamentos melhoraram os rendimentos de peito e filé de peito em frangos machos da marca comercial Ross. Contrariando os resultados encontrados nesse trabalho, onde não obtivemos diferenças significativas para a variável rendimento de peito em nenhum dos tratamentos utilizados. É provável que o fato de utilizar aves fêmeas possa ter influenciado no rendimento da carcaça, apesar de estudos observarem semelhança no rendimento de carcaça entre machos e fêmeas (MOREIRA et al., 2003).

Quanto ao rendimento das vísceras não foi observada diferença estatística ($P>0,05$) entre os tratamentos. Da mesma forma Paz et al. (2010) também não verificaram influência significativa ($P>0,05$) do uso de antibióticos (avilamicina e colistina), de prebióticos (mananoligossacarídeos), de probiótico (*Bacillus subtilis*) e de ácidos orgânicos (ácidos fumárico e propiônico), nas dietas das aves, nos pesos do fígado, do coração e do intestino.

Os resultados obtidos corroboram com as observações de Bittencourt et al. (2011) e Caramori Junior et al. (2008) ao relatarem a possibilidade dos probióticos serem utilizados em substituição aos antibióticos não influenciando negativamente o desempenho das aves, pois tratam-se de um suplemento aditivo de ração considerado seguro (GRAS) para a posterior utilização da carne para consumo humano.

Luegas et al. (2015) ressaltam que muitas vezes, as condições sanitárias e de manejo observadas em criações comerciais, que incluem inúmeras fontes de contaminação para *Campylobacter* possibilitam a recontaminação do rebanho durante o período de criação, não são as mesmas das criações experimentais onde as aves encontram-se em condições de mínimo estresse. Portanto, a ação desses produtos deve ser validada durante ensaios na fazenda, tornando-se difícil verificar algum efeito benéfico quanto ao uso de probióticos, não encontrando diferença significativa ($P<0,05$) entre os demais tratamentos para os parâmetros zootécnicos como desempenho no período de 1 a 42 e rendimento de carcaça e vísceras. Condições também consideradas por Pedroso et al. (2006) que além das condições de manejo e sanitárias, citam também como fator limitador nos resultados em frangos a heterogeneidade da microflora intestinal o tipo e a concentração de probióticos utilizados. Embora alguns pesquisadores apresentem resultados negativos no uso de probióticos (LODDI et., 2000), a maioria dos trabalhos mostra que os probióticos são, pelo menos, tão eficientes quanto os antibióticos como melhoradores de desempenho, apresentando benefícios sobre a digestibilidade de nutrientes e aproveitamento energético, e proporcionando

obtenção de bons índices zootécnicos, rendimento de carcaça e cortes comerciais (PELICANO, 2005). Fato esse evidenciado neste trabalho.

6.3 Frequência de Isolamento de *Campylobacter* spp.

Através da metodologia de cultivo, observou-se incidência para *Campylobacter* em 14,5% amostras (35/240). Analisando os dados de acordo com cada tratamento as amostras positivas foram distribuídas da seguinte maneira: 12/60 (20%) para o grupo suplementado com probiótico, 8/60 (13,3%) nas aves provenientes do tratamento com simbiótico, 7/60 (11,6%) do grupo antibiótico e 8/60 (13,3%) do grupo controle (Figura 5).

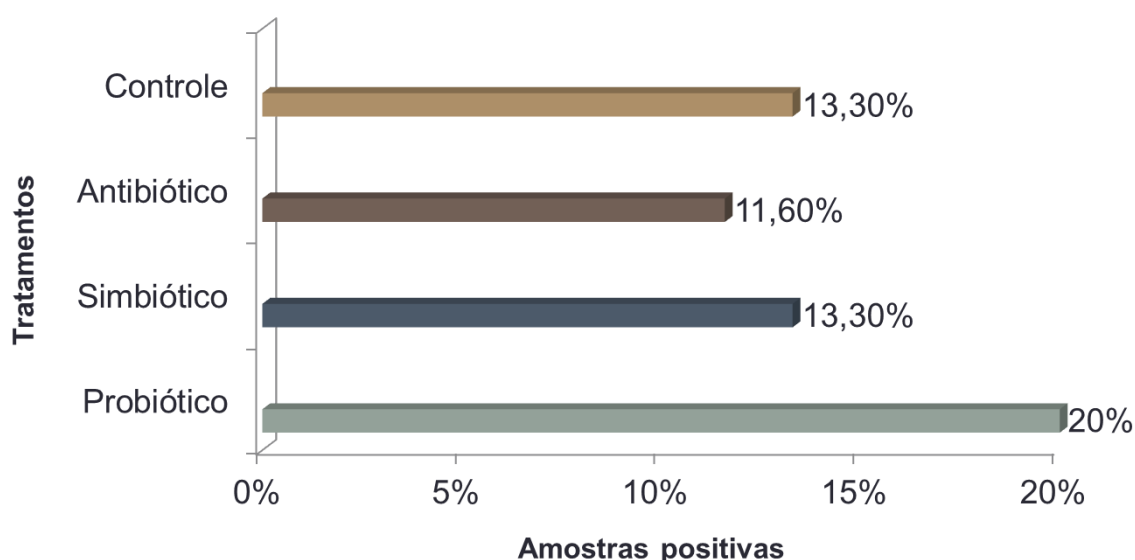


Figura 5 - Frequência de isolamento de *Campylobacter* spp. em nos tratamentos controle, antibiótico, probiótico e simbiótico.

A frequência de identificação das espécies de *Campylobacter* spp. é mostrada na tabela 13. Verificou-se uma maior incidência de *C. coli*, tendo 21 (60%) isolados identificados como *C. coli* e 14 (40%) como *C. jejuni*. Por outro lado Silva et al (2014), isolaram *Campylobacter* em 61% das amostras de fezes de frango identificadas através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) maior ocorrência de *C. jejuni*, 35 (85,4%) isolados, do que de *C. coli*, seis (14,6%).

Tabela 13 - Frequência de espécies de *Campylobacter* spp. identificadas nos tratamentos controle, antibiótico, probiótico e simbiótico.

Tratamento	<i>C.coli</i>	<i>C. jejuni</i>
Probiótico	10	2
Simbiótico	4	4
Antibiótico	2	5
Controle	5	3
Total	21	14

Esses resultados demonstram que apesar do probióticos e simbióticos não terem diminuído a colonização de *Campylobacter*, os valores encontrados para os grupos dos simbióticos e antibióticos foram muito próximos, não havendo diferença estatística ($P < 0,05$). Com a vantagem dos probióticos e simbióticos poderem ser utilizados durante todo período de criação das aves não necessitando de período de carência para consumo da carne como é recomendado com o antibiótico e serem considerados seguros, não deixando resíduos indesejáveis na carne. Os simbióticos que contem oligossacarídeos que por simular a mucina da mucosa intestinal parecem exercer um efeito importante na exclusão competitiva de patógenos.

Outro ponto que deve ser ressaltado quanto aos resultados se refere ao fato dos antibióticos comumente utilizados na avicultura, como por exemplo a avilamicina, são eficientes contra bactérias gram-positivas o que não afeta o *Campylobacter* pois se trata de um microrganismo gram-negativo.

Nos últimos anos, vários esforços foram dedicados a definir misturas microbianas direcionadas que poderiam ter atividade preventiva em aves de corte contra infecções por *Salmonella* contudo o número de estudos evidenciando um possível papel dos probióticos na prevenção da colonização de *C. jejuni* em nível da produção primária ainda são escassos, embora estudos *in vitro* relatem uma forte atividade antimicrobiana de várias cepas probióticas em relação a esse patógeno

Dentre os autores que já relataram a eficácia da utilização de probióticos e simbióticos no controle de *Campylobacter* em frangos de corte pode-se destacar Santini et al. (2010), que ao avaliarem a capacidade de colonização de bactérias lácticas incluindo bifidobactérias e sua atividade no controle de três cepas de *Campylobacter jejuni* em frangos de corte, observaram que concentração de *C. jejuni* foi reduzida nos animais em que *Bifidobacterium longum* foi administrada. Willis & Reid (2008) verificaram que aos 42 dias de vida, os frangos de corte alimentados com o composto probiótico PrimaLac (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium thermophilus*, *Enterococcus faecium*) tiveram uma redução na prevalência de isolamento de *Campylobacter jejuni* quando comparado com o grupo controle. A administração de duas doses de *Lactobacillus johnsonii* dada com uma semana de intervalo conduziu a uma redução da colonização de *C. jejuni* no conteúdo cecal, mas esse controle biológico pareceu dependente de um alto nível de colonização inicial pelo probiótico (MAÑES-LÁZARO et al., 2017).

Existem também os casos nos quais os probióticos são eficientes nos testes realizados *in vitro* mas não mostram a mesma eficiência quando testados *in vivo*. No estudo conduzido por Arsi et al., 2015 foram isolados 26 cepas com atividade *in vitro*

capazes de inibir a colonização de *Campylobacter* mas quando foram testados *in vivo*, apenas 3 isolados apresentaram uma redução de 1-2 log em *Campylobacter*. No entanto, estes isolados reduziram o *Campylobacter* em apenas 1 dos 3 ensaios e quando esses isolados probióticos selecionados foram administrados individualmente não mostraram uma redução consistente de *Campylobacter in vivo*. Da mesma forma, Robyn et al. (2013) não evidenciou inibição de *Campylobacter* em frangos de corte pela cepa do probiótico *Enterococcus faecalis*, embora uma influência inibitória *in vitro* da cepa em *C. jejuni* tenha sido previamente demonstrada em um sistema que simula o ambiente cecal de frango.

Assim, pode ser muito difícil concluir sobre a eficácia positiva ou negativa dos probióticos testados em frangos de corte na idade de abate. Numerosos estudos testaram o efeito de diferentes produtos adicionados na dieta alimentar ou na água de bebida contra *Campylobacter* em frangos de corte ao nível do rebanho. No entanto, os diferentes estudos foram conduzidos usando diferentes projetos experimentais, por isso é difícil comparar os resultados.

Deve se levar em consideração a resiliência de *Campylobacter* à presença de probiótico no ambiente intestinal. O patógeno pode implementar estratégias para superar atividade inibitória, como ocorre com os bacteriófagos (HAMMERL et al., 2014) e, apesar de uma diminuição no início, o patógeno pode se adaptar e crescer ainda mais. A presença nas aves de uma microbiota intestinal complexa, pode explicar parcialmente essa diferença entre os resultados *in vitro* e *in vivo*. De outra forma, é possível que os probióticos em uso para aves não sejam adequados ou que a combinação de diferentes probióticos não seja adequada.

Diferentes fatores do hospedeiro podem justificar as variações nos resultados do uso de probióticos em aves. A linhagem de frango poderia potencialmente influenciar tratamentos probióticos. Estudos mostraram que o comportamento de *C. jejuni* pode variar consideravelmente em relação às linhagens de frango usadas em estudos experimentais. O estado imunológico dos animais é diferente entre diferentes raças de galinha e, portanto, também é uma característica inerente que poderia modular a ação probiótica (SAINT-SYR et al., 2016). Portanto, o reconhecimento da microbiota pelo sistema imune do hospedeiro é de fundamental importância. Os estudos realizados são em sua maioria realizados em mamíferos, nos quais a estrutura dos tecidos linfóides associados ao intestino é totalmente diferente das aves, o que dificulta a transposição das informações geradas (COPPOLA & GIL-TURNES, 2004).

Além do efeito físico de barreira contra bactérias patogênicas, as bactérias probióticas exercem um efeito biológico, na medida em que promovem um ambiente de baixa tensão de oxigênio, desfavorecendo o crescimento de bactérias enteropatogênicas, principalmente as salmonelas. Especificamente para *Campylobacter* essa diminuição da tensão de oxigênio não seja inóspita o suficiente, podendo até mesmo ser uma condição favorável, visto que as bactérias deste gênero são microaerófilas, diferente dos demais patógenos. O efeito bactericida contra *Campylobacter* provavelmente resulta da produção de ácidos orgânicos (lático e propiônico) que levam a uma redução do pH do ambiente intestinal, com consequente inibição de bactérias patogênicas. (GHAREEB et al., 2012). Annuk et al. (2003) relataram também que as bacteriocinas produzidas por probióticos têm atividade de inibição específica contra bactérias gram-negativas, incluindo *Campylobacter spp.*

Outra questão particularmente importante sobre *Campylobacter* é que eles apresentam alta variabilidade genética e pouco se sabe sobre os mecanismos de colonização específica do hospedeiro, virulência e fatores de patogenicidade de espécies de *Campylobacter* (GRIPP et al., 2011). Eles não são igualmente capazes de colonizar

galinhas, diferentes genótipos de *C. jejuni* apresentam diferenças distintas em sua dinâmica de infecção e ecologia intestinal em frangos comerciais (CHALONER et al., 2014) e provavelmente não tão sensíveis a ações probióticas (WINE et al., 2009). Além disso, há pouca informação disponível sobre o efeito antimicrobiano dos microrganismos probióticos específicos de aves e sua eficácia na colonização de *C. jejuni* em frangos de corte. Essa diversidade, traz implicações para o controle na indústria avícola sugerindo que o risco de contaminação dos tecidos comestíveis é dependente do isolado envolvido. Isso traz repercussões para o controle de *C. jejuni* na produção e processamento de aves.

A forma e rota da administração probiótica são dois pontos críticos para aplicação industrial. O uso das culturas frescas inoculadas individualmente não é possível no nível da fazenda, mesmo que os probióticos sejam altamente ativos e eficientes. Os probióticos comerciais como o Protexin, que foi utilizado neste experimento, apesar de ser recomendado para a utilização em aves podem não utilizar microrganismos específicos para a espécie o que pode minimizar os efeitos benéficos no trato gastrointestinal. É importante que os produtores de probióticos usem processos de produção e estratégias de preservação e administração modificadas para garantir a entrega de cepas ativas às aves. Como vários trabalhos mostraram, o método de produção, composição média e estágio de crescimento influenciam fortemente a eficácia de sobrevivência dos probióticos (BRON et al., 2012 ; Van BOKHORST et al., 2012). A capacidade das bactérias probióticas serem mantidas à temperatura ambiente torna-se necessária para a conveniência do cliente e a redução de custos do fabricante. Por isso, é importante a produção de forma seca de bactérias probióticas. A microencapsulação de bactérias probióticas tem sido uma tecnologia promissora para garantir a estabilidade bacteriana durante o processo de secagem e para preservar sua viabilidade durante o armazenamento sem perder significativamente suas propriedades funcionais. O armazenamento a temperaturas ambiente em vez de congelamento ou armazenamento a baixa temperatura é preferível para minimizar os custos de manuseio, transporte e armazenamento. A sua atividade e a sobrevivência durante o armazenamento também devem ser avaliadas e poucas informações sobre esses aspectos estão disponíveis para probióticos comerciais. (BAFFONI et al., 2012; DIANAWATI et al., 2015)

Mesmo que o objetivo seja reduzir os níveis de colonização de *Campylobacter*, é importante ter em mente que o destino final dos frangos de corte é o mercado. A administração de grandes quantidades de bactérias não só pode reduzir *Campylobacter*, mas também prejudicar a homeostase da microbiota intestinal aviária. Portanto, é necessário examinar conjuntamente o impacto probiótico nos parâmetros de desempenho, incluindo a ingestão diária média de alimentos, o ganho de peso corporal e a relação de conversão alimentar o que foi realizado neste trabalho.

6.3.1 Análise molecular do conteúdo cecal

No presente trabalho todos os *swabs* coletados foram submetido a extração de DNA e realizada a Reação em Cadeia da Polimerase. Diferentemente de outros experimentos nos quais realizam a extração a partir de colônia isolada, nesta pesquisa a extração do DNA foi realizada diretamente da solução em que o *swab* foi acondicionado. A sensibilidade do método PCR foi testada em diferentes preparações. Primeiro, a sensibilidade foi investigada pela extração de DNA de culturas puras (*Campylobacter jejuni*/ CCAMP 419 e *Campylobacter coli*/ CCAMP 1003) diluídas em série. Foram preparados modelos de DNA para a análise de células 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 ,

10^2 e 10^1 por PCR de *C. jejuni* e *C. coli*. O método de PCR foi capaz de detectar a presença de 10^6 - 10^2 bactérias por PCR para *C. coli* e *C. jejuni*.

Todas as amostras que foram positivas no método de cultivo convencional em placa foram identificadas no PCR, as cepas de *C. coli* e *C. jejuni* resultaram nas ampliações esperados, tendo uma correlação de 100% entre as espécies identificadas pelo PCR e pela identificação bioquímica (Figura 6).

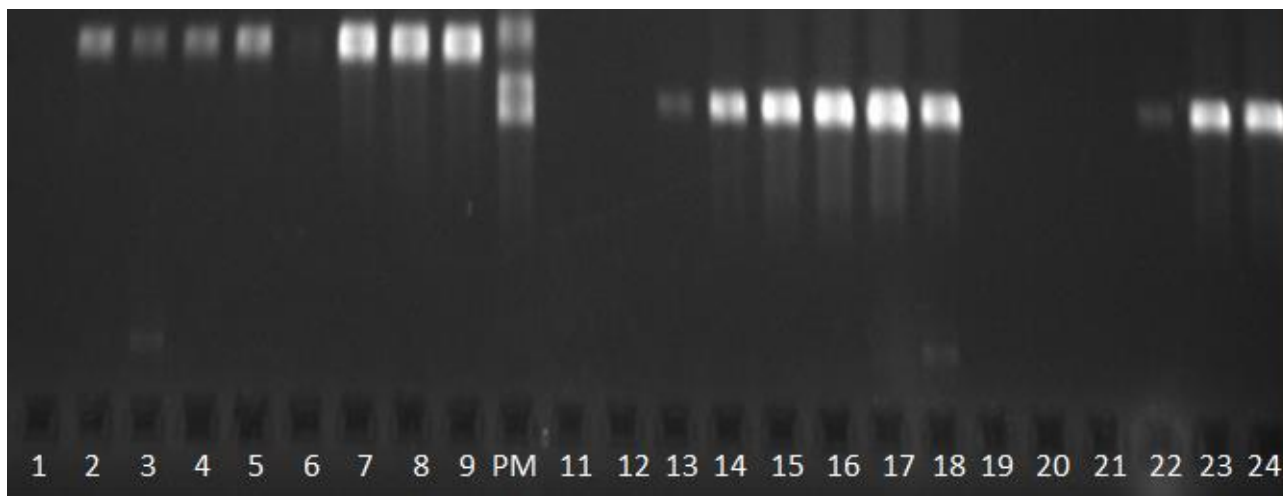


Figura 6 – PCR das amostras, genes *hipO*(735pb) e *ceuE* (462pb). (PM) Peso Molecular 100pb. (2, 3, 4, 5) *C. jejuni*; (13 a18) *C. coli*.

Existem relatos na literatura de culturas atípicas de *C. jejuni*, as quais apresentam o fenótipo hipurato-negativo (NICHOLSON & PATTON, 1995), dificultando a identificação baseada essencialmente nesses testes fenotípicos, fato não verificado nesta pesquisa.

Quatro amostras que foram negativas para *Campylobacter* no cultivo em placa e tiveram resultado não conclusivo no PCR, necessitando para a confirmação a realização de sequenciamento genético. Essas amostras foram provenientes do grupo de tratamento antibiótico podendo estar em baixas concentrações explicando não serem detectadas por completo no PCR. O estresse causado pela presença de oxigênio, temperatura baixa ou falta de nutrientes, muda a morfologia das células de *Campylobacter* para formas cocóides, entrando em um estado viável mas não cultivável e sendo incapazes de crescer em meios seletivos de isolamento. Para Maher et al. (2003) as limitações dos métodos de cultivo de rotina utilizados, podem inibir o isolamento de algumas cepas de *C. jejuni*. Métodos moleculares baseados em amplificação por PCR podem fornecer uma alternativa aos métodos de cultura para a detecção de *Campylobacter*. A extração direta de DNA deve ser considerada vantajosa em relação à análise de amostras previamente isoladas, pois pode conter bactérias viáveis e não cultiváveis que podem constituir uma parte significativa em determinadas amostras como por exemplo, as de fezes. Hazeleger et al. (1994), conduziram um estudo para verificar se as formas viáveis mas não cultiváveis poderiam ser detectadas pela técnica da PCR, concluindo que esta técnica foi capaz de confirmar células viáveis e não cultiváveis, provenientes de carne de frango, embora em diferentes níveis de detecção. Esta característica representa um perigo potencial à saúde pública e é de grande importância em microbiologia, uma vez que um alimento depois de ser analisado pode ser classificado como próprio para consumo

apesar de apresentar células desse patógeno que não foram previamente detectadas (FORSYTHE, 2002).

A detecção rápida, direta e precisa de *Campylobacter* em aves é essencial para a avaliação dos riscos para a saúde pública e para a avaliação das estratégias de controle implementadas na produção de aves. O ensaio desenvolvido é um meio relativamente barato e eficiente para detectar *Campylobacter* spp. em *swabs* cloacais e pode ser uma alternativa útil na liberação de lotes para o abate. Em suma, o presente método oferece uma identificação rápida e robusta de *C. coli* e *C. jejuni*.

7 CONCLUSÃO

Considerando as condições de baixo estresse na criação de frangos de corte utilizadas nesse experimento, conclui-se que:

- A incidência de aves contaminados com *Campylobacter* spp, com predomínio de *C. coli*, foi considerada muito baixa não havendo diferença significativa no controle dessa incidência entre as aves que se alimentaram com probiótico, simbiótico ou antibiótico avilamicina e as que não se alimentaram com ração contendo aditivos.
- Os índices zootécnicos das aves que receberam probiótico ou simbiótico foram comparáveis as que receberam antibiótico, e nestas condições, o uso de antibióticos não se justifica.
- O método de identificação de *Campylobacter* spp. por PCR diretamente de *swab* cloacal foi eficiente tendo correlação com o método convencional de cultivo.

8 SUGESTÕES E RECOMENDAÇÕES

Pesquisas adicionais que estudem o efeito de outros produtos comerciais ou de uma combinação de diferentes tipos de produtos, atuando em sinergia para melhorar a redução quantitativa da colonização cecal de *Campylobacter* em frangos de corte e melhorar o desempenho zootécnico, valerão a pena. São necessários também estudos mais aprofundados visando a seleção de cepas probióticas adequadas para a espécie animal e fins desejados, assim como avaliação dos aditivos em diferentes condições de criação.

Outro ponto de grande interesse é elucidar a interação do *Campylobacter* com outros microrganismos e seu mecanismo de invasão em nível celular

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAZA, I.M.; SHEHATA, M.A.; SHOIEB, M.S.; HASSAN, I.I. Evaluation of some natural feed additive in growing chicks diets. **International Journal of Poultry Science**, v.7, n.9, p.872-879, 2008.
- ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. **Microbiologia de los alimentos**. 1. Ed. Zaragoza:Acríbia, 464p, 1997.
- AGROBRASIL, **Valorização dos Agronegócios**. 2008. Disponível em: <http://www.agrobrasil.agr.br/home/busca.asp> , acesso em: 22 de julho de 2014.
- ALBINO, L.F.T.; FERES, F.A; DIONIZIO, M.A. et al. Uso de prebióticos à base de mananoligossacarídeo em rações para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.742-749, 2006.
- ALTEKRUSE, S.F.; STERN, N.J.; FIELDS, P.I.; SWERDLOW, D.L. *Campylobacter jejuni* - An emerging foodborne pathogen. **Perspectives**, v. 5, p. 28-35, 1999.
- ALVES, J.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Presença de *Campylobacter* spp. em cortes refrigerados de frango. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 2829-2836, nov./dez. 2013.
- ANDREATTI FILHO, R. L. **Alimentos funcionais na Produção Avícola. Saúde Aviária e Doenças**. Ed. ROCA, São Paulo, Brasil, p. 41-52, 2008.
- ANNUK, H.; SHCHEPETOVA, J.; KULLISAAR, T.; SONGISEPP, E.; ZILMER, M.; MIKELSAAR, M. Characterization of intestinal *Lactobacilli* as putative probiotic candidates. **J. Appl. Microbiol.**, v. 94, p.403-412, 2003.
- ARAUJO, J.A.; SILVA, J.H.V.; AMÂNCIO, A.L.L.; LIMA, M.R.; LIMA, C.B. Uso de aditivos na alimentação das aves. **Acta Veterinaria Brasília**, v.1, n.3, p.69-77, 2007.
- ARSI, K.; DONOGHUE, A.M.; WOO-MING, A.; BLORE, P.J.; DONOGHUE, D.J. The efficacy of selected probiotic and prebiotic combinations in reducing *Campylobacter* colonization in broiler chickens. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 24, n. 3, p.327-334, 2015.
- AWAD, W.; GHAREEB, K.; BÖHM, J. Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a synbiotic containing *Enterococcus faecium* and oligosaccharides. **International Journal of Molecular Science**, v. 9, n. 11, p. 2205-2216, 2008.
- BACK, A. Campilobacteriose. **Manual de Doenças das Aves**. 2 ed. Casacavel: Integração, p.119-122. 2010.
- BAFFONI, L.; GAGGIÀ, F.; DI GIOIA, D.; SANTINI, C.; MOGNA, L.; BIAVATI, B. A Bifidobacterium-based synbiotic product to reduce the transmission of *C. jejuni* along the poultry food chain. **Int. J. Food Microbiol.**, v.157, p. 156-161, 2012.
- BAKER, M.G. et al. Is the major increase in notified campylobacteriosis in New Zealand real? **Epidemiology and Infection**, v. 135, p.163-170, 2007.

BATISTA, L.S. **Flavonóides e Mananoligossacarídeos em Dietas para Frangos de Corte.** (2005). Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia – Área de Concentração: Nutrição e Produção Animal, 54p.

BARDON, J.; KOLA, R.M.; KARPI, S.; KOVA, R.; HRICOVA, K. Prevalence of thermotolerant *Campylobacter* spp. in broilers at retail in the Czech Republic and their antibiotic resistance. **Food Control**, v.22, n.2, p. 328-332, 2011.

BAURHOO, B.; FERKET, P.R.; ZHAO, X. Effects of diets containing different concentrations of mannanoligosaccharide or antibiotics on growth performance, intestinal development, cecal and litter microbial populations, and carcass parameters of broilers. **Poultry Science**, v.88, n.11, p.2262-2272, 2009.

BELLAVER, C. **O uso de microingredientes (aditivos) na formulação de dietas para suínos e suas implicações na produção e na segurança alimentar.** In: CONGRESSO MERCOSUR DE PRODUCCIÓN PORCINA, 2000, Buenos Aires. Anais... Buenos Aires: Embrapa CNPSA, 2000.

BELLAVER, C. **Utilização de Melhoradores de Desempenho na Produção de Suínos e de Aves.** 2005. Disponível em: http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_arquivos/palestras_d2t87d4m.pdf Acesso em 16/10/2017

BITTERN COURT, L.C., SILVA, C.C., GARCIA, P.D.S.R., DONATO, D.C.Z, ALBUQUERQUE, R.; ARAÚJO, L.F. (2011). Influence of a probiotic on broiler performance. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n.12, p. 2739-2743, 2011.

BORATTO, A. J., LOPES, D.C., OLIVEIRA, R.F.M. Use of antibiotic, probiotic and homeopathy, inoculated or not with *Escherichia coli*, for broilers reared under comfort environment. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.1477- 1485, 2004.

BORSOI, A. **Campylobacter em produtos avícolas e sua importância na saúde pública.** 2011 Disponível em <http://pt.engormix.com/> Acesso em 29 jul 2014.

BOUFLEUR, R. **Campylobacter jejuni em frangos de corte, carne e vísceras de frango no Rio Grande do Sul e efeito do congelamento sobre a contaminação nos cortes.** 43f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.** Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União. Poder Executivo, 2001.Seção I, p. 45-53.

BRASIL, Instrução Normativa nº 15, de 26 de Maio de 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

BRASIL, Instrução Normativa 13/2004. **Regulamento Técnico Sobre Aditivos Para Produtos Destinados à Alimentação Animal Segundo as Boas Práticas de Fabricação, Contendo os Procedimentos Sobre Avaliação da Segurança de Uso, Registro e Comercialização.** Disponível em <http://sistemasweb.agricultura.gov.br> Acesso em 30 setembro de 2017.

- BRISBIN, J.T.; J GONG, J.; S SHARIF, S. Interactions between commensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, p. 101-110, 2008.
- BRON, P.A.; WELS, M.; BONGERS, R.S.; WIERSMA, A.; OVERMARS, L. et al. Transcriptomes reveal genetic signatures underlying physiological variations imposed by different fermentation conditions in *Lactobacillus plantarum*. **PLoS One**, v.7, n.7, 2012.
- BUTZLER, J.P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. **Clin. Microbiol. Infect.**, n.10, p.868-876, 2004.
- BULL, A.S. et al. Sources of *Campylobacter* spp. colonizing housed broiler flocks during rearing. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.1, p.645-652, 2006.
- BUTOLO, J.E. Uso de aditivos na alimentação de aves: frangos de corte. In: **Simpósio sobre as implicações sócio-econômicas do uso de aditivos na produção animal**, Anais... Piracicaba: CBNA, p.85-94, 1999.
- CARAMORI JÚNIOR, J. G.; ROCHA, R. L.; FRAGA, A. L.; VIEITES, F. M.; MORCELLI, L.; GONÇALVES, M. A. Efeito de Simbiótico na ração inicial de frangos de corte sobre o desempenho, qualidade de carcaça e carne. **Acta Scientiarum Animal Science**, v.30, n. 1, p.17-23, 2008.
- CARVALHO, A.C.F.B.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; CAMA, L.F.S.A.M. Isolation of *Campylobacter jejuni* from viscera and bile secretion of broiler chickens with diarrhea. **Rev. de Microbiol.**, v.28, p. 125-128, 1997.
- CHANTZIARAS, I., BOYEN, F., CALLENS, B. & DEWULF, J. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. **J Antimicrob Chemother**, v.69, p. 827-834, 2014.
- CHALONER, G.; WIGLEY, P.; HUMPHREY, S.; KEMMETT, K.; LACHARME-LORA, L.; HUMPHREY, T. et al. Dynamics of dual infection with *Campylobacter jejuni* strains in chickens reveals distinct strain-to-strain variation in infection ecology. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.80, p. 6366–6372, 2014.
- CHAVES, S.O.C.; SOUZA, C.O.; FREITAS, J.A.; et al. Ocorrência de *Campylobacter* em granjas e abatedouro avícola na mesorregião metropolitana de Belém, PA, BR. **Ci. Anim.Bras.**, v. 11, n. 3, p. 554-560, 2010.
- CLOSE, W.H. Producing pigs without antibiotic growth promoters. **Advances in Pork Production**, v. 11, p. 47-56, 2000.
- COPOLLA, M.M.; GIL-TURNES, C. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v.34, p.1297-1303, 2004.
- CORREA, G.S.S.; GOMES, A.V.C.; CORREA, A.B.; SALLES, A.S.; MATTOS, E.S. Efeito de antibiótico e probióticos sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.4, p. 467-473, 2013.

CORRIGAN, A.; HORGAN, K.; CLIPSON, N.; MURPHY, R. A. Effect of dietary supplementation with a *Saccharomyces cerevisiae* mannan oligosaccharide on the bacterial community structure of broiler cecal contents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 18, p. 6653-6662, 2011.

COX, N.A.; RICHARDSON, J.L.; BUHR, R.J.; FEDORKA CRAY, P.J. *Campylobacter* species occurrence within internal organs and tissues of commercial caged Leghorn laying hens. **Poultry Science**, v. 88, p.2449-2456, 2009.

COX, N. A.; RICHARDSON, L. J.; MAURER, J. J.; BERRANG, M. E.; FEDORKA-CRAY, P. J.; BUHR, R. J.; BYRD, J. A.; LEE, M. D.; HOFACRE, C. L.; O’KANE, P. M.; LAMMERDING, A. M.; CLARK, A. G.; THAYER, S. G.; DOYLE, M. P. Evidence for horizontal and vertical transmission in *Campylobacter* passage from hen to her progeny. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 75, n. 10, p. 1896-1902, out. 2012.

DEBRUYNE, L.; GEVERS, D. VANDAMME, P. “**Taxonomy of the family Campylobacteraceae**” in **Campylobacter**, 3rd. Edn, eds I. Nachamkin, C. M. Szymanski and M.J. Blaser (Washington, DC: ASM), 3–27, 2008.

DECKET, A.; VALDIVIESO-GARCIA, A.; REID-SMITH, R.; TAMBLYN, S; SELISKE, P.; IRWIN, R.; DEWY,C.; BOERLIN, P.; MCEWEN, S.A. Prevalence and antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp. isolated from retail chicken in two health units in Ontario. **Journal of Food Protection**, Ds Moines, Iowa, v. 73, n. 7, p. 1317-1324, 2010.

DENIS, M.; SOUMET, C.; RIVOAL, K.; ERMEL, G.; BLIVET, D.; SALVAT, G.; COLIN. P. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 406–410, 1999.

DEKEYSER, P; GOSSUIN-DETRAIN, M; BUTZLER, JP. et al. Acute enteritis due to related vibrio: first positive stool cultures. **J. Infect. Dis.** n. 125, p. 390-392, 1972.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. **Poultry Science**, v. 84, p. 634. 2005.

DIANAWATI, D.; MISHRA, V.; SHAH, N.P. Survival of microencapsulated probiotic bacteria after processing and during storage: a review. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 56, n.10, p.1685-716, 2015.

DOYLE, M.P.; ROMAN, D.J. Response of *Campylobacter jejuni* to sodium-chloride. **Appl. Environ. Microbiol.**, n.43, p.561-565, 1982.

CARVALHO, A.C.F.B.; LIMA, V.H.C.; PEREIRA, G.T.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. *Campylobacter* em granja avícola. **RPCV**, v.96, p.191-195, 2001.

CARVALHO, A.F. Detecção dos genes da toxina citoletal distensiva em estirpes de *Campylobacter jejuni* isoladas de carcaças de frangos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.62, n.5, p.1054-1061, 2010

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). *Campylobacter* infections. Atlanta.GA: Department of Health and Human Services. Centers for Diseases Control,

Division of Bacterial and Mycotic Diseases, 2005. Disponível em <http://www.sciencedirect.com> Acesso em 08 jun. 2014.

CORCIONIVOSCHI, N.; CLYNE, M.; LYONS, A.; ELMI, A.; GUNDOGDU, O.; WREN, B.W; et al. *Campylobacter jejuni* co-cultured with epitelial cells reduces surfasse capsular polysaccharide expression. **Infect. Immun.**, v.77, p. 1959-1967, 2009.

COSTA, P. M.; OLIVEIRA, M.; RAMOS, B.; BERNARDO, F. The impact of antimicrobial use in broiler chickens on growth performance and the occurrence of antimicrobial resistant *Escherichia coli*. **Livestock Science**, v. 136, p. 262-269, 2011.

DOMINGUES, C.H.F.; SANTOS, E.T.; CASTIBLANCO, D.M.C.; QUADROS, T.C.O.; PETROLI, T.G.; DUARTE, K.F.; JUNQUEIRA, O.M. Avaliação do desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas contendo probiótico nas diferentes fases de criação **Revista Agrocientífica**, v. 1, n.1, p. 7-16, 2014.

EDENS, F.W. An alternative for antibiotic use in poultry: Probiotics. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.5, n.2, p. 75-97, 2003

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) O Relatório Sumário da União Europeia sobre Tendências e Fontes de Zoonoses, Agentes Zoonóticos e Surto Alimentares em 2010. v. 10, n. 3, 2012.

Disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2012.2597/abstract> Acesso em 04 abr. 2017.

FAO/WHO (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Córdoba: Joint FAO/WHO Expert Consultation. Disponível em www.fao.org/3/a-a0512e.pdf Acesso em 22 set. 2017.

FERNÁNDEZ, H.; RODRÍGUEZ, R., BARUDI, C. et al. A case of acute diarrhea due to the emerging pathogen *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* in Southern Chile. **Braz. J. of Microbiol.** v. 34. p. 52-54. 2003.

FERNÁNDEZ, H.; VERA, F.; VILLANUEVA, M.P.; GARCIA, A. Occurrence of *Campylobacter* species in healthy well-nourished and malnourished children. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 1-3, 2008.

FERNANDEZ, H. Thermotolerant *Campylobacter* species associated with human diarrhea in Latin América. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.44, p. 39-44, 1992.

FERREIRA, A. J. P. **Exclusão competitiva na avicultura**. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL, Campinas. Anais...Campinas: CBNA, 2000. p. 6873. 2000.

FERREIRA, D. F. **Sistemas de análises estatísticas para dados balanceados**. Lavras: UFLA/ DEX/ SISVAR, 2003, 145p.

FERREIRA, I.M.S. **Caracterização da utilização de antimicrobianos em produção animal**. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, 2014.

FILGUEIRAS, A.L.; HOFER, E. Ocorrência de *Campylobacter* termofílico em diferentes pontos de uma estação de tratamento de esgotos na cidade do Rio de Janeiro. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, n. 20, p. 303-308, 1989.

FLEMMING, J.S.; FEITAS, R.J.S. Avaliação do efeito probiótico (MOS), probióticos (*Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*) e promotor de crescimento na alimentação de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.2, p.41-47, 2005.

FONSECA, B.B. et al. *Campylobacter* sp. in eggs from cloacal swab positive breeder hens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.573-5, 2006.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – Center for Food Safety and Applied Nutrition, USA. *Campylobacter jejuni* bad bug book, 2012. Disponível em <http://www.fda.gov> Acesso em 20 jun. 2014.

FORSYTHE, S.J. Microbiologia da segurança alimentar. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p. 2002

FOSTER, G.; HOLMES, B.; STEIGERWALT, A. G.; LAWSON, P. A; THORNE, P.; BYRER, D. E.; ROSS, H. M.; XERRY, J.; THOMPSON, P. M.; COLLINS, M. D. *Campylobacter insulaenigrae* sp. nov., isolated from marine mammals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, n.6, p.2369-2373, 2004.

FREITAS, J.A.; NORONHA, G.N. Ocorrência de *Campylobacter* spp. em carnes de miúdos de frango expostos ao consumo em Belém, Pará. **Arq. Bras. Med. Zootec.**, v. 59, n.3, p. 813-815, 2007.

FRIEDMAN, C. R.; NEIMANN, J.; WEGENER, H. C.; TAUXE, R. V. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: **Campylobacter**, 2nd edition, Washington, p.121, 2000.

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.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, n.5, p.365-378, 1989.

FURLAN, R.L. Probióticos e prebióticos no desenvolvimento morfofisiológico do trato gastrointestinal. In: **Conferência FACTA 2010 de ciência e tecnologia avícolas, 2010**, Santos, SP. Anais... Santos: FACTA, p.229-237, 2010.

GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141 Suppl 1, n. p. S15-28, 2010.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 2ª Edição, Editora Varela, 2003, p. 215-275.

GIBSON, G. R.; PROBERT, H.M.; LOO, J.V.; RASTALL, R.A.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. **Nutr. Res. Rev.**, v.17, p.259–275, 2004.

- GIBSON G.R.; ROBERFORID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota, introducing the connect of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p.140-1412,1995.
- GHAREEB, K.; AWAD, W. A.; MOHNL, M.; PORTA, R.; BIARNÉS, M.; BÖHM, J. et al. Evaluating the efficacy of an avian-specific probiotic to reduce the colonization of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. **Poult. Sci.**, v.91, p. 1825–1832, 2012.
- GODOI, H.S.; GANDRA, T.K.V.; GANDRA, E.A. *Campylobacter* spp em alimentos. Uma revisão. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia UNIPAR**, Umuarama, v.13, n.1, p.37-41, 2010.
- GÓRNIK, S. L.; SPINOSA, H. S. Antimicrobianos na Avicultura- Usos e Restrições, In: **Saúde Aviária e Doenças**, (Ed. Andreatti Filho, R. L.), p. 35-40, 2007.
- GONZALEZ, I.; GRANT, K.A.; RICHARDSON, P.T.; PARK, S.F.; COLLINS, M.D. Specific Identification of the Enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by Using a PCR Test Based on the *ceuE* Gene Encoding a Putative Virulence Determinant. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 35, n. 3, p. 759–763, 1997.
- GRIPP, E.; HLAHLA, D.; DIDELOT, X.; KOPS, F.; MAURISCHAT, S.; TEDIN, K. et al. Closely related *Campylobacter jejuni* strains from different sources reveal a generalist rather than a specialist lifestyle. **BMC Genomics**, v.12, p.584, 2011.
- GUILLOT, J.F. The pros and cons of probiotics – Make probiotics work for poultry. **World Poultry**, v.16, n.7, p. 18-21, 2000.
- GUNTHER, N.W.; CHEN, C.Y. The biofilm forming potential of bacterial species in the genus *Campylobacter*. **Food Microbiol.**, v.26, p.44–51, 2009.
- GUYARD-NICODÈME, M.; KEITA, A.; QUESNE, S.; AMELOT, M.; POEZEVARA, T.; LE BERRE, B. et al. Efficacy of feed additives against *Campylobacter* in live broilers during the entire rearing period. **Poult. Sci.**, v. 95, p.298–305, 2016.
- HAESE, D.; SILVA, B.A.N. Antibióticos como promotores de crescimento em monogástricos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.1, n.1, p.7-19, 2004.
- HAMMERL, J.A.; JÄCKEL, C.; ALTER, T.; JANZCYK, P.; STINGL, K.; KNÜVER, M.T., et al. Reduction of *Campylobacter jejuni* in broiler chicken by successive application of group II and group III phages. **PLoS One**, v.9, n.12, 2014.
- HAZELEGER, W.; ARKESTEIJN, C.; TOOROP-BOUMA, A.; BEUMER, R. Detection of the coccoid form of *Campylobacter jejuni* in chicken products with the use of the polymerase chain reaction. **Intern. J. Food Microbiol.**, v. 24, p.273-281, 1994.
- HOOGE, D. M.; ISHIMARU, H.; SIMS, M. D. Influence of dietary *Bacillus subtilis* C-3102 on live performance of broiler chickens in four controlled pen trials. **Journal of Applied Poultry Research**, v.13, p. 222–228, 2004.
- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1994, 789p.

HUYGHEBAERT, G.; DUCATELLE, R.; VAN IMMENSEEL, F. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. **The Veterinary Journal**, v.187, n.2, p.182-188, 2010.

IMMERSEELL, F.V.; CAUWERTS, K.; DEVRIESE, L.A.; HAESEBROUCKH, F.; DUCATELLE, R. Feed additives to control salmonella in poultry. **World Poultry Science Journal**, v. 58, p. 501-513, 2004.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Exerpts from ISO draft international standard 10272-1:2015. **Microbiology of food and animal feed — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter***. International Organization for Standardization, Geneve, Switzerland.

ITO, N.M.K.; MIYAJI, C.I.; LIMA, E.A.; OKABAYASHI, S. **Flora bacteriana: patologia do parasitismo bacteriano**. Ed. Elanco, p. 61-88, 2005.

JONES, F.S.; ORCUTT, M.; LITTLE, R.B. Vibrios (*Vibrio jejuni* n. sp.) associated with intestinal disorders of cows and calves. **The Journal of Experimental Medicine**. n.53, p. 853-864, 1931.

JOSHUA, G.W.; GUTHRIE-IRONS, C.; KARLYSHEV, A.V.; WREN, B.W. Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. **Microbiol.**, v.152, p.387–396, 2006.

JÓZEFIK, D.; RUTKOWSKI, A.; MARTIN, S. Carbohydrate fermentation in the avian ceca: a review. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.113,p. 1–15, 2004

JUNQUEIRA, O. M.; DUARTE, K. F. **Resultados de Pesquisa com aditivos alimentares no Brasil**. In: 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005, Goiânia. Anais... Goiânia, p. 169- 182, 2005.

JUNQUEIRA, O. M; ANDREOTTI, M.; OLIVEIRA, M. **Avanços na nutrição de aves**. In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA III CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA, 09-11 MAIO, 2001- Goiânia, GO, Anais...2001.

KETLEY, J.M. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. **Microbiology**, v. 143, p.5-21, 1997.

KHANNA, M.R.; BHAVSAR, S.P.; KAPADNIS, B.P. Effect of temperature on growth and chemotactic behaviour of *Campylobacter jejuni*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.43, p.84-90, 2006.

KIM, G.B.; SEO, Y.M.; KIM, S.H.; PAIK, I.K. Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora and immune response od broilers. **Poultry Science**, v. 90, p. 75-82, 2011.

KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M. et al. Bacilos gram negativos curvos e fermentadores oxidase positivos: *Campylobacteriaceae* e *Vibrionaceae*. Capitulo 6. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**. 2001. 5ªed. Ed. Medsi.

KONKEL, M.E.; CHRISTENSEN, J.A.; DHILLON, A.S.; LANE, A.B.; HARE-SANFORD, R.; SCHABERG, D.M.; LARSON, C.L. *Campylobacter jejuni* Strains Compete for Colonization in Broiler Chicks. **Applied Environ Microbiol**. Apr. 2297-2305, 2007.

KORCZAK, B.M.; STIEBER, R.; EMLER, S.; BURNENS, A.P.; FREY, J.; KUHNERT, P. Genetic relatedness within the genus *Campylobacter* inferred from rpoB sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 937–45, 2006.

LEANDRO, N.S.M.; OLIVEIRA, A.S.C.; CAFÉ, M.B.; GONZALES, E.; STRINGHINI, J. H.; CARVALHO, F. B.; ANDRADE, M. A. Efeito do prebiótico e do ácido butírico *in ovo* sobre o desempenho, digestibilidade dos nutrientes da ração e biometria do trato gastrointestinal de pintos submetidos ao jejum. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 4, p. 806-816, 2010.

LEE, M.D.; NEWELL, D.G. *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. **Avian Diseases**, v.50, p.1-9, 2006.

LIGOWSKA, M.; COHNA, M.T.; STABLERB, R.A.; WRENB, B.W.; BRONSTEDA, L. Effect of chicken meat environment on gene expression of *Campylobacter jejuni* and its relevance to survival in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, s.1, p. s111-s115, 2011.

LIMA, A.C.F.; PIZAULO JÚNIOR, J.M.; MACARI, M.; MALHEIROS, E.B. Efeito do uso de probiótico sobre o desempenho e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.1, p.200-207, 2003.

LINE, J.; HIETT, K.; COLAN, A. Comparison of challenge models for determining the colonization dose of *Campylobacter jejuni* in broiler chicks. **Poultry Science**. v.87, p.1700-1706, 2008.

LINTON, D.; LAWSON, A.J.; OWEN, R.J.; STANLEY, J. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.2568-2572, 1997.

LINTON, D.; OWEN, R.J.; STANLEY, J. Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. **Res. Microbiol.**,v.147, n.9, p.707–718, 1996.

LODDI, M.M. Uso de probiótico e antibiótico sobre o desempenho, rendimento e qualidade da carcaça de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 4, p. 1124-1131, 2000.

LORENÇON, L.; NUNES, R.V.N.; POZZA, P.C.; POZZA, M.S.S.; APPELT, M.D.; SILVA, W.M.S. Utilização de promotores de crescimento para frangos de corte em rações fareladas e peletizadas. **Acta Sci. Anim. Sci.**, v. 29, p.151-158, 2007.

LUEGAS, J.A.P.; ALBINO, L.F.T.; TAVERNARI, F.C.; BARROS, V.R.S.M.; PESSOA, G.B.S.; ROSTAGNO, H.S. Efeito da adição de probióticos na dieta sobre digestibilidade ileal da matéria seca e da proteína de frangos de corte. **Arch. Zootec.** v.64, p.247, 2015.

LUTFUL KABIR, S.M. The Role of Probiotics in the Poultry Industry. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, n.8, p. 3531-3546, 2009.

LUQUETTI, B.C.; FARIA FILHO, D.E.; FIGUEIREDO, D.F.; CRUZ, C.; AMARAL, C.M.C.; MACARI, M. Uso de prebiótico reduz o escore de lesão no intestino delgado

de frangos vacinados contra coccidiose. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Santos, suplemento 7, p. 203, 2005.

MACARI, M.; FURLAN, R.L. 2005. Probióticos. **Conferência de Ciência e Tecnologia Avícolas**, Santos, SP. Anais... Facta, v. 1, p.53-72, 2005.

MacFARLANE, G.T.; CUMMINGS, J.H. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? **BMJ**, v.18, p.999-1003, 1999.

MADALOZZO, F.R.; KOETZ, P.R.; SANTOS, L.R.; RODRIGUES, L.B. Campylobacteriose em humanos e o controle de qualidade em produtos de origem aviária. **Higiene Alimentar**, v.21, p.59-63, 2007.

MAHER, M.; FINNEGAN, C.; COLLINS, E.; WARD, B.; CARROLL, C.; CORMICAN, M. Evaluation of culture methods and a DNA probe-based PCR assay for detection of *Campylobacter* species in clinical specimens of feces. **J Clin Microbiol.**, v. 41, n. 7, p. 2980–2986, 2003.

MAIORKA, A.; SANTIN, E.; SUGETA, S.M.; ALMEIDA, J.G.; MACARI, M. Utilização de prebióticos, probióticos e simbióticos em dietas para frangos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 3, n. 2, p. 75-82, 2001.

MAÑES-LÁZARO, R.; VAN DIEMEN, P. M.; PIN, C.; MAYER, M. J. Administration of *Lactobacillus johnsonii* FI9785 to chickens affects colonisation by *Campylobacter jejuni* and the intestinal microbiota, **Journal British Poultry Science**, v 58, n.4, p. 373-381, 2017.

MARTINS, T.C.; MENDES, G.S.; DUQUE, S.S.; ESTEVES, W.T.C.; THOMÉ, J.D.S.; FILGUEIRAS, A.L.L. Veiculação de *Campylobacter* spp. através de carne e miúdos de frangos comercializados no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Vig. Sanit. Debate**, v. 3, n.1, p. 53-60.

MATTICK, K.; DURHMAN, K.; DOMINIGUE, G.; JØRGENSEN, F.; SEN, M.; SCHAFFNER, D. W.; HUMPHREY, T. The survival of foodborne pathogens during domestic washing up and subsequent transfer onto washing-up sponges, kitchen surfaces, and food. **International Journal of Food Microbiology**, Torino, v. 85, n. 3, p. 213-226, ago, 2003.

MAZIERO, M. T.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Effect of refrigeration and frozen storage on the *Campylobacter jejuni* recovery from naturally contaminated broiler carcasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 501-505, abr./jun. 2010.

McMULLIN, P. Produção Avícola sem Antibióticos: Riscos Potenciais de Contaminação e Detecção de Resíduos. **Poultry Health Services**, p. 219- 226, 2004.

MEAD, G. *Campylobacter* update - the challenge. **International Poultry Production**, v. 12, n. 4, p. 26-29. 2004.

MEDEIROS, V.M. **Isolamento e identificação fenotípica e molecular das espécies termofílicas de *Campylobacter* a partir de frango resfriado.** (2011) Dissertação de Mestrado, Fundação Oswaldo Cruz./Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ. 94p.

MENTEN, J.F.M.; PEDROSO, A.A. Fatores que interferem na eficácia de probióticos. Conferencia APINCO, Santos, 2005. **Anais, Santos, FACTA**, . p. 41-53, 2005.

- MOHAN, V. The role of probiotics in the inhibition of *Campylobacter jejuni* colonization and virulence attenuation. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v. 34, n. 1503–1513, 2015
- MORAIS, B.M.; JACOB, C.M.A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. **Jornal de Pediatria**, v. 82, p. 89-197, 2006.
- MOREIRA, J.; MENDES, A.A.; GARCIA, E.A. et al. Avaliação de desempenho, rendimento de carcaça e qualidade da carne do peito em frangos de linhagens de conformação versus convencionais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1663-1673, 2003.
- MOORE, J.E.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J.S.G.; FANNING, S.; LUCEY, B.; MATSUDA, M.; MCDOWELL, D.A.; MÉGRAUD, F.; MILLAR, B.C.; O'MAHONY, R.; O'RIORDAN, L.; O'ROURKE, M.; RAO, J.R.; ROONEY, P.J.; SAILS, A.; WHYTE, P. *Campylobacter*. **Vet. Res.**, v.36, p.351-382, 2005.
- MOURA, H.M. **Isolamento e análise de resistência a antimicrobianos de cepas de *Campylobacter jejuni* em amostras de carnes de aves resfriadas comercializadas no Distrito Federal**. 62f. Dissertação (Mestrado em saúde animal), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2010.
- MOURA, M.F.D. Avaliação da vida de prateleira de peito de frango sem pele sob refrigeração. 2011. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.
- MYLIUS, S.D.; NAUTA, M.J.; HAVELAAR, A.H. Cross-Contamination during food preparation: a mechanism model applied to chicken-borne *Campylobacter*. **Risk Analysis**, v.27, p.803-813, 2007.
- NACHAMKIN, I. *Campylobacter jejuni*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. Washington, D.C: ASM Press, 2001. chap. 9, p.179-192.
- NGUYEN, H.T.T.; CORRY, J.E.L.; MILES, C.A. Heat resistance and mechanism of heat inactivation in thermophilic *Campylobacters*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p.908-913, 2006.
- NICHOLSON, M.A.; PATTON, C.M. Evaluation of disk method for hippurate hydrolysis by *Campylobacter* species. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 5, p. 1341-1343, 1995.
- OBIRI-DANSO, K.; PAUL, N.; JONES, K. The effects of UVB and temperature on the survival of natural populations and pure cultures of *Campylobacter jejuni*, *Camp. coli*, *Camp. lari* and urease-positive thermophilic *Campylobacters* (UPTC) in surface waters. **J. Appl. Microbiol.**, v. 90, p.256–267, 2001.
- OIE. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Terrestrial Manual 2008**. Disponível em <http://www.oie.int> Acesso em 20 jul. 2014.
- OLIVEIRA, A.L et al. Enumeração de *Campylobacter* spp. e presença de *Campylobacter jejuni* em carcaças de frango no estado de Minas Gerais. **Ciência Rural**, v.43, n.3, 2013.

OLIVEIRA, K.A.M., MENDONÇA, R.C.S., ANDRADE, N.J., ALBINO, L.F.T. Ocorrência de *Campylobacter* no ambiente de criação de frango de corte. **Revista Ceres**, v. 55, p.556-561, 2008.

ON, S.L.W. Isolation, identification and subtyping of *Campylobacter*: Where to from here? **J. Microbiol. Meth.**, v.95, n.1, p.3-7, 2013.

PARK, S.F. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 177-188, 2002.

PASSOS, L.M.L.; PARK, Y.K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, vol.33, n.2 p.385-390, 2003

PATTERSON, J.A.; BURKHOLDER, K.M. Application of prebiotics in poultry production. **Poultry Science**, v. 82, p. 627-631, 2003.

PATTISON, M. Practical intervention strategies for *Campylobacter*. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.121S-125S, 2001.

PAULA, A.T.; FONSECA, B.B.; SILVA, M.S.; ROSSI, D.A. Viability of *Campylobacter jejuni* in commercial eggs. **Biosc J.**, v.25, n.6, p.143-148, 2009.

PAZ, A.S.D., ABREU, R.D., COSTA, M.C.M.M., JAEGER, S.M.P.L., ROCHA, A.P.; FERREIRA, B.P.; CAMPOS, B.M. Aditivos promotores de crescimento na alimentação de frangos de corte. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.11, n.2, p. 395-402, 2010.

PEDROSO, A.A.; MENTEN, J.F.M.; LAMBAIS, M.R. et al. Intestinal bacterial community and growth performance of chickens fed diets containing antibiotics. **Poultry Science**, v.85, n.1, p.747-752, 2006.

PELICANO, E.R.L.; SOUZA, P.A.; SOUZA, H.B.A. et al. **Desempenho zootécnico de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes probióticos**. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. Anais ... Santa Maria: Sociedade Brasileira de Zootecnia.

PELICANO, E.R.L.; SOUZA, P.A.; SOUZA, H.B.A.; OBA, A.; NORKUS, E.A.; KODAWARA, L.M.; LIMA, T.M.A. Morfometria e ultra-estrutura da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes probióticos. **Revista Portuguesa de Ciências Agrárias**, v.98 n.547, p.125-134, 2004.

PETRI, R. **Uso de exclusão competitiva na avicultura no Brasil**. In: II SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA, 2. 2000, Santa Maria. Anais... Rio Grande Sul: [s.n.],2000. p. 41.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.C.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**, Porto Alegre, ed Artmed, 173p., 2005.

RAMOS, L.S.N., LOPES, J.B., SILVA, S.M.M.S., SILVA, F.E.S.; RIBEIRO, M.N. Desempenho e histomorfometria intestinal de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade recebendo melhoradores de crescimento, **Bras. Zootec.**, v.40, n.8, p. 1738-1744, 2011.

REEZAL, A.; MCNEIL, B.; ANDERSON, J.G. Effect of low-osmolarity nutrient media on growth and culturability of *Campylobacter* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.2, p.4643-4649, 1998.

RIGOBELLO, E. C., MALUTA, R. P.; VILA F. A. Desempenho de frangos de corte suplementadas com probióticos, **Ars Veterinaria**, v.27, n.2, p. 111-115, 2011.

ROBERFROID, M. Prebiotics: The concept revisited. **J. Nutr.**, v.137, p.830–837, 2007.

ROBYN, J.; RASSCHAERT, G.; HERMANS, D.; PASMANS, F.; HEYNDRICKX M. In vivo broiler experiments to assess anti-*Campylobacter jejuni* activity of a live *Enterococcus faecalis* strain. **Poult. Sci.**, v.92, p. 265–271, 2013.

ROCHA, A. P. et al. Prebióticos, ácidos orgânicos e probióticos em rações para frangos de corte. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.11, n.3, p.793-801 jul/set, 2010.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F.; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. S.; BARRETO, S. L. T.; EUCLIDES, R. F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais de aves e suínos**. 3ªedição, Viçosa, MG: UFV, 2011.

SAHIM, O. et al. Detection and survival of *Campylobacter* in chicken eggs. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.1070-9, 2003.

SAINT-CYR, M.J.; GUYARD-NICODÈME, M.; MESSAOUDI, S.; CHEMALY, M.; CAPPELIER, J.M.; DOUSSET, X.; HADDAD, N. Recent Advances in Screening of Anti-*Campylobacter* Activity in Probiotics for Use in Poultry. **Front Microbiol.** v.7, p. 553, 2016.

SANTOS, A.A.J.; FERKET, P. R.; GRIMES, J. L.; EDENS, F. W. Dietary pentosanase supplementation of diets containing different qualities of wheat on growth performance and metabolizable energy of turkey poults. **International Journal of Poultry Science**, v.3, n.1, p. 33-45, 2004.

SAMPERS, A. et al. Survival of *Campylobacter* spp. In poultry meat preparations subjected to freezing, refrigeration, minor salt concentration and heat treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 147-153, 2010.

SANTINI, C.; BAFFONI, L.; GAGGIA, F.; GRANATA, M.; GASBARRI, R.; DI GIOIA, D.; BIAVATI, B. Characterization of probiotic strains: An application as feed additives in poultry against *Campylobacter jejuni*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 141, s98-s108, 2010.

SCARCELLI, E.; MIYASHIRO, S.; CAMPOS, F. R.; CASTRO, A. G. M.; TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P. Detecção de *Campylobacter jejuni* em carcaças e cortes de frangos pela Reação da Polimerase em Cadeia. **Higiene Alimentar**, v.19, n.129, p.71-76, 2005.

SCHWARZ, S., KEHRENBERG, C.; WALSH, T.R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **Int. Antimicrob Agents**, v.17, p. 431-437, 2001.

SEN, S.; INGALE, S. L.; KIM, Y. W.; KIM, J. S.; KIM, K. H.; LOHAKARE, J. D.; KIM, E. K.; KIM, H. S.; RYU, M. H.; KWON, I. K.; CHAE, B. J. Effect of

supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 to broiler diets on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 1, p. 264-268, 2012.

SHIBINY-EL, S.A.; CONNERTON, P.L.; CONNERTO, I.F. *Campylobacter* succession in broiler chickens. **Microbiol Vet.**, v.1, n.25, p.323-332, 2007.

SILVA, C. J.; VARGAS JR, F. M.; SILVA, I. S.; ARIAS, E. R. A.; CARRIJO, A. S.; GARCIA, R. G.; GOMES, R. F. Uso de prebiótico (Bio-MOS[®]) associado a diferentes níveis protéicos em rações de frangos de corte, **Agrarian**, v. 1, n. 1, p. 105-116, 2008.

SILVA D. T.; TEJADA T. S.; CUNHA C. C.; LOPES N. A.; AGOSTINETTO A.; COLLARES T.; LEON P.M.M.; TIMM C.D. Ocorrência de *Campylobacter* em carne de frango, fezes de frango e humanas e pesquisa dos genes *cdt*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 1, p. 297-304, 2014

SILVA L. P.; NÖRNBERG J. L. Prebióticos na nutrição de não- ruminantes. **Ciência Rural**, v. 33, p. 983-990, 2003.

SILVA, J.; LEITE, D.; FERNANDES, M.; MENA, C.; GIBBS, P.A.; TEIXEIRA, P. *Campylobacter* spp. as foodborne pathogen: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 1-12, 2011.

SILVA, W.T.M.; NUNES, R.V.; POZZA, P.C.; POZZA, M.S.S.; APPELT, M.D.; EYNG, C. Avaliação de inulina e probiótico para frangos de corte. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v.33, n.1, p. 19-24, 2011.

SMITH, C.K.; ABUOUN, M.; CAWTHRAW, S.A.; HUMPRHREY, T.J.; ROTHWELL, L.; KAISER, P.; BARROW, P.A.; JONES, M.A. *Campylobacter* colonization of the chicken induces a proinflammatory response in mucosal tissues. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v. 54, p.114-121, 2008.

SOLOMON, E.B.; HOOVER, D.G. Inactivation of *Campylobacter jejuni* by high hydrostatic pressure. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.38, p.505-509, 2004.

SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, K. A.; NEWMAN, 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**, v.79, p.205-211, 2000.

STERN, N.J. *Salmonella* species and *Campylobacter jejuni* cecal colonization model in broilers. **Poult Sci.**, v.87, p.2399-2403, 2008.

STRICKLING, J.A. et al. Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets: influences on nutrient digestion and microbial populations. **Anim Feed Sci Tech**, v.86, n.2, p.205-219, 2000.

STUCKI, U.R.S.; JOACHIM, F.; NICOLET, J.; BURNENS, A.P. Identification of *Campylobacter jejuni* on the basis of a species gene that encodes a membrane protein. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p. 855-859, 1995.

TAKAHASHI, K., AKIBA, Y.; MATSUDA, A. Effect of probiotic on immune responses in broiler chicks under different sanitary conditions or immune activations. **Animal Science of Technology**, v.68, p. 537-544, 1997.

THOMÉ, J.D.S. **Citotoxinas e hemolisinas produzidas por *Campylobacter jejuni* isolados de diferentes origens**. 88f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 2006.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, quarta edição, São Paulo, Atheneu, 2004.

TRACHOO, N.; FRANK, J.F.; STERN, N.J. Survival of *Campylobacter jejuni* in biofilms isolated from chicken houses. **J. Food Prot.**, v.65, p.1110–1116, 2002.

UBA - União Brasileira de Avicultura. **Protocolo de Boas Práticas de Produção de Frangos**. São Paulo. 47p, 2008.

USAMI, M.; MIYOSHI, M.; KANBARA, Y.; AYOAMA, M.; SAKAKI, H.; SHUNO, K.; HIRATA, K.; TAKAHASHI, M.; UENO, K.; TABATA, S.; ASAHARA, T.; NOMOTO, K. Effects of perioperative symbiotic treatment on infectious complications, intestinal integrity and fecal flora and organic acids in hepatic surgery with or without cirrhosis. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 35, n. 3, p. 317-328, 2011.

VANDAMME, P. Taxonomy of the family Campylobacteriaceae. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M.J. (Eds). *Campylobacter*, 2nd ed. Washington, DC:ASM Press, 2000. p. 3–26.

Van DEUN, K.; PASMANS, F.; DUCATELLE, D.; FLAHOU, B.; VISSENBERG, K.; MARTEL, A.; Van den BROECK, W.; Van IMMERSEEL, F.; HAESEBROUCK, F. 2008. Colonization strategy of *Campylobacter jejuni* results in persistent infection of the chicken gut. **Vet Microbiol.**, v.130, p.285-297, 2008

Van de GIESSEN, A. W. et al. Reduction of *Campylobacter* infections in broiler flocks by applications of hygiene measures. **Epidemiology and Infection**, v.121, p.57-66, 1998.

VINZENT R, DUMAS J, PICARD N. Septicémie grave au cours de la grossesse due à un Vibrión. Avortement consécutif. **Bull Acad Nat Med Paris**, v.131, p. 90–92, 1947.

WANG, J.; GUO, Y.C.; LI, N. Prevalence and risk assessment of *Campylobacter jejuni* in chicken in China. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 26, n. 4, p. 243-248, 2013.

WAITITU, SM.; YITBAREK, A.; MATINI, E.; ECHEVERRY, H.; KIARIE, E.; RODRIGUEZ-LECOMPTÉ, J. C.; NYACHOTI, C. M. Effect of supplementing direct-fed microbials on broiler performance, nutrient digestibilities, and immune responses. **Poultry Science**, v.93, n.3, p. 625–635, 2013.

WEDDERKOPP, A. et al. National surveillance of *Campylobacter* in broilers at slaughter in Denmark in 1998. **Avian Diseases**, v.44, n.4, p.993-9, 2000.

WILLIS, W.L.; REID, L. Investigating the effects of dietary probiotic feeding regimens on broiler chicken production and *Campylobacter jejuni* presence. **Poult. Sci.**, v.87, p.606–611, 2008.

WINE, E.; CHAN, V.L.; SHERMAN P.M. *Campylobacter jejuni* mediated disruption of polarized epithelial monolayers is cell-type specific, time dependent, and correlates with bacterial invasion. **Pediatr. Res.**, v.64, p. 599–604, 2008.

WINN, W.C.; KONEMAN, E.W. **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. 6 ed. Rio de Janeiro:Guanabara. 1565p., 2008.

YOSHIMURA, H.; ISHIMARU, M.; ENDOH, Y.S. et al. Antimicrobial susceptibilities of enterococci isolated from faeces of broiler and layer chickens. **Journal of Applied Microbiology**, v.31, n.6, p.427-432, 2000.

YU, B., LIU, J.R., HSIAO, F.S.; CHIOU, P.W.S. Evaluation of *Lactobacillus reuteri* Pg4 strain expressing heterologous β - glucanase as a probiotic in poultry diets based on barley. **Animal Feed Science Technololy**, p. 91-109, 2007.

YUN, W.; LEE, D. H.; CHOI, Y. I.; KIM, I.H.; CHO, J.H. Effects of supplementation of probiotics and prebiotics on growth performance, nutrient digestibility, organ weight, fecal microbiota, blood profile, and excreta noxious gas emissions in broilers, **The Journal of Applied Poultry Research**. 2017. Disponível em <https://doi.org/10.3382/japr/pfx033> Acesso em 30 de setembro de 2017.

ZILBAUER, M.; DORRELL, N.; WREN, B.W.; BAJAJ-ELLIOTT, M. *Campylobacter jejuni* – mediated disease pathogenesis: an update. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 2007.

ANEXOS

Anexo A – Descrição dos Aditivos Utilizados.

Anexo B - Solução FBP (LAURIA-FILGUEIRAS, 2000).

Anexo C – Croqui do galpão (IFRJ – Campus Pinheiral).

Anexo A – Descrição dos aditivos utilizados na formulação das rações experimentais

- Probiótico: Protexin Concentrate[®]

Aditivo Probiótico para alimentação animal

Peso Líquido: 1Kg

Composição básica do produto:

Lactobacillus plantarum, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, Dextrose (96,6670 %).

Níveis de garantia por kg de produto:

<i>Lactobacillus plantarum</i>	1.26 x 10 ⁸ UFC/g
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	2.06 x 10 ⁸ UFC/g
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2.06 x 10 ⁸ UFC/g
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	2.06 x 10 ⁸ UFC/g
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.00 x 10 ⁸ UFC/g
<i>Streptococcus thermophilus</i>	4.10 x 10 ⁸ UFC/g
<i>Enterococcus faecium</i>	6.46 x 10 ⁸ UFC/g

- Prebiótico: BioMos

Peso líquido: 25 kg

Composição básica do produto:

Mananligossacarídeo derivado da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

- Antibiótico: Avilamicina

Anexo B - Solução FBP (LAURIA-FILGUEIRAS, 2000)

Composição

Sulfato ferroso	0,5g
Bissulfito de sódio	0,5g
Piruvato de sódio	0,5g
Água destilada estéril	100 mL

Após esterilização por filtração, a solução será colocada em frasco âmbar e mantida por até 30 dias na geladeira (4°C).

Anexo C – Croqui do Galpão Experimental do Centro de Pesquisa Avícolas do IFRJ (Campus Pinheiral).

