



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

PAOLA DA SILVA

**ALTERNATIVA AOS ANTIMICROBIANOS MELHORADORES DE DESEMPENHO
EM DIETAS DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM *Eimeria* spp. e
*Clostridium perfringens***

CURITIBA
2021

PAOLA DA SILVA

**ALTERNATIVA AOS ANTIMICROBIANOS MELHORADORES DE DESEMPENHO
EM DIETAS DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM *Eimeria* spp. e
*Clostridium perfringens***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração: Biotecnologia, Produção e Reprodução Animal, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador(a): Prof. Dr. Leandro Batista Costa

Coorientador(a): Prof. Dr. Ricardo Vianna Nunes

**CURITIBA
2021**

TERMO DE APROVAÇÃO



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Ciências da Vida
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

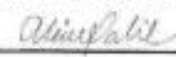
ATA Nº 0155 E PARECER FINAL DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ALUNA PAOLA DA SILVA

Aos trinta e um dias do mês de março do ano de dois mil e vinte e um, às 9h30 horas, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de defesa da dissertação da mestranda Paola da Silva, intitulada: "ASSOCIAÇÃO DE BUTIRADO DE SÓDIO, LEVEDURA HIDROLISADA E PROTEINATO DE ZINCO COMO ALTERNATIVA AOS ANTIMICROBIANOS MELHORADORES DE DESEMPENHO EM DIETAS DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM *Elmeria* spp. E *Clostridium perfringens*". A mestranda concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração em Saúde, Tecnologia e Produção Animal, segundo os registros constantes na secretaria do Programa. Os trabalhos foram conduzidos pelo Professor orientador e Presidente da banca, Dr. Leandro Batista Costa (PUCPR), auxiliado pela Professoras Doutora Aline Mondini Calil Racanicki (UNB) e pela Doutora Adriana Helena do Nascimento Ferreira (Alltech S/A). Procedeu-se a exposição da Dissertação, seguida de sua arguição pública e defesa. Encerrada a fase, os examinadores expediram o parecer final sobre a Dissertação, que foi considerada aprovada.

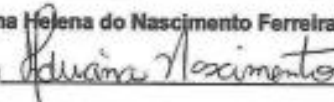
Prof. Dr. Leandro Batista Costa (Presidente)

Assinatura 

Profa. Dra. Aline Mondini Calil Racanicki (UNB)

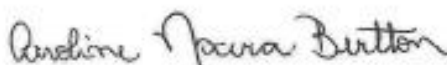
Assinatura 

Dra. Adriana Helena do Nascimento Ferreira (Alltech S/A)

Assinatura 

Proclamado o resultado, o Presidente da Banca Examinadora encerrou os trabalhos, e para que tudo conste, eu Caroline Nocera Bertton, confiro e assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora.

Curitiba, 31 de março de 2021.



Caroline Nocera Bertton
Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Escola de Ciências da Vida – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Rua Imaculada Conceição, 1155 – Bairro Prado Velho – CEP: 80215-901 – Curitiba, PR – Brasil
Tel (41) 3274-2615
Email: psa@pucpr.br www.pucpr.br/psa



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Ciências da Vida
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Renata Ermlund

Profa. Dra. Renata Ermlund Freitas de Macedo
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Escola de Ciências da Vida – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Rua Imaculada Conceição, 1155 – Bairro Prado Velho – CEP: 80215-901 – Curitiba, PR – Brasil
Tel (41) 3271-2615
Email: ppsa@pucpr.br www.pucpr.br/ppsa

Dedicatória

Dedico esta conquista à minha família e amigos que acompanharam essa trajetória.

E dedico à Deus, e Nossa Senhora, que me guiou e me abençoou, para que
pudesse chegar até aqui.

“Dou graças por todos os benefícios que até agora me tendes feito.
Eu vos amo senhora amabilíssima, e pelo amor que vos tenho prometo servir-vos
sempre, e fazer quanto possa para que de todos sejais servida”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder a vida, e a benção da fé em Nossa Senhora, que foi o alicerce para essa conquista.

À minha mãe, que durante toda à minha vida esteve disposta a fazer o que fosse necessário para ver nossa alegria, e principalmente por me ensinar a fé em Nossa Senhora; você é meu espelho mãe, a melhor de todas, a minha vida não teria sentido sem a senhora. Ao meu pai querido, por seu amor silencioso e sua bondade infinita, peço à Deus que possa conceder a meus filhos um pai como o senhor. A meus irmãos por toda compreensão e apoio. À minha melhor amiga, Eloisa, por me acompanhar em tudo e estar comigo independente da circunstância. E ao meu namorado, Gabriel, que não mede esforços para a nossa felicidade e que é meu porto seguro.

Ao professor Leandro, por toda a paciência e dedicação para com a minha formação, por todas as oportunidades concedidas e principalmente por acreditar em mim, mesmo quando nem eu acreditava.

Ao professor Ricardo por abrir as portas do Grupo Gemada para que pudesse realizar meu experimento de mestrado, e a todo o grupo, pela paciência e ensinamentos.

Aos colegas que auxiliaram na execução do experimento e em todos os momentos do mestrado.

À PUCPR, ao PPGCA e aos professores que acompanharam a trajetória do mestrado.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
FORMATO DA DISSERTAÇÃO/ TESE.....	ix
RESUMO GERAL.....	x
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
1. ANTIMICROBIANOS MELHORADORES DE DESEMPENHO NA INDÚSTRIA AVÍCOLA	3
2. ENTERITE NECRÓTICA.....	3
2.1 Clostridium perfringens.....	4
2.1.1 Toxinas.....	5
2.1.2 Bacteriocinas.....	7
2.1.3 Adesão	7
2.1.4 Enzimas.....	8
2.2 Fatores predisponentes à multiplicação do C. perfringens.....	8
2.2.1 Coccidiose.....	9
2.2.2 Fatores dietéticos	10
2.2.3 Estresse	12
2.3 Patogênese da Enterite Necrótica.....	12
3 ALTERNATIVAS NÃO ANTIBIÓTICAS	14
3.1 Butirato de Sódio.....	14
3.2 Prebióticos.....	16
3.3 Zinco.....	17
REFERÊNCIAS	18
CAPÍTULO 2: ALTERNATIVE TO ANTIMICROBIAL GROWTH PROMOTERS IN BROILERS DIETS, CHALLENGED WITH <i>Eimeria</i> spp. AND <i>Clostridium perfringens</i>	30
ABSTRACT	30

1. INTRODUCTION	31
2. MATERIAL AND METHODS.....	33
2.1 Experimental broiler and design	33
2.2 Challenge of the experimental animals.....	35
2.3 Growth performance and blood analysis	35
2.4 Gut permeability	36
2.5 Intestinal macroscopic lesions.....	36
2.6 Intestinal morphometry, carcass cut yield and gastrointestinal tract liver weight.....	37
2.7 Statistical Analysis.....	37
3. RESULTS	38
4. DISCUSSION.....	42
5. CONCLUSION	44
6. REFERENCES	45
CAPÍTULO 3.....	50

FORMATO DA DISSERTAÇÃO/ TESE

A presente dissertação é composta por capítulos. O capítulo 1 apresenta uma introdução geral e a revisão de literatura sobre o tema, além de referências relacionadas ao capítulo. O capítulo 2 trata-se de artigo científico completo, contendo referências e o capítulo 3 finaliza esta dissertação com considerações finais e impacto e perspectivas do trabalho.

RESUMO GERAL

A enterite necrótica (EN) é uma doença de distribuição mundial, que acarreta prejuízos econômicos na escala de 6 bilhões de dólares anualmente. O agente etiológico é o *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*), habitante da microbiota nativa das aves, sendo necessária a presença de fatores predisponentes para a evolução da doença. Como principal fator predisponente está a infecção por *Eimeria* spp., doença endêmica e que causa grandes prejuízos na avicultura. Após a retirada de antibióticos melhoradores de desempenho (AMD) da dieta dos animais de produção, alternativas estão sendo desenvolvidas, destacando as alternativas nutricionais. Diante disso, o objetivo do presente estudo é avaliar a adição de um produto composto pela associação de butirato de sódio, levedura hidrolisada e proteinato de zinco (Viligen™), em dietas de frangos de corte desafiados por *Eimeria* spp. e *C. perfringens*, sobre o desempenho, parâmetros sanguíneos, permeabilidade, morfologia e lesões intestinais, e rendimento de carcaça. Foram utilizados 1150 pintos machos de 1 dia (Cobb 500, Cobb Vantress Ltd., Cascavel, PR, BR) com um peso inicial médio de $43,97 \pm 0,65$ g, que foram alocados em 50 boxes e divididos em 5 tratamentos, compostos por 10 repetições e 23 animais por unidade experimental. Todos os animais foram desafiados por *Eimeria* spp. aos 7 dias de idade, e por *C. perfringens* aos 17, 18 e 19 dias, para indução de EN subclínica. Os animais foram distribuídos em 5 tratamentos sendo eles: Controle negativo (CN) – Dieta controle, sem adição de AMD; Controle positivo (CP) – Dieta controle com adição de $0,12 \text{ g ton}^{-1}$ de Enramicina (8%); (500) – CN, com adição de 500 g ton^{-1} de Viligen™; (1,000) – CN, com adição de $1,000 \text{ g ton}^{-1}$ de Viligen™; (1,500) – CN, com adição de 1500 g ton^{-1} de Viligen™. As aves dos tratamentos que receberam o aditivo apresentaram parâmetros de desempenho, sanguíneos, permeabilidade intestinal e rendimento de carcaça semelhantes aos animais que receberam o AMD. A adição de 1.500 g ton^{-1} de Viligen™ reduziu as lesões intestinais aos 28 dias ($P < 0,05$), e o nível de 500 g ton^{-1} de Viligen™ melhorou a morfologia intestinal dos animais ($P < 0,05$) aos 21 dias. Sendo assim, conclui-se que a adição de Viligen™ à dieta de frangos de corte desafiados por um modelo experimental de EN subclínica proporcionou desempenho semelhante ao obtido pela adição de Enramicina, além

de benefícios à saúde intestinal, podendo ser considerado como alternativa na redução dos efeitos da EN subclínica em frangos de corte.

Palavras-chave: Enterite necrótica subclínica, Alternativas não antibióticas, Performance.

ABSTRACT

Necrotic enteritis (NE) is a worldwide disease that causes economic losses on the scale of \$6 billion annually. The etiological agent is *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*), which inhabits the native microbiota of birds, requiring the presence of predisposing factors for the evolution of the disease. The main predisposing factor is infection by *Eimeria* spp., an endemic disease that causes great damage to poultry. After the withdrawal of antimicrobial growth promoters (AGP) from the diet of farm animals, alternatives are being developed, highlighting nutritional alternatives. Therefore, the aim of this study is to evaluate the addition of a product composed by the association of sodium butyrate, hydrolyzed yeast and zinc proteinate (Viligen™), in broiler diets challenged by *Eimeria* spp. and *C. perfringens*, on performance, blood parameters, permeability, intestinal morphology and lesions, and carcass yield. 1150 day-old male chicks were used (Cobb 500, Cobb Vantress Ltd., Cascavel, PR, BR) with an average initial weight of 43.97 ± 0.65 g, which were placed in 50 pens and divided into 5 treatments, composed by 10 replicates and 23 broilers per experimental unit. All animals were challenged by *Eimeria* spp. at 7 days of age, and by *C. perfringens* at 17, 18 and 19 days, for induction of subclinical EN. The animals were distributed in 5 treatments, namely: Negative Control (CN) – Control diet, without addition of AGPD; Positive Control (PC) – Control diet with addition of 0.12 g ton⁻¹ of Enramycin (8%); (500) – CN, with addition of 500 g ton⁻¹ of Viligen™; (1.000) – CN, with the addition of 1,000 g ton⁻¹ of Viligen™; (1,500) – CN, with the addition of 1500 g ton⁻¹ of Viligen™. The birds of the treatments that received the additive had performance, blood, intestinal permeability and carcass yield parameters similar to the animals that received the AGP. The addition of 1,500 g ton⁻¹ of Viligen™ reduced intestinal lesions at 28 days ($P < 0.05$), and the level of 500 g ton⁻¹ of Viligen™ improved the intestinal morphology of the animals ($P < 0.05$) at 21 days. Therefore, it is concluded that the addition of Viligen™ to the diet of broilers challenged by an experimental model of subclinical NE provided performance similar to that obtained

by adding Enramycin, in addition to benefits to intestinal health, and can be considered as an alternative in reducing the effects of subclinical EN in broiler chickens.

Key-words: Subclinical necrotic enteritis, Non antibiotic alternatives, Performance.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

No cenário da avicultura mundial, o Brasil ocupa uma posição de destaque, sendo que desde o ano de 2003 está entre os três maiores produtores de carne de frango. Atualmente o país é o terceiro maior produtor mundial (13,2%), atrás dos EUA e China, e primeiro exportador mundial de carne de frango, representando 34% do volume mundial exportado (ABPA, 2020).

Em relatório emitido pela FAO em 2020, a projeção para o final da próxima década é a produção 34,9 milhões de toneladas de carne de frango, bovina e suína. Essa variação entre o ano inicial e final da projeção resulta em aumento de produção de 23,8% sendo que o maior aumento de produção deve ocorrer para a carne de frango, representando cerca de 28,1%.

Segundo Rodrigues et al. (2014) o desenvolvimento da cadeia produtiva avícola nas últimas décadas se deve à investimentos em melhoramento genético, nutrição, sanidade, manejo e a implementação de tecnologias em todo o processo produtivo. Como importante variável na produção avícola está a integridade e saúde do trato gastrointestinal, que interferem diretamente no desempenho destes animais.

Durante décadas os antimicrobianos melhoradores de desempenho (AMD) foram adicionados em subdoses à dieta de animais de produção por melhorar o desempenho produtivo (Van Immerseel et al., 2008). A utilização dos AMD é baseada na seleção dos microrganismos presentes no trato gastrointestinal, reduzindo a população de patógenos e possíveis interferências na digestão e absorção dos nutrientes da dieta (Mehdi et al., 2018). Porém, alguns países baniram a utilização de tais compostos na alimentação animal devido a possível presença de resíduos de antimicrobianos em produtos para consumo humano, o que poderia estar associado à resistência bacteriana (Belote et al., 2018), com consequente prejuízos à saúde humana. Com a proibição do uso de AMD houve aumento na incidência de doenças infecciosas na cadeia avícola, destacando-se as gastroenterites (Tisiouris et al., 2016).

Considerada uma das doenças de maior impacto na avicultura, a enterite necrótica (EN) é uma enterotoxemia; o *Clostridium perfringens* considerado o principal

agente etiológico é um bacilo gram positivo, anaeróbio, formador de esporos, e presente na microbiota nativa das aves (Fasina et al., 2019). A doença acomete aves jovens e pode se manifestar de forma clínica, em que o lote apresenta apatia, diarreia de cor escura e alta morbidade e mortalidade. De forma mais frequente ocorre a manifestação subclínica em que os sinais clínicos são inespecíficos e inaparentes, há baixa mortalidade e redução do desempenho produtivo (Paiva & McElroy et al., 2014). Para que a doença ocorra é necessário um ambiente favorável à multiplicação do *C. perfringens*, como a presença de fatores que provoquem dano à mucosa, alteração do trânsito intestinal, da microbiota e do status imune das aves (Moore et al., 2016). São citados como fatores predisponentes: lesões ocasionadas por protozoários da família *Eimeria* spp., fatores antinutricionais, presença de proteína de origem animal na dieta, estresse e alta densidade. Apesar da longa lista, a coinfeção com *Eimeria* spp. é considerada essencial para estabelecimento da doença (Dierick et al., 2020), por gerar lesões no epitélio intestinal do hospedeiro e aumentar a produção de muco, favorecendo a multiplicação de *C. perfringens*.

Em função da redução do desempenho das aves, esta enfermidade representa um custo anual de 6 bilhões de dólares mundialmente (Wade & Keyburn et al., 2015), o que desperta a necessidade de estudos em busca de alternativas de controle e prevenção da EN (Lee et al., 2011). Além da vacinação, os aditivos zootécnicos como probióticos, prebióticos, ácidos orgânicos, óleos essenciais e minerais orgânicos estão entre as alternativas em potencial (Adhikari et al., 2019). A avaliação de parâmetros de desempenho, resposta imunológica e saúde intestinal são utilizadas na determinação da resposta de cada alternativa, sendo desejável que os resultados sejam similares ou melhores aos valores obtidos com utilização de AMD.

Diante da dificuldade em encontrar alternativas não antibióticas que reduzam efetivamente os prejuízos da EN em frangos de corte, esta dissertação tem como objetivo avaliar a inclusão de um aditivo composto por butirato de sódio, levedura hidrolisada e proteinato de zinco (Viligen™) à dieta de frangos de corte desafiados por *Eimeria* spp. e *C. perfringens*, e sua ação sobre o desempenho, rendimento de carcaça, parâmetros sanguíneos, permeabilidade intestinal, lesões macroscópicas e morfologia intestinal.

REVISÃO DE LITERATURA

1. ANTIMICROBIANOS MELHORADORES DE DESEMPENHO NA INDÚSTRIA AVÍCOLA

A utilização de melhoradores de desempenho juntamente a práticas de higiene e biossegurança auxiliaram no crescimento da indústria avícola por prevenir os impactos negativos causados por diversas doenças (Mehdi et al., 2018). Durante décadas, antimicrobianos em subdoses foram adicionadas às dietas de animais de produção rotineiramente em várias partes do mundo, por melhorar a performance produtiva (Van Immerseel et al., 2008).

Os antimicrobianos são classificados de acordo com as bactérias alvo e o modo de ação, podendo ser bactericida, ao matar o microrganismo, ou bacteriostático, ao reduzir a multiplicação de bactérias, facilitando a fagocitose por células do sistema imunológico do hospedeiro (Mehdi et al., 2018). A atuação destes medicamentos como melhoradores de desempenho está relacionada à modulação da microbiota intestinal, reduzindo o número de microrganismos patogênicos (Belote et al., 2018). Além disso, a redução do custo metabólico da inflamação, decorrente da prevenção de patologias intestinais sustenta a hipótese de melhora no desempenho, por favorecer a saúde intestinal e consequentemente a utilização dos nutrientes da dieta (Crisol-Martínez et al., 2017).

Apesar dos benefícios, alguns países baniram a utilização destes produtos como melhoradores de desempenho, pois sua utilização poderia resultar no desenvolvimento de patógenos resistentes a outros antimicrobianos, incluindo os utilizados na medicina humana (Cao et al., 2020). A proibição destes produtos contribuiu para o aumento na incidência de gastroenterites nos plantéis avícolas de todo o mundo, destacando-se a enterite necrótica (EN) (Van Immerseel et al., 2008).

Em resposta à proibição do uso de AMD nas dietas, a busca por alternativas que reduzam os efeitos negativos da EN na indústria avícola está cada vez mais presente. Para isso é necessário o entendimento da patofisiologia da doença e como cada fator desencadeante atua sobre a multiplicação do *C. perfringens*.

2. ENTERITE NECRÓTICA

Entre as principais doenças presentes na avicultura moderna, está a enterite necrótica, uma gastroenterite que afeta aves jovens, caracterizada por inflamação e necrose da mucosa intestinal (Back et al., 2019). Representa um prejuízo econômico de 6 bilhões de dólares anualmente para avicultura mundial (Wade & Keyburn, 2015) e segundo Smith e Helm (2008), juntamente à coccidiose são consideradas as doenças mais importantes na avicultura dos EUA.

Apesar do primeiro relato datar de 1961 (Parish, 1961), por décadas a doença foi controlada pela adição de AMD às dietas (Willians, 2005). No entanto, a redução na utilização de tais aditivos na avicultura moderna, pela problemática da resistência bacteriana, resultou na reemergência da doença nos plantéis avícolas de todo o mundo (Lee et al., 2011).

Em forma clínica grave, a EN pode resultar em mortalidade de 10-40% do lote (Zahoor et al., 2018). Já a forma mais frequente, a subclínica, é caracterizada por redução do desempenho dos animais e aumento das condenações no abatedouro decorrente da desuniformidade do lote (Paiva & McElroy, 2014). Diversos fatores interferem na ocorrência da EN, destacando-se a presença de enfermidades que provocam lesão da mucosa intestinal, manejos nutricionais e de ambiência inadequados, e condições que limitam a resposta imunológica do hospedeiro (Moore et al., 2016).

O principal agente responsável pela manifestação da doença é o *C. perfringens*, patógeno associado à diversas doenças de origem alimentar em humanos, tendo como principal veículo as carnes bovina e de frango (Mora et al., 2020). Portanto, o entendimento da patogênese da doença é necessário para a determinação de medidas de controle, prevenção e tratamento da EN em animais, e consequente redução de problemas em saúde pública.

2.1 *Clostridium perfringens*

O *C. perfringens* é considerado o principal agente etiológico de diversas enfermidades, incluindo gangrena gasosa, enterite e/ou enterotoxemia em humanos e animais de produção (Ohtani & Shimizu, 2014). De acordo com dados publicados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (CDC) (2019), *C. perfringens* está entre as cinco causas mais frequentes de intoxicação alimentar nos Estados Unidos.

C. perfringens é um bacilo gram positivo, anaeróbico, formador de esporos (Timbermont et al., 2011), está presente no solo e é constituinte da microbiota nativa de diversas espécies, incluindo humanos e animais (Fasina et al., 2016). Está presente no intestino de aves saudáveis na concentração aproximada de 10^4 unidades formadoras de colônia (UFC) de *C. perfringens* por g de digesta (Mora et al., 2020).

É classificado em 5 tipos (A – E) de acordo com os tipos de toxinas produzidas (alfa-, beta-, epsilon-, e iota), sendo o tipo A considerado o principal envolvido nas enterotoxemias humana e animal (Petit et al., 1999). Além da produção de toxinas, é caracterizado por produzir bacteriocinas, adesinas, enzimas colagenolíticas e proteolíticas, que estão entre os fatores de virulência relacionados ao microrganismo (Mora et al., 2020), sendo considerado um dos patógenos de crescimento mais rápido conhecidos (Prescott et al., 2016).

2.1.1 Toxinas

A ação celular de muitas toxinas de *C. perfringens* envolve a ligação inicial a um receptor localizado na membrana plasmática das células-alvo, seguida pela ativação das vias intracelulares e uma variedade de efeitos citopáticos que eventualmente levam à morte celular (Navarro et al., 2018). A alfa toxina é uma fosfolipase esfingomielase C, dependente de Zn para a hidrólise de fosfolipídios (McDevitt et al., 2006), desorganizando a membrana celular de eritrócitos, fagócitos, fibroblastos, plaquetas, leucócitos, miócitos e células endoteliais (Titball et al., 1999). No início, a alfa-toxina era considerada responsável por desencadear a EN, porém Keyburn et al. (2006) verificaram que cepas de *C. perfringens* que não produzem alfa toxina, são capazes de provocar a EN, indicando que a EN provavelmente pode ser mediada por outras toxinas.

Segundo Keyburn et al. (2008), a toxina *Clostridium perfringens* Tipo Beta (NetB) é considerada determinante na indução de EN em aves ao avaliar seu efeito isolado. A NetB é membro da família de toxinas formadoras de poros (Timbermont et al., 2011), e recentemente foi descoberto que a toxina se liga ao CD31 (PECAM-1), uma molécula constituinte da matriz extracelular (Bruggisser et al., 2020), permitindo a formação de poros, e a entrada de cátions na célula, resultando em inchaço e lise celular (Zaragoza et al., 2019). A produção desta toxina é estimulada quando a

concentração de *C. perfringens* é maior que 10^9 UFC por g de digesta e há um ambiente propício para proliferação do microrganismo (Mora et al., 2020), sendo que os nutrientes liberados pela ruptura celular podem ser utilizados pelo *C. perfringens* (Cheung et al., 2010).

As toxinas glicosilantes clostridiais têm ação direta sobre patologias envolvendo o *Clostridium* em doenças de humanos e animais. *Clostridium difficile* produz a toxina A e B, responsáveis pela diarreia associada a disbiose provocada pela administração de antibióticos e a colite pseudomembranosa em humanos (Chen & McClane, 2015). Recentemente foi descoberta a TpeL, toxina glicosilante produzida por cepas patogênicas de *C. perfringens*, que está entre os fatores de virulência do microrganismo, e se ligam à receptores LRP1 das células hospedeiras (Schorch et al., 2014). Coursodon et al. (2012) avaliaram as lesões intestinais causadas por cepas com TpeL positivo e negativo, e demonstraram que as cepas com TpeL positivo apresentaram lesões mais severas, o que pode indicar que a TpeL potencializa o efeito de outros fatores de virulência associadas a *C. perfringens*, resultando em doença com um curso mais rápido e mais severa.

Em estudo realizado por Gu et al. (2019), a inoculação de cepas TpeL e NetB positivas provocaram EN mais severa em animais contaminados com *C. perfringens*. Os autores concluíram que a presença de NetB e TpeL é essencial para o desenvolvimento de *C. perfringens* isolado.

Outra toxina citada na patogenia do *C. perfringens* é a CPE (*Clostridium perfringens* enterotoxina), toxina membro da família das toxinas formadoras de poros, e está relacionada ao aumento da permeabilidade intestinal do hospedeiro (Navarro et al., 2018). A interação entre a CPE e as proteínas que formam as junções intercelulares (claudinas) formam pequenos complexos, que juntos dão origem a um poro na membrana plasmática chamado CH-1, provocando um influxo de cálcio que leva à ativação de calpaínas, liberam caspase-3 e ativam a apoptose celular (Freedman et al., 2016). As alterações provocadas pela CPE levam a destruição das junções intercelulares e aumento da permeabilidade intestinal, que leva a translocação bacteriana para a circulação portal, podendo resultar em infecções sistêmicas (La Torre et al., 2018).

As alterações provocadas por toxinas são consideradas como principais componentes de patogenicidade do CP, diante disso, é necessária a busca por compreensão do exato mecanismo de produção, liberação e atuação de tais toxinas.

2.1.2 Bacteriocinas

As bacteriocinas são pequenas moléculas proteicas de forte atividade antimicrobiana em concentrações precisas (Chikindas et al. 2018). Esses peptídeos antimicrobianos têm atividade bacteriostática ou bactericida, principalmente direcionadas contra bactérias similares à cepa produtora (Hatakka & Saxelin, 2008). Timbermont et al. (2011) afirmam que as bacteriocinas têm um importante papel na EN. Essa conclusão resulta da presença de diferentes genótipos de *C. perfringens* tipo A no intestino de uma ave saudável, e a predominância de uma cepa específica de *C. perfringens* em aves infectadas.

Recentemente foi descoberta a Perfrin, bacteriocina secretada por uma cepa patogênica de *C. perfringens* (Timbermont et al., 2014), que inibe o crescimento de outras cepas de *Clostridium*, permitindo uma maior disponibilidade de nutrientes para a cepa predominante e consequentemente dano mais expressivo à mucosa do hospedeiro (Mora et al., 2020). Os componentes que causam a inibição do crescimento interespecie em *C. perfringens* são desconhecidos, e a Perfrin, não apresenta qualquer homologia com bacteriocinas ou proteínas antimicrobianas atualmente conhecidas (Razmyar et al., 2017).

2.1.3 Adesão

A adesão às células do hospedeiro é o primeiro passo para a colonização bacteriana (Llanco et al., 2017). A habilidade de adesão ao epitélio através de moléculas da matriz extracelular (MMEC) está entre os fatores de virulência associados a enteropatógenos (Wade et al., 2016). Tais moléculas não estão expostas em tecidos saudáveis, porém em situação de dano tecidual, patógenos utilizam tais moléculas para a adesão às células do hospedeiro (Timbermont et al., 2011). O dano tecidual prévio a EN está geralmente associado à coinfeção por *Eimeria* spp., ação de enzimas proteolíticas e algumas toxinas produzidas por *C. perfringens*, que facilita a adesão de fimbrias a componentes da matriz extracelular do tipo III, IV, V, fibrinogênio e vitronectina (Mora et al., 2020).

Estudos têm demonstrado que o processo de adesão de *C. perfringens* às células HEp-2 pode ser mediado pela presença de pili tipo IV, que tem papel importante na formação de biofilme nas células epiteliais, e a capacidade de adesão às células do hospedeiro está diretamente associada a presença da toxina TpeL (Llanco et al., 2017).

2.1.4 Enzimas

O trato gastrointestinal de humanos e animais é revestido por muco, que atua como a primeira linha de defesa contra patógenos no trato gastrointestinal. (Low et al., 2020). Várias bactérias comensais e patogênicas se adaptam a colonização de muco pela aquisição de um conjunto de enzimas especializadas em quebrar glicanos complexos, liberando açúcar metabolizável (Ashida et al., 2011). *C. perfringens* produz enzimas extracelulares chamadas glicosídeos hidrolases (GH), que estão envolvidas na capacidade mucolítica do microrganismo (Ficko-Blean E Boraston, 2009), degradando a mucina e liberando energia ao *C. perfringens* ao mesmo tempo que reduz a barreira de proteção da mucosa do trato intestinal (Duff et al., 2019).

Desta maneira, conclui-se que a patogênese da enterite necrótica é um processo complexo, que envolve muitos outros fatores além da produção de toxinas, sendo importante que estudos futuros busquem respostas em outros fatores de virulência, como a de produção de enzimas, bacteriocinas, fatores de aderência, e a relação entre eles para determinação de medidas profiláticas contra a EN.

2.2 Fatores predisponentes à multiplicação do *C. perfringens*

O *C. perfringens* é um microrganismo onipresente na cadeia avícola (Fasina & Lillhoj, 2019). Concentrações de até 10^4 UFC de *C. perfringens* por g de digesta estão presentes no trato gastrointestinal de aves saudáveis, caracterizando este microrganismo como componente de sua microbiota nativa (Paiva E McElroy, 2014). Manifestações clínicas apresentam concentrações acima de 10^9 UFC de *C. perfringens* por g de digesta, em que há início da produção de fatores de virulência (Mora et al., 2020).

A multiplicação de CP está associada a presença de um ambiente favorável para obtenção de nutrientes e facilidade de acesso às células do hospedeiro, que é resultante de diversos fatores nutricionais, imunológicos e patológicos.

2.2.1 Coccidiose

Dentre os fatores predisponentes, o mais estudado é a coinfeção por coccidiose, doença infecciosa causada por parasitas do gênero *Eimeria* (Adhikari et al., 2020). Oocistos de coccídeos estão presentes em todo o ciclo de produção avícola; seu ciclo é complexo, possuindo fases ambientais e no lúmen intestinal, dividida ainda em assexuada e sexuada (Paiva & McElroy, 2014).

Em resumo, os oocistos infectantes estão presentes no ambiente (água, ração e cama), são ingeridos, e por ação gástrica liberam 4 esporocistos contendo 2 esporozoítos cada (Berchieri Júnior et al., 2009). Os esporozoítos liberados penetram nos enterócitos, evoluem para trofozoítos e após para esquizontes, que rompem a célula intestinal e penetram em outra célula para se transformar em merozoítos, que passam por dois a quatro ciclos, e após liberados se diferenciam em masculino e feminino (Bozkurt et al., 2016). A fase sexuada ocorre em outra célula onde há a fusão do gameta feminino com o masculino dando origem ao oocisto, que é liberado para o lúmen intestinal e posteriormente para o ambiente, sendo que dentro de 2 dias, em condições de umidade e temperatura elevada, esporulam e se tornam infectante (Back et al., 2019).

A infecção por *Eimeria* spp. leva à diversos fatores que propiciam o desenvolvimento de EN. A destruição das células causada pelas fases de reprodução (assexuada e sexuada) do parasita leva à extravasamento do conteúdo intracelular para o lúmen intestinal, e redução da digestibilidade dos nutrientes da dieta fornecendo substrato para a multiplicação do *C. perfringens*. Com a exposição de moléculas da matriz extracelular pela destruição celular, a adesão do *C. perfringens* às células do hospedeiro é facilitada, além de induzir a resposta inflamatória, o que aumenta a produção de muco, favorecendo o desenvolvimento do *C. perfringens* por sua habilidade mucolítica (Paiva & McElroy, 2014; Moore et al., 2016; Adhikari et al., 2020, Back et al., 2019).

O controle da coccidiose é realizado através de anticoccidianos adicionados à dieta e mais recentemente a administração de vacinas, que resultam em um baixo nível de infecção do trato intestinal, necessário para a indução da imunidade (Smith et al., 2019). A resposta da mucosa à vacinação envolve um aumento na produção de mucina que pode facilitar a multiplicação de *C. perfringens* (Orso et al., 2020).

Portanto, a administração da vacina isolada tem apresentado problemas de manejo em escala comercial, o que leva à administração de antibióticos como tratamento (Smith et al., 2019).

Por ser considerada o fator predisponente mais importante na determinação da EN, a prevenção da coccidiose se torna essencial para seu controle. Diante disso, a busca por alternativas não antibióticas que reduzam os danos provocados pela doença e complementos à vacina, vêm sendo alvo das pesquisas em todo o mundo (Adhikari et al., 2020).

2.2.2 Fatores dietéticos

Certos componentes dietéticos podem alterar a microbiota, as propriedades físicas da digesta, e reduzir a digestibilidade dos nutrientes (Moore et al., 2016), promovendo um ambiente ideal para a multiplicação de *C. perfringens*.

Segundo Timbermont et al. (2011) dietas contendo cereais como trigo, aveia, centeio e cevada, predispõe à multiplicação de *C. perfringens*, por conter em sua composição altas concentrações de polissacarídeos não amiláceos (PNAs) solúveis em água, resultando no aumento da viscosidade da dieta. Com a viscosidade alterada, o trânsito intestinal se torna mais lento, e o acesso de enzimas digestivas ao conteúdo alimentar é reduzido, o que piora a digestibilidade dos nutrientes facilitando a utilização dos mesmos por patógenos (Adhikari et al., 2019; Paiva & McElroy, 2014). Além disso, dietas contendo carboidratos complexos estimulam a produção de muco, que é utilizado por *C. perfringens* através de sua habilidade mucolítica (M'Sadek et al., 2015).

Altos níveis proteicos na dieta são considerados estimulantes da proliferação de *C. perfringens* (Paiva & McElroy, 2014), por resultar em alta concentração de proteína no final do intestino delgado, servindo como substrato para proliferação de patógenos (Timbermont et al., 2011). Além disso, o metabolismo proteico resulta em liberação de amônia, que alcaliniza o pH, favorecendo a proliferação de *C. perfringens* (Adhikari et al., 2020).

Segundo Drew et al. (2004), a inclusão de fontes proteicas de origem animal à dieta, como a farinha de peixe, resulta em maior incidência de EN, e pode ser atribuído à alta concentração de proteína presente neste ingrediente. Wu et al. (2014) adicionaram farinha de peixe à dieta de frangos de corte e os animais apresentaram

alterações na microbiota intestinal caracterizadas por aumento de microrganismos das famílias Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, Clostridiales e Lactobacillaceae, e redução de microrganismos produtores de ácido butírico, o que pode favorecer o desenvolvimento da EN. Outra hipótese é a de que o desbalanço aminoacídico, especialmente de metionina e glicina, possam estimular o crescimento de *C. perfringens* (Drew et al., 2004).

A disponibilidade de minerais também pode atuar sobre a incidência de EN (Paiva & McElroy, 2014). Como visto anteriormente, a alfa-toxina tem seu efeito citotóxico em várias células, e para a hidrólise das membranas celulares é necessário a disponibilidade de cálcio e zinco (Titball et al., 1999). Bortoluzzi et al. (2019) adicionaram fontes de zinco às dietas de frangos de corte desafiados com *Eimeria maxima* e *C. perfringens*, e observaram que os animais que não receberam o aditivo apresentaram maior escore de lesão intestinal quando comparado aos animais que receberam as fontes de zinco.

A qualidade da matéria prima está diretamente ligada a absorção e digestão dos nutrientes. Decorrente do desenvolvimento fúngico no armazenamento de grãos estão as micotoxinas, metabólitos secundários produzidos por fungos que contaminam alimentos, principalmente os grãos (Antonissen et al., 2015). Mais de 400 micotoxinas foram identificadas, sendo as mais prevalentes: Aflatoxina, Fumonisina, Zearalenona, Tricotecenos e Ocratoxina. Estas toxinas são conhecidas por promover redução do desempenho de animais de produção, associados a supressão da imunidade (Hollander et al., 2020). A presença de micotoxinas leva a alteração na microbiota, podendo levar a ruptura da barreira intestinal, facilitando a entrada de microrganismos patogênicos (Guerre et al., 2020). Antonissen et al. (2014), mostraram que a micotoxina deoxinivalenol (DON) atua provocando danos à barreira epitelial e aumentando o aporte de nutrientes para o *C. perfringens*. Antonissen et al. (2015), mostraram que a Fuminisina atuou positivamente para a manifestação de enterite necrótica em frangos de corte. Desta maneira, a prevenção da presença de micotoxinas nos ingredientes, se torna um importante redutor de fatores predisponentes à enterite necrótica.

Além dos ingredientes, a forma física da dieta também influencia o desenvolvimento e a microbiota do TGI. Para aves é relatado que partículas maiores influenciam positivamente no desenvolvimento da moela, além de aumentar os

movimentos antiperistálticos, promovendo maior interação dos ingredientes com as enzimas, melhorando a digestibilidade dos nutrientes. Partículas menores passam mais rápido pelo TGI, tendo menor interação com as enzimas, promovendo maior presença de material não digerido no final do intestino, podendo facilitar a multiplicação de *C. perfringens* (Zaefarian et al., 2016).

2.2.3 Estresse

Além de fatores que alteram diretamente a microbiota e o ambiente intestinal, qualquer fator que provoque estresse pode predispor a EN (Timbermont et al., 2011). O estresse está ligado diretamente à redução da atividade imunológica, que facilita a proliferação bacteriana no epitélio intestinal (Calefi et al., 2014).

Infecções por patógenos que promovam imunossupressão como Doença infecciosa da Bursa, Doença de Marek, e Anemia Infecciosa são considerados importantes fatores predisponentes para a ocorrência de EN (Paiva & McElroy, 2014). A imunidade materna passada pela mãe é de extrema importância na prevenção de doenças, porém, próximo de três semanas de vida, essa imunidade é drasticamente reduzida, responsabilizando a ave por sua própria imunidade (Moore et al., 2016).

Práticas de manejo incluindo temperatura incorreta, alta densidade populacional, má qualidade de cama, alterações bruscas na dieta, e programas de vacinação inadequados predispoem a imunossupressão (McReynolds et al., 2004). Tsiouris et al. (2015) submeteram frangos de corte contaminados com *C. perfringens* a baixas temperaturas e encontraram aumento na quantidade de *C. perfringens* intestinal nos animais submetidos ao estresse pelo frio.

Diante da grande gama de fatores predisponentes à multiplicação de *C. perfringens*, e consequente manifestação de EN, a compreensão do mecanismo de ação de cada fator é essencial para que práticas de manejo nutricional, sanitário e de bem-estar, sejam desenvolvidas e garantam a prevenção da ocorrência da EN.

2.3 Patogênese da Enterite Necrótica

O *C. perfringens* é um habitante da microbiota nativa das aves. Em concentrações acima de 10^9 UFC de *C. perfringens* por g de digesta há o início da produção de fatores de virulência, que provocam danos ao hospedeiro e facilitam sua multiplicação (Mora et al., 2020)

A coccidiose é o principal fator correlacionado à EN, por provocar ruptura e liberação do conteúdo celular de enterócitos, além de estimular a produção de muco, fornecendo nutrientes para a multiplicação de *C. perfringens*. Com o aumento no aporte de nutrientes, o *C. perfringens* inicia a produção de enzimas colagenolíticas que degradam a mucina presente na mucosa intestinal e a utiliza como substrato para seu crescimento (Berchieri Júnior et al., 2009). Essa degradação promove exposição da matriz extracelular, que favorece a adesão do *C. perfringens* às células do hospedeiro, ao mesmo tempo, há a liberação de bacteriocinas que limitam o crescimento de outras cepas de *Clostridium*, aumentando a disponibilidade de nutrientes para a cepa patogênica (Back et al., 2019). Após a adesão do *C. perfringens*, é liberada a NetB, toxina formadora de poros, que leva à morte celular de enterócitos, e enzimas colagenolíticas que destroem a matriz extracelular, iniciando pela membrana basolateral dos enterócitos. Estes acontecimentos levam a necrose da mucosa intestinal e consequente redução do desempenho dos animais (Timbermont et al., 2011; Navarro et al., 2018; Adhikari et al., 2020; Mora et al., 2020).

Durante a multiplicação do microrganismo há a produção de CPE, toxina que forma poros e danifica as junções intercelulares dos enterócitos, aumentando a permeabilidade intestinal, que favorece a translocação bacteriana para a corrente sanguínea e consequente inflamação hepática (Navarro et al., 2018)

A forma clínica da doença é caracterizada por alta morbidade e mortalidade, apatia, penas eriçadas, desidratação, diarreia, e redução no consumo de alimento (Paiva & McElroy, 2014). Na necropsia, o intestino apresenta-se dilatado (balloon), repleto de gás, parede adelgada, e a mucosa com extensas áreas necróticas cobertas por exsudato esverdeado a amarronzado (Timbermont et al., 2011). Na histopatologia encontra-se necrose severa e difusa, presença de bacilos Gram-positivos na superfície do epitélio, além da presença de pseudomembrana com fragmentos teciduais, fibrina, e conglomerados bacterianos (Mora et al., 2020).

Já a forma subclínica não apresenta sinais clínicos específicos, sendo que as principais alterações são decorrentes das lesões intestinais mais brandas, reduzindo o consumo de ração e o ganho de peso, e piorando a conversão alimentar (Van Immerseel et al., 2008). Além disso, a passagem de bactérias para a corrente sanguínea pode afetar o fígado, aparecendo congesto com pontos esbranquiçados durante a inspeção no abatedouro (Paiva & McElroy, 2014). Por não haver sinais

clínicos ou elevada mortalidade, geralmente os animais não são tratados, o que leva à prejuízos econômicos em grande escala (Mora et al., 2020). Na necropsia, o intestino pode apresentar úlceras em formato de depressão, cobertas por material amorfo e incolor, e na histopatologia os achados são inflamatórios, com baixo nível necrótico (Timbermont et al., 2011).

3 ALTERNATIVAS NÃO ANTIBIÓTICAS

A manutenção da microbiota intestinal é um fator crucial para a saúde intestinal dos animais (Mora et al., 2020), e pode ser alterada por diversos fatores que desencadeiam respostas diferentes em cada caso. A administração de AMD na dieta de animais de produção têm como principal finalidade a modulação da microbiota e efeito anti-inflamatório de mucosa (Belote et al., 2018), o que reduz o gasto energético com inflamação, podendo o animal utilizar a energia para seu crescimento. Diante disso, a busca por alternativas que protejam a microbiota nativa, reduza o crescimento de patógenos e minimizem os efeitos dietéticos indesejados está sendo desenvolvida (Moore et al., 2016).

Na busca por alternativas não antibióticas, são necessárias medidas profiláticas que aumentem o bem-estar animal e reduzam o estresse dos animais. Além disso, a prevenção dos fatores predisponentes é necessária para evitar a multiplicação de *C. perfringens*.

Os aditivos zootécnicos são uma das alternativas mais pesquisadas por sua atuação no TGI, sendo que existem diversos compostos utilizados para melhora na saúde intestinal, citados a seguir:

3.1 Butirato de Sódio

Os ácidos graxos de cadeia curta são metabólitos produzidos através da fermentação bacteriana de carboidratos não digeridos (Zou et al., 2019). Os mais abundantes no trato gastrintestinal são o acético, o propiônico e o butírico (Bedford & Gong, 2018). Particularmente, o butirato têm um papel importante na saúde intestinal de humanos e animais, e vêm sendo utilizado na indústria avícola como potencial substituto aos AMD (Wu et al., 2018). Sua utilização é baseada na ação antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas, modulação de respostas

inflamatórias e imunológicas, e consequente melhora do desempenho produtivo dos animais (Zou et al., 2019). Em sua forma livre é volátil e de odor desagradável, o que dificulta sua utilização, entretanto em forma de sal, o butirato de sódio (BS) é utilizado como aditivo nas dietas (Lan et al., 2020), por não apresentar odor e ser de fácil manipulação.

Há muito tempo se conhece a atividade antimicrobiana do butirato (Nieman, 1954). Segundo Jerzsele et al. (2012), em forma livre o BS pode penetrar pela parede celular da bactéria e liberar H^+ , o que reduz o pH intracelular e resulta em problemas osmóticos e consequente morte do microrganismo. Namkung et al. (2011) em estudo in vitro demonstraram que o ácido butírico e seus derivados inibiram o crescimento de *Salmonella enteritidis* e *C. perfringens*. Já Timbermont et al. (2009) não encontraram a mesma resposta quando inocularam ácido butírico sobre *C. perfringens* in vitro, e mencionaram que o efeito do ácido butírico está principalmente sobre o hospedeiro. Além de atuar diretamente sobre o microrganismo, o ácido butírico atua reduzindo o pH do TGI, que segundo Jankowski et al. (2012) limita o crescimento de patógenos.

Além do efeito modulador da microbiota, o butirato está envolvido na manutenção da integridade intestinal e atua como anti-inflamatório (Zhou et al., 2014). Eshak et al. (2016) adicionaram butirato de sódio encapsulado à dieta de frangos de corte contaminados com *C. perfringens*, e encontraram redução no DNA fragmentado, que expressa a redução da necrose celular, quando comparado aos animais que não receberam butirato, indicando o efeito protetor da mucosa intestinal frente ao desafio. Song et al. (2017) encontraram que a adição de butirato de sódio à dieta de frangos de corte levou à expressão de peptídeos antimicrobianos, aumentando sua expressão em frangos de corte desafiados por um modelo experimental de enterite necrótica.

Liu et al. (2017) e Bortoluzzi et al. (2017), afirmam que além da concentração do butirato, o local do IG em que é liberado também influencia em sua atuação. Em estudo publicado por Liu et al. (2019), comparando a adição de dois produtos compostos por butirato de sódio, com liberação no trato gastrointestinal anterior e posterior, observaram que os animais desafiados por um modelo experimental de EN, e suplementados com o produto que atua na porção anterior do TGI apresentaram melhor desempenho, associado com o aumento da absorção dos nutrientes propiciada pela redução da inflamação intestinal no segmento anterior.

3.2 Prebióticos

Outra alternativa à utilização de AMD é o uso de prebióticos. A definição mais adequada e aceita de prebióticos é: ingredientes indigestíveis que são fermentados por bactérias benéficas no TGI promovendo seu crescimento, contribuindo para alterações na microbiota que favoreçam a saúde intestinal do hospedeiro (Roto et al., 2015).

A parede celular de levedura (PCL) é utilizada como prebiótico, e é composta principalmente por polissacarídeos (30-60%), glicofosfolipídeos (5-20%) e quitina (5%), sendo os componentes polissacarídeos representados por mananoproteínas e β -glucanos (Ahiwe et al., 2019). A utilização de PCL em dietas está associada à melhora na produtividade, modulação da microbiota intestinal e estimulação da resposta imunológica (Muthusamy et al., 2011).

De acordo com a fração da levedura utilizada, a atuação sobre a saúde intestinal varia. A utilização de MOS (mananoligossacarídeos) na dieta têm efeito prebiótico, ou seja, serve como fonte energética para fermentação de bactérias como *Lactobacillus* (Ahiwe et al., 2019) e evita a aderência de patógenos aos enterócitos por se ligar à parede celular dos microrganismos patogênicos (Roto et al., 2015). Os β -glucanos se ligam à receptores presentes nas vilosidades intestinais, competindo diretamente com patógenos por sítios de ligação ao hospedeiro (Roto et al., 2015), além de estarem associados à aumento na produção de anticorpos, fagócitos e células natural-killer. Xue et al. (2017) adicionaram PCL à dieta de frangos de corte desafiados por EN, e mostraram que o aditivo atuou positivamente sobre a produção de anticorpos e reduziu a resposta inflamatória aguda dos animais, confirmando sua ação moduladora da resposta inflamatória. Fowler et al. (2015) avaliaram o efeito de 6 produtos compostos por PCL, adicionados à dieta de frangos de corte submetidos a desafio por um modelo experimental de EN. A adição dos produtos melhorou o desempenho dos animais, chegando a um nível ótimo de inclusão na dieta de 250 a 300 ppm por kg

Além da parede celular, o conteúdo interno da levedura, composto por peptídeos, ácidos orgânicos, substâncias aromáticas e nucleotídeos podem ser aproveitados. Os nucleotídeos participam de diversas funções essenciais no organismo animal e possuem mecanismos específicos para sua produção, absorção e

incorporação nos tecidos (ChioFalo et al., 2011). Porém, durante períodos de rápido crescimento e de desafios imunológicos e sanitários, a síntese de nucleotídeos, realizada normalmente pela via de novo ou de salvamento (Leung et al., 2019), não é suficiente para manter as funções biológicas (Jung et al., 2011), principalmente de células de alto turnover celular como enterócitos e linfócitos (Alizadeh et al., 2016). Diante disso, diversos autores (Haldar et al., 2011; Alizadeh et al., 2016; Leung et al., 2019), têm estudado a adição de nucleotídeos provenientes de levedura hidrolisada à dieta de frangos de corte. Leung et al. (2019), por exemplo, observaram que a adição de levedura hidrolisada à dieta de frangos de corte desafiados com *Eimeria* spp., melhorou o desempenho dos animais, reduziu os danos à mucosa intestinal e modulou o microbioma cecal.

Ahiwe et al. (2019) avaliaram a adição de levedura hidrolisada ou AMD às dietas de frangos de corte submetidos a um desafio por *Eimeria* spp. e *C. perfringens*. Concluíram que a adição de levedura hidrolisada ou AMD melhorou a saúde intestinal e o desempenho produtivo, reduziu a contagem de *C. perfringens* e aumentou o número de *Lactobacillus* presentes no TGI dos animais, concluindo que a adição de levedura hidrolisada pode substituir total ou parcialmente a utilização de AMD.

3.3 Zinco

Para suprir a demanda metabólica e imunológica de animais que apresentam redução na digestibilidade dos nutrientes devido às lesões intestinais causadas por patógenos, são necessárias quantidades mais altas de nutrientes de maior disponibilidade (Bortoluzzi et al., 2019). Dentro destes, o zinco, um micromineral essencial, participa de três funções biológicas importantes: catálise, regulatória e estrutural (Hidayat et al., 2020). Além de auxiliar no desenvolvimento e regeneração intestinal após um desafio entérico (MacDonald, 2000), possui funções antioxidantes e imunomoduladoras, e sua deficiência pode levar à problemas de empenamento, desenvolvimento ósseo e redução do desempenho (Naz et al., 2015).

O sulfato de Zinco ($ZnSO_4$) é uma das fontes convencionais de suplementação de zinco nas dietas para animais monogástricos (She et al., 2017), porém, fontes orgânicas como o proteinato de zinco, reduzem a formação de complexos entre o

zinco e outros minerais, aumentando a biodisponibilidade deste mineral (Lebel et al., 2014).

Segundo Sun et al. (2020) a suplementação de zinco pode minimizar os efeitos da inflamação intestinal por atuar sobre as junções intercelulares, reduzindo a permeabilidade intestinal. O epitélio intestinal mantém sua barreira contra a entrada de microrganismos, por meio da ligação celular realizada através de desmossomos, junções adesivas e tight junctions (Groschwitz e Hogan, 2009), que são regulados pela expressão de genes como caderina, claudina, ocludina e proteínas moleculares da junção adesiva (Sun et al., 2020). Em experimento, Sun et al. (2020) adicionaram um complexo zinco-aminoácido à dieta de frangos de corte desafiados com *C. perfringens* e observaram que os animais que receberam a dieta com zinco orgânico apresentaram maior expressão gênica de ocludina no íleo, e consequente menor permeabilidade intestinal, em concordância com a hipótese de manutenção da integridade intestinal.

Bortoluzzi et al. (2019), ao adicionarem ZnSO₄ (sulfato de zinco) e proteinato de Zinco à dieta de frangos de corte desafiados com *Eimeria maxima* e *C. perfringens*, observaram que a fonte orgânica promoveu redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias, podendo ser considerado como redutor da resposta inflamatória.

Sabe-se que níveis adequados de minerais na dieta são necessários para a manutenção da saúde intestinal e da microbiota. Por ser um micromineral que está diretamente envolvido em diversas funções no organismo, a utilização de zinco em formas mais disponíveis para absorção é importante para a prevenção de doenças nos plantéis avícolas.

REFERÊNCIAS

- ABPA, 2020. Relatório anual 2020. Associação Brasileira de Proteína Animal. Disponível em: <https://cleandrodias.com.br/2020/wp-content/uploads/2020/05/Relatorio-ABPA-2020.pdf>
- Adhikari, P., Kiess, A., Adhikari, R., Jha, R., 2020. An approach to alternative strategies to control avian coccidiosis and necrotic enteritis. Journal of Applied Poultry Research. 29, 515–534. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2019.11.005>

- Ahiwe, E.U., Chang'a, E.P., Abdallh, M.E., Al-Qahtani, M., Kheravii, S.K., Wu, S., Graham H., Iji, P.A., 2019. Dietary hydrolysed yeast cell wall extract is comparable to antibiotics in the control of subclinical necrotic enteritis in broiler chickens. *British Poultry Science*, 60(6), 757-765. <https://doi.org/10.1080/00071668.2019.1664727>
- Alizadeh M., Rogiewicz A., McMillan E., Rodriguez-lecompte, J.C., Patterson, R., Slominski, B.A., 2016. Effect of yeast-derived products and distillers dried grains with solubles (DDGS) on growth performance and local innate immune response of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *Avian Pathology*. Vol. 45 (3), 334–345. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1155693>
- Ashida, H., Ogawa, M., Kim, M., Mimuro, H., Sasakawa, C. 2011. Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. *Nat Chem Biol*. 8, 36–45. <https://doi.org/10.1038/nchembio.741>
- Bedford, A., & Gong, J., 2018. Implications of butyrate and its derivatives for gut health and animal production. *Animal nutrition*. 4, 151-159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aninu.2017.08.010>
- Belote, B.L., Tujimoto-Silva, A., Hummelgen, P.H., Sanches, A.W.D., Wammes, J.C.S., Hayashi, R.M., and E. Santin., 2018. Histological parameters to evaluate intestinal health on broilers challenged with *Eimeria* and *Clostridium perfringens* with or without enramycin as growth promoter. *Poultry Science*. 97, 2287–2294 <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey064>
- Bortoluzzi, C., Lumpkins, B., Mathis, G.F., Franca, M., King, W.D., Graugnard, D.E., Dawson, K.A., Applegate, T.J., 2019. Zinc source modulates intestinal inflammation and intestinal integrity of broiler chickens challenged with coccidia and *Clostridium perfringens*. *Poultry Science*. 98, 2211–2219. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey587>
- Bortoluzzi, C., Pedroso, A.A., Mallo, J.J., Puyalto, M., Kim, W.K., Applegate, T.J., 2017. Sodium butyrate improved performance while modulating the cecal microbiota and regulating the expression of intestinal immune-related genes of broiler chickens. *Poultry Science*. 96, 3981–3993. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pex218>
- Bortoluzzi, C., Vieira, B.S., Lumpkins, B., Mathis, G.F., King, W.D., Graugnard, D., Dawson, K.A., Applegate, T.J., 2019. Can dietary zinc diminish the impact of necrotic enteritis on growth performance of broiler chickens by modulating the intestinal

immune-system and microbiota? Poultry Science 98, 3181–3193.
<http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez045>

Bozkurt, M., Ege, G., Aysul, N., Aksit, H., Tüzün, A.E., Küçükyılmaz, K., Borum, A.E., Uygun, M., Aksit, D., Aypak, S., Simsek, E., Seyrek, K., Kocer, B., Bintas, E., Orojpour, A., 2016. Effect of anticoccidial monensin with oregano essential oil on broilers experimentally challenged with mixed *Eimeria* spp. Poultry Science 95, 1858–1868. <https://doi.org/10.3382/ps/pew077>

Bruggisser, J., Tarek, B., Wyder, M., Muller, P., Von Ballmoos, C., Witz, G., Enzmann, G., Deutsch, U., Engelhardt, B., Posthaus, H., 2020. CD31 (PECAM-1) Serves as the Endothelial Cell-Specific Receptor of *Clostridium perfringens* bToxin. Cell Host & Microbe. 28, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.003>

Calefi, A.S., Honda, B.T.B., Costola-de-Souza, C., Siqueira, A., Namazu, L.B., Quinteiro-Filho, W.M., Juliana Garcia da Silva Fonseca, J.G., Aloia, T.P.A., Piantino-Ferreira, A.J., Palermo-Neto, J., 2014. Effects of long-term heat stress in an experimental model of avian necrotic enteritis. Poultry Science 93, 1344–1353. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03829>

Cao, J., Hu, Y., Liu, F., Wang, Y., Bi, Y., Lv, N., Li, J., Zhu, B., and Gao, G.F., 2020. Metagenomic analysis reveals the microbiome and resistome in migratory birds. Microbiome. 8,26. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0781-8>

CDC, 2019. Prevent Illness from *C. perfringens*. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED). <https://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/Clostridium-perfringens.html>

Chen, J., and McClane, B.A., 2015. Characterization of *Clostridium perfringens* TpeL toxin gene carriage, production, cytotoxic contributions, and trypsin sensitivity. Infect Immun. 83, 2369 –2381. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.03136-14>

Cheung, J.K., Keyburn, A.L., Carter, G.P., Lanckriet, A.L., Van Immerseel, F., Moore, R.J., Rood, J.I., 2010. The VirSR two-component signal transduction system regulates NetB toxin production in *Clostridium perfringens*. Infect. Immun. 78, 3064–3072. <https://doi.org/10.1128/iai.00123-10>

- Chikindas, M.L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V.A., Dicks, L.M., 2018. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr Opin Biotechnol* 49, 23-28. <http://doi:10.1016/j.copbio.2017.07.011>
- Chiofalo, B., Presti, L., Vittorio & Samoini, G.D., Enrico & Chiofalo, Vincenzo & Luigi, Liotta., 2018. Nucleotides in broiler chicken diet: effect on breast muscles quality. *Czech Journal of Food Sciences*. 29, 308-317. <https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/44982.pdf>
- Coursodon, C.F., Glock, R.D., Moore, K.L., Cooper, K.K., Songer, J.G., 2012. TpeL-producing strains of *Clostridium perfringens* type A are highly virulent for broiler chicks. *Anaerobe*. 18, 117-121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.10.001>
- Crisol-Martínez, E., Stanley, D., Geier, M.S., Hughes, R.J., Moore, R.J., 2017. Understanding the mechanisms of zinc bacitracin and avilamycin on animal production: linking gut microbiota and growth performance in chickens. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 101, 4547–4559. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-017-8193-9>
- Drew, M.D., Syed, N.A., Goldade, B.G., Laarveld, B., Van Kessel, A.G., 2004. Effects of dietary protein source and level on intestinal populations of *Clostridium perfringens* in broiler chickens. *Poultry Science*. 83 (3), 4-420. <https://doi.org/10.1093/ps/83.3.414>
- Duff, A.F., Vuong, C.N., Searer, K.L., Briggs, W.N., Wilson, K.M., Hargis, B.M., Berghman, L.R., Bielke, L.R., 2019. Preliminary studies on development of a novel subunit vaccine targeting *Clostridium perfringens* mucolytic enzymes for the control of necrotic enteritis in broilers. *Poult Sci*. 98 (12), 6319-6325. <https://doi.org/10.3382/ps/pez448>
- Eshak, M.G., Elmenawey, M.A., Atta, A., Gharib, H.B., Shalaby, B., Awaad, M.H.H., 2016. The efficacy of Na-butyrate encapsulated in palm fat on performance of broilers infected with necrotic enteritis with gene expression analysis. 9, 450-457. <http://www.veterinaryworld.org/Vol.9/May-2016/4.pdf>
- FAO, 2020. OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029, FAO, Rome/OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/1112c23b-en>.

- Fasina, Y.E., Newman, M.M., Stough, J.M., Liles, M.R., 2016. Effect of *Clostridium perfringens* infection and antibiotic administration on microbiota in the small intestine of broiler chickens. Poultry Science. 95, 247-260. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pev329>
- Fasina, Y.O., & Lillehoj, H.S., 2019. Characterization of intestinal immune response to *Clostridium perfringens* infection in broiler chickens. Poultry Science. 98, 188–198. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey390>
- Ficko-Blean, E., Boraston, A.B., 2009. N-acetylglucosamine recognition by a family 32 carbohydrate-binding module from *Clostridium perfringens* NagH. J Mol Biol. 390 (2), 208-220. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.04.066>
- Fowler, J., Kakani, R., Haq, A., Byrd, J.A., Bailey, C.A., 2015. Growth promoting effects of prebiotic yeast cell wall products in starter broilers under an immune stress and *Clostridium perfringens* challenge. Poultry Science Association. 24, 66-72. <http://dx.doi.org/10.3382/japr/pfv010>
- Freedman, J.C., Shrestha A., McClane B.A., 2016. *Clostridium perfringens* Enterotoxin: Action, Genetics, and Translational Applications. Toxins. 8, 73-89. <https://doi.org/10.3390/toxins8030073>
- Groschwitz, K.R., Hogan, S.P., 2009. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 124 (1), 3-20. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.038>
- Gu, C., Lillehoj, H.S., Sun, Z., Lee, Y., Zhao, H., Xianyu, Z., Yan, X., Wang, Y., Lin, S., Liu, L., Li, C., 2019. Characterization of Virulent netB+/tpeL+ *Clostridium perfringens* Strains from Necrotic Enteritis–Affected Broiler Chicken Farms. Avian Dis. 63, 461–467. <https://doi.org/10.1637/11973-092018-Reg.1>
- Halдар, S., Ghosha, T.K., Toshiwati., Bedford, M.R., 2011. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and yeast protein concentrate on production performance of broiler chickens exposed to heat stress and challenged with *Salmonella enteritidis*. Animal Feed Science and Technology. 168, 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.03.007>
- Hatakka, K., Saxelin, M., 2008. Probiotics in intestinal and non-intestinal infectious diseases – clinical evidence. Curr Pharm Design. 14, 1351–1367. <https://doi.org/10.2174/138161208784480162>

- Hidayat, C., Sumiati., Jayanegara, A., Wina, E., 2020. Effect of zinc on the immune response and production performance of broilers: a meta-analysis. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 33, 465-479. <https://doi.org/10.5713/ajas.19.0146>
- Jankowski, J., Juśkiewicz, J., Lichtorowicz, K., Zdunczyk, Z., 2012. Effects of the dietary level and source of sodium on growth performance, gastrointestinal digestion and meat characteristics in turkeys. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 178, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.09.012>
- Jerzsele, A., Szeker, K., Csizinszky, R., Gere, E., Jakab, C., Mallo, J.J., Galf P., 2012. Efficacy of protected sodium butyrate, a protected blend of essential oils, their combination, and *Bacillus amyloliquefaciens* spore suspension against artificially induced necrotic enteritis in broilers. *Poultry Science* 91 :837–843. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01853>
- Jung, B., 2011. Evaluation of dietary nucleotides for broilers. Tese de doutorado. The University of Georgia.
- Keyburn, A.L., Boyce, J.D., Vaz, P., Bannam, T.L., Ford, M.E., Parker, D., Di Rubbo, A., Rood, J.I., Moore, R.J., 2008. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathogens*. 4 (2), 26. <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.0040026>
- Keyburn, A.L., Sheedy, S.A., Ford, M.E., Williamson, M.M., Awad, M.M., Rood, J.I., Moore, R.J., 2006. Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infection and Immunity*. 74, 6496–6500. <https://iai.asm.org/content/74/11/6496/article-info>
- Lan, R., Zhao, Z., Li, S., 2020. Sodium butyrate as an effective feed additive to improve performance, liver function, and meat quality in broilers under hot climatic conditions. *Poultry Science*. 99, 5491–5500. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.06.042>
- Latorre, J.D., Adhikari, B., Park, S.H., Teague, K.D., Graham, L.E., Mahaffey, B.D., Baxter, M.F.A., Hernandez-Velasco, X., Kwon, Y.M., Ricke, S.C., Bielke, L.R., Hargis, B.M., Tellez, G., 2018. Evaluation of the Epithelial Barrier Function and Ileal Microbiome in an Established Necrotic Enteritis Challenge Model in Broiler Chickens. *Front. Vet. Sci.* 5, 199. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00199>

- Lebel, A., Matte, J., Guay, F., 2014. Effect of mineral source and mannan oligosaccharide supplements on zinc and copper digestibility in growing pigs. *Archives of Animal Nutrition*. 2014, 68, 370-384. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2014.954357>
- Lee, K.W., Lillehoj, H.S., Jeong, W., Jeoung, H.Y., An, J.J., 2011. Avian necrotic enteritis: experimental models, host immunity, pathogenesis, risk factors, and vaccine development. *Poultry Science*. 90, 1381–1390. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21673152/>
- Leung H., Patterson R., Barta JR., Karrow N, Kierie E., 2019. Nucleotide-rich yeast extract fed to broiler chickens challenged with *Eimeria*: impact on growth performance, jejunal histomorphology, immune system, and apparent retention of dietary components and caloric efficiency. *Poultry Science Association*. 0, 1–9. <https://doi.org/10.3382/ps/pez213>
- Liu, J.D., Bayir, H.O., Cosby, D.E., Cox, N.A., Williams, S.M., Fowler, J., 2017. Evaluation of encapsulated sodium butyrate on growth performance, energy digestibility, gut development, and *Salmonella* colonization in broilers. *Poultry Science*, 96 (10), 3638-3644. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pex174>
- Liu, J.D., Lumpkins, B., Mathis, G., Williams, S.M., Fowler, J., 2019. Evaluation of encapsulated sodium butyrate with varying releasing times on growth performance and necrotic enteritis mitigation in broilers. *Poultry Science Association Inc*. 0, 1–6. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez049>
- Llanco, L., & Nakano, V., Trigo, C., Piazza, R., Avila-Campos, M., 2017. Adhesion and invasion of *Clostridium perfringens* type A into epithelial cells. *Brazilian Journal of Microbiology*. 48, 764-768. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.06.002>
- Low, K.E., Smith, S.P., Abbott, D.W., Boraston, A.B., 2020. The glycoconjugate-degrading enzymes of *Clostridium perfringens*: Tailored catalysts for breaching the intestinal mucus barrier. *Glycobiology*. 1–10. <https://academic.oup.com/glycob/advancearticle/doi/10.1093/glycob/cwaa050/5848600>
- Macdonald, R.S., 2000. The role of zinc in growth and cell proliferation. *The Journal of nutrition*. 130, 1500–1508. <https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1500S>

- McDevitt, R.M., Brooker, J.D., Acamovic, T., Sparks, N.H.C., 2006. Necrotic enteritis; a continuing challenge for the poultry industry. *World's Poultry Science Journal*. 62, 221–247. <https://doi.org/10.1079/WPS200593>
- McReynolds, J. L., Byrd, J.A., Anderson, R.C., Moore, R.W., Edrington, T.S., Genovese, K.J., Poole, T.L., Kubena, L.F., Nisbet, D.J., 2004. Evaluation of immunosuppressants and dietary mechanisms in an experimental disease model for necrotic enteritis. *Poultry Science*. 83, 1948–1952. <https://doi.org/10.1093/ps/83.12.1948>
- Mehdi, Y., Letourneau-Montminy, M.-P., Gaucher, M.-L., Chorfi, Y., Suresh, G., Rouissi, T., Brar, S.K., Côte, C., Godbout S., 2018. Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Animal Nutrition*. 4, 170-178. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.03.002>.
- Moore, R. J., 2016. Necrotic enteritis predisposing factors in broiler chickens. *Avian Pathol*. 45, 275–281. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1150587>
- Mora, Z.V., Macías-Rodríguez, M.E., Arratia-Quijada, J., Gonzalez-Torres, Y.S., Nuño, K., Villarruel-López, A., 2020. *Clostridium perfringens* as Foodborne Pathogen in Broiler Production: Pathophysiology and Potential Strategies for Controlling Necrotic Enteritis. *Animals*. 10, 1718-1746. <https://doi.org/10.3390/ani10091718>
- M'Sadeq, S.A., Wu, S., Choct, M., Forder, R., Robert A.S., 2015. Use of yeast cell wall extract as a tool to reduce the impact of necrotic enteritis in broilers. *Poultry Science*. 94 (5), 898-905. <https://doi.org/10.3382/ps/pev035>
- Muthusamy, N., Haldar, S., Ghosh, T.K., Bedford, M.R., 2011. Effects of hydrolysed *Saccharomyces cerevisiae* yeast and yeast cell wall components on live performance, intestinal histo-morphology and humoral immune response of broiler. *British Poultry Science*, 52(6), 694-703. <https://doi.org/10.1080/00071668.2011.633072>
- Namkung, H., Yu, H., Gong J., Leeson, S., 2011. Antimicrobial activity of butyrate glycerides toward *Salmonella Typhimurium* and *Clostridium perfringens*. *Poultry Science* 90, 2217–2222. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01498>
- Navarro, M.A., McClane, B.A., Uzal, F.A., 2018. Mechanisms of action and cell death associated with *Clostridium perfringens* toxins. *Toxins*, 10 (5), 212-233. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins10050212>.

- Naz, S., Idris, M., Khalique, M.A., Zia-ur-rahman, Alhidary I.A., Abdelrahman M.M., Khan R.U., Chand N., Farooq U., Ahmad S., 2016. The activity and use of zinc in poultry diets. *World's Poultry Science Journal*. 72, 159-167. <https://doi.org/10.1017/S0043933915002755>
- Nunes R.V., Broch J., Wachholz, L., Souza, C., Damasceno, J.L., Oxford, J.H., Bloxham, D.J., Billard, L., Pesti, G.M., 2018. Choosing sample sizes for various blood parameters of broilers chickens with normal and non-normal observations. *Poultry Science*. 97, 3746-3754. <https://doi.org/10.3382/ps/pey217>
- Ohtani, K., Shimizu, T., 2014. Regulation of toxin gene expression in *Clostridium perfringens*. *Research in Microbiology*. 166, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.resmiC.2014.09.010>
- Orso, C., Stefanello, T.B., Franceschi, C.H., Mann, M.B., Varela, A.P.M., Castrol, M.S., Frazzon, J., Frazzon, A.P.G., Andretta, I., Ribeiro, A.M.L., 2021. Changes in the ceca microbiota of broilers vaccinated for coccidiosis or supplemented with salinomycin. *Poultry Science*. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.12.066>
- Paiva, D., McElroy, A., 2014. Necrotic enteritis: Applications for the poultry industry. *J. Appl. Poult. Res.* 23, 557–566. <https://doi.org/10.3382/japr.2013-00925>
- Parish, W. Necrotic enteritis in the fowl (*Gallus gallus domesticus*). I. Histopathology of the disease and isolation of a strain of *Clostridium welchii*. *J. Comp. Pathol.* 71, 405-413. [https://doi.org/10.1016/S0368-1742\(61\)80045-3](https://doi.org/10.1016/S0368-1742(61)80045-3)
- Petit, L., Gibert, M., Popoff, M.R., 1999. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends in Microbiology*. 7(3), 104-110. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(98\)01430-9](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(98)01430-9)
- Prescott, J.F., Parreira, V.R., Gohari, I.M., Lepp, D., Gong, J., 2016. The pathogenesis of necrotic enteritis in chicken: what we know and what we need to know: a review. *Avian Pathology*. 45, 288-294. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1139688>
- Razmyar, J., Peighambari, S.M., Zamani, A.H., 2017. Detection of a Newly Described Bacteriocin, Perfrin, Among *Clostridium perfringens* Isolates from Healthy and Diseased Ostriches and Broiler Chickens in Iran. *Avian Diseases*, 61(3), 387–390. <https://doi:10.1637/11580-010517-resnoter>

Rodrigues, W.O.P., Garcia, R.G., Nääs, I.A., Rosa, C.O., Caldarelli, C.E., 2014. Evolução da avicultura de corte no Brasil. Centro Científico Conhecer - Goiânia, 10 (18), 1666-1684.

<https://www.conhecer.org.br/enciclop/2014a/AGRARIAS/EVOLUCAO.pdf>

Roto, S.M., Rubinelli, P.M., Steven C., Ricke, S.C., 2015. An Introduction to the Avian Gut Microbiota and the Effects of Yeast-Based Prebiotic-Type Compounds as Potential Feed Additives. *Frontiers in veterinary Science*. 2, 28.

<https://doi.org/10.3389/fvets.2015.00028>

Schorch, B., Song, S., van Diemen, F.R., Bock, H.H., May, P., Herz, J., Brummelkamp, T.R., Papatheodorou, P., Aktories, K., 2014. Lrp1 is a receptor for *Clostridium perfringens* tpeL toxin indicating a two-receptor model of clostridial glycosylating toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 6431–6436.

<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1323790111>

She, Y., Huang, Q., Li, D., Piao, X., 2017. Effects of proteinate complex zinc on growth performance, hepatic and splenic trace elements concentrations, antioxidative function and immune functions in weaned piglets. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. 8, 1160-1167. <https://dx.doi.org/10.5713%2Fajas.16.0867>

Smith, J. A., and J. D. Helm. 2008. Report of the committee on transmissible diseases of poultry and other avian species. Accessed on February 2021.

<https://www.usaha.org/upload/Committee/TransDisPoultry/report-pad-2008.pdf>

Smith, J.A., 2019. Broiler production without antibiotics: United States field perspectives. *Animal Feed Science and Technology*. 250, 93-98.

<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.04.027>

Song, B., Lia, H., Wu, Y., Zhen W., Wang, Z., Xia, Z., Yuming, G., 2017. Effect of microencapsulated sodium butyrate dietary supplementation on growth performance and intestinal barrier function of broiler chickens infected with necrotic enteritis. *Animal Feed Science and Technology*. 232, 6–15.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.07.009>

Sun, J., Zhang, C.Y., Zhang, B., 2020. Research Note: Effects of organic zinc on broiler intestinal permeability and integrity in *Clostridium perfringens*–challenged condition. *Poultry Science*. 99, 6653–6656. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.032>

- Timbermont, L., De Smet, L., Van Nieuwerburgh, F., Parreira, V. R., Van Driessche, G., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Prescott, J., Deforce, D., Devreese, B., Van Immerseel, F., 2014. Perfrin, a novel bacteriocin associated with netB positive *Clostridium perfringens* strains from broilers with necrotic enteritis. Vet. Res. 45, 40. <http://www.veterinaryresearch.org/content/45/1/40>
- Timbermont, L., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Van Immerseel, F., 2011. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. Avian Pathology, 40 (4), 341-347. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.590967>
- Timbermont, L., Lanckriet, A., Dewulf, J., Nollet, N., Schwarzer, K., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Van Immerseel, F., 2009. Control of *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broilers by target-released butyric acid, fatty acids and essential oils. Avian Pathology. 39 (2) 117-121. <https://doi.org/10.1080/03079451003610586>
- Titball, R.W., Naylor, C.E., Basak, A.K., 1999. The *Clostridium perfringens* a-toxin. Anaerobe. 5, 51-64. <https://doi.org/10.1006/anae.1999.0191>
- Tsiouris, V., Georgopoulou, I., Batzios, C., Pappaioannou, N., Ducatelle, R., Fortomaris, P., 2015. The effect of cold stress on the pathogenesis of necrotic enteritis in broiler chicks. Avian Pathology. 44, 430–435. <https://doi.org/10.1080/03079457.2015.1083094>
- Van Immerseel, F., Rood, J.I., Moore, R.J. and Titball, R.W., 2009. Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in broilers. Trends in Microbiology. 17, 32–36. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.09.005>
- Wade, B., Keyburn, A., 2015. The true cost of necrotic enteritis. World Poult. 31,16–17. <https://www.poultryworld.net/Meat/Articles/2015/10/The-true-cost-of-necrotic-enteritis-2699819W/>
- Wade, B., Keyburn, A.L., Haring, V., Ford, M., Rood, J.I., Moore, R.J., 2016. The adherent abilities of *Clostridium perfringens* strains are critical for the pathogenesis of avian necrotic enteritis. Vet Microbiol. 197, 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.vetmiC.2016.10.028>
- Wade, B., Keyburn, A.L., Haring, V., Ford, M., Rood, J.I., Moore, R.J., 2020. Two putative zinc metalloproteases contribute to the virulence of *Clostridium perfringens*

strains that cause avian necrotic enteritis. *J Vet Diagn Invest.* 32 (2), 259-267.
<https://doi.org/10.1177/1040638719898689>

Williams, R.B., 2005. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian Pathology*, 34, 159-180. <http://dx.doi.org/10.1080/03079450500112195>

Wu, W., Xiao, Z., An, W., Dong, Y., Zhang, B., 2018. Dietary sodium butyrate improves intestinal development and function by modulating the microbial community in broilers. *PLOS one.* 13 (5). <https://doi.org/10.1371/journal>

Xue, G., Wu, S., Choct, M., Swick, R.A., 2017. Effects of yeast cell wall on growth performance, immune responses, and intestinal short chain fatty acid concentrations of broilers in an experimental necrotic enteritis model. 3, 399-405.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aninu.2017.08.002>

Zahoor, I., Ghayas, A., Basheer, B., 2018. Genetics and genomics of susceptibility and immune response to necrotic enteritis in chicken: a review. *Molecular biology reports.* 45, 31-37. <https://doi.org/10.1007/s11033-017-4138-8>

Zaragoza, N.E., Orellana, C.A., Moonen, G.A., Moutafis, G., Marcellin, E., 2019. Vaccine Production to Protect Animals Against Pathogenic Clostridia. *Toxins.* 11, 525.
<http://dx.doi.org/10.3390/toxins11090525>

Zhou, Z.Y., Packialakshmi, B., Makkar, S.K., Dridi, S., Rathb, N.C., 2014. Effect of butyrate on immune response of a chicken macrophage cell line. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 162, 24–32.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.09.002>

Zou, X., Ji, J., Qu, H., Wang, J., Shu, D.M., Wang, Y., Liu, T.F., Li, Y., Luo, C.L., 2019. Effects of sodium butyrate on intestinal health and gut microbiota composition during intestinal inflammation progression in broilers. *Poultry Science* 98, 4449–4456.
<http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez279>

CAPÍTULO 2: ALTERNATIVE TO ANTIMICROBIAL GROWTH PROMOTERS IN BROILERS DIETS, CHALLENGED WITH *Eimeria* spp. AND *Clostridium perfringens*

SILVA, PAOLA¹.; ROHLOFF, NILTON.²; NUNES, V, RICARDO². COSTA, B.
LEANDRO¹

¹Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Escola Ciências da Vida, Curitiba, PR.

¹Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Marechal Cândido Rondon, PR.

E-mail para correspondência: batista.leandro@pucpr.br

ABSTRACT

Necrotic enteritis (NE) is a disease of worldwide distribution, which affects young birds and causes economic losses on the scale of 6 billion dollars per year. For decades, NE was controlled in poultry flocks by dietary use of underdoses of antimicrobials growth promoters, but an increase in NE incidence was noted after the ban of antibiotic growth promoters. The prohibition or reduction of antimicrobial growth promoters (AGP) increased interest on research for non-antibiotic alternatives. Therefore, the objective of the present study is to evaluate the addition of sodium butyrate, hydrolyzed yeast and zinc proteinate to broiler diets challenged by *Eimeria* spp. and *C. perfringens*, on performance, blood parameters, permeability, morphology and intestinal lesions, and carcass yield. A total of 1,150 one-day-old male broiler chickens (Cobb 500, Cobb Vantress Ltd., Cascavel, PR, BR) with an initial average weight of 43.97 ± 0.65 g were allocated to 50 experimental pens. All animals were challenged by *Eimeria* spp. at 7 days of age, and by *C. perfringens* at 17, 18 and 19 days, for induction of subclinical NE. The animals were divided into 5 treatments: Negative control (NC) - Control diet, without AGP; Positive control (PC) - Control diet with addition of 0.12 g ton^{-1} of Enramycin (8%); (500) - NC, with addition of 500 g ton^{-1} of ViligenTM; (1,000) - NC, with addition of $1,000 \text{ g ton}^{-1}$ of ViligenTM; (1,500) - NC, with

addition of 1500 g ton⁻¹ of Viligen™. The birds fed with the product showed similar performance, blood parameters, intestinal permeability and carcass yield compared to PC. The addition of 1,500 g ton⁻¹ of Viligen™ reduced intestinal lesions at 28 days, and at 21 days the level of 500 g ton⁻¹ of Viligen™ improved the intestinal morphology (P<0.05). Thus, it is concluded that the dietary addition of Viligen™ to broilers challenged by an experimental model of subclinical EN presented similar performance to that obtained by the addition of Enramycin, in addition, it can benefit to intestinal health, and can be considered as an alternative in reducing effects of subclinical NE in broilers.

Keywords: broilers; necrotic enteritis; non-antibiotics-alternatives, performance.

1. INTRODUCTION

The dietary addition of antimicrobial growth promoters (AGP) was a practice used for a long period in animal production, aiming to modulate the microbiota and improve the productive performance (Hashim et al., 2017). However, with the antimicrobial resistance and the possible presence of residues in meat, the European Union banned these products as additives to animal diets in 2006 (Tian et al., 2016), and countries like Brazil, a major exporter of broiler meat, are gradually banning theirs. Nonetheless, this have contributed to increase in the prevalence of enteric diseases in broilers, such as Necrotic Enteritis (NE) (Van Immerseel et al., 2009).

NE is a multifactorial gastroenteritis, with *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) being considered the major etiologic agent (Fasina et al., 2016). *C. perfringens* is a gram-positive, spore-forming, anaerobic bacillus (Adhikari et al., 2019), a constituent of soil and native microbiota of birds (Fasina & Lillchoj, 2018). It presents pathogenicity in a favorable environment for its growth, requiring the presence of a predisposing factor, especially the injuries caused by *Eimeria* spp. (Moore, 2016). The clinical form of the disease is characterized by intestinal lesions, high morbidity and mortality of birds, whereas the subclinical form is the most common, in which there is reduced performance, increased diarrhea and apathy (Timbermont et al., 2011). The estimated global cost of NE is between 2 to 6 billions of

dollars annually, and when analyzing the subclinical form, the economic impact can be even higher (Wade and Keyburn, 2015).

In order to replace AGP, the industry has been developing alternatives such as vaccines and nutraceuticals, but even after years of research, NE remains one of the greatest challenges for the poultry industry (Emami et al., 2019). Among the alternatives, we can highlight butyrate, a short-chain fatty acid produced through microbial fermentation. In addition to acting positively on the immune response (Zhou et al., 2014), it has the capacity to supply carbons as an energy source for enterocytes (Liu et al., 2019) and control of the pathogenic microbial population (Timbermont et al., 2009). The addition of microencapsulated sodium butyrate to the diet of broilers contaminated with *Eimeria* spp. and *C. perfringens* increased weight gain and feed conversion when compared to the control group (Song et al., 2017).

Another alternative is yeast cell wall (YCW), that has been added to animal diets in order to improve productive performance and modulate immunological response and the intestinal microbiome (Ahiwe et al. 2019). YCW consists of polysaccharides not digestible by monogastric animals, making it difficult to release the intracellular content of yeast, which is rich in peptides, B vitamins, minerals and mainly nucleotides (Berto et al., 2020). During periods of fast growth and immunological and health challenges, nucleotide synthesis, normally carried out via de novo or rescue route (Leung et al., 2019) is insufficient to maintain biological functions (Jung et al., 2011), mainly from high turnover cells such as enterocytes and lymphocytes (Alizadeh et al., 2016). Several authors (Haldar et al., 2011; Alizadeh et al., 2016; Leung et al., 2019) have studied the addition of nucleotides from hydrolyzed yeast to the diet of broilers. Leung et al. (2019), for example, observed that the addition of hydrolyzed yeast to the diet of broilers challenged with *Eimeria* spp. improved performance, reduced the damage to the intestinal mucosa and modulated the cecal microbiome.

It is well known that zinc is an essential trace element (Yan et al., 2016), related to antioxidant and immunomodulatory functions (Naz et al., 2015), and intestinal development and regeneration after an enteric challenge (MacDonald, 2000). Organic sources of this mineral, such as zinc proteinate, reduce the formation of complexes between zinc and other minerals, increasing bioavailability (Lebel et al., 2014). Bortoluzzi et al. (2019) added ZnSO₄ and Zinc proteinate to the diet of broilers

challenged with *Eimeria* maxima and *C. perfringens* and observed that the organic source reduced the expression of pro-inflammatory cytokines and the inflammatory response.

However, to date, there are no articles in the literature studying the association between sodium butyrate, hydrolyzed yeast and zinc proteinate in the diet of broilers. The hypothesis of the present study is that the association of such compounds improves the intestinal health of animals, reducing the negative effects of subclinical necrotic enteritis. Objectifying to evaluate the addition of a product composed by sodium butyrate, hydrolyzed yeast and zinc proteinate (Viligen™) to the broiler diet challenged with *Eimeria* spp. and *C. perfringens* on performance, carcass yield, blood parameters, intestinal permeability, score of intestinal lesions and intestinal morphology.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Experimental broiler and design

The study was conducted at the Poultry Research Center of Western Paraná State University – Unioeste (Marechal Cândido Rondon, PR, Brazil). All procedures including the use of broilers, management, and care were in accordance with the National Council for Control and Animal Experimentation and approval by the Animal Use Ethics Committee of the university (34/2019).

A total of 1,150 one-day-old male broilers (Cobb 500, Cobb Vantress Ltd., Cascavel, PR, BR), with an initial average weight of 43.97 ± 0.65 g were allocated to 50 experimental pens (1.76 m²) containing new pine shavings as litter. The broilers were assigned to 5 treatments with 10 pens per treatment (repetitions) and 23 broilers per pen in a completely randomized design. Experimental birds were fed ad libitum with the dietary treatments from 1 to 42 days of age, as follows:

Negative control (NC) – Control diet, without antimicrobial growth promoter; Positive control (PC) – Control diet, added 0.12g ton⁻¹ of Enramicyn (8%); 500 – NC, added 500 g ton⁻¹ of Viligen™; 1,000 – NC, added 1,000 g ton⁻¹ of Viligen™; 1,500 – NC, added 1,500 g ton⁻¹ of Viligen™. All diets were formulated based on corn and soybean meal (isoproteic and isocaloric diets), according to feed composition and nutritional requirements proposed by Rostagno et al. (2017). They were divided into

pre-initial (1 to 10 days), initial (11 to 21 days), growth (22 to 33 days) and final (34 to 42 days old) phases shown in Table 1. Salinomycin (12%) was added to all treatments and removed in the final stage.

Viligen™ is composed of sodium butyrate, dehydrated hydrolyzed yeast and zinc proteinate provided by Alltech Inc. and was added to the formula to replace inert on weight basis.

Table 1. Ingredient and chemical composition of experimental diets (g Kg⁻¹).

Ingredients	Pre initial	Initial	Growth	Final
Corn (7,88%)	546.20	569.1	645.5	688.3
Soybean meal (46%)	356.9	316.5	235.3	195.1
Meat and bone meal	30.0	40.0	30.0	-
Poultry offal meal	30.0	40.0	30.0	25.0
Feather meal	0	0	15.0	40.0
Degummed soybean oil	11.32	16.06	20.89	25.50
Salt	4.5	4.1	4.1	4.3
Dicalcium phosphate	6.8	4.7	2.4	6.9
Calcitic limestone	2.9	2.8	2.5	4.6
DL-methionine (98%)	3.3	3.1	2.7	2.0
L-lysine (54%)	2.6	2.7	4.4	4.8
L-threonine (99%)	0.5	0.5	0.6	0.2
L-valine (98%)	0.01	0.0004	0.236	-
Vitamin Supplement ¹	1.3	1.3	1.0	1.0
Mineral Supplement ²	0.5	0.5	0.5	0.5
Choline Chloride (60%)	0.5	0.5	0.5	-
Antioxidant ³	0.1	0.1	0.1	0.1
Salinomycin (12%) ⁴	0.5	0.5	0.3	-
Inert ⁵ and or AMD or product	1.6	1.6	1.6	1.6
Total	100.0	100.0	100.0	100.0
Chemical composition				
Metabolizable energy (kcal kg ⁻¹)	2975	3050	3150	3200
Crude protein	242.0	235.0	206.0	190.0
Calcium	9.7	8.8	7.6	6.3
Total phosphorus	7.1	6.6	5.9	4.9
Available phosphorus	4.6	4.2	3.7	2.9
Na	2.2	2.2	2.1	2.0
K	8.6	8.0	6.7	5.9
Lysine digestible	13.1	12.5	11.2	10.1

Methionine digestible	7.2	7.1	6.2	4.8
Met. + cystine digestible	9.7	9.3	8.3	7.5
Isoleucine digestible	9.1	8.7	7.4	7.0
Valine digestible	10.1	9.7	10.7	8.3
Threonine digestible	8.6	8.3	7.4	6.7
Tryptophan digestible	2.6	2.4	2.0	1.8

¹Vitamin supplement. composition per kg of diet: Vitamin A (min) 14.3 I.U.; Vitamin D₃ (min) 5.2 I.U.; Vitamin E (min) 71.5 I.U.; Vitamin K₃ (min) 3,9 mg; Vitamin B1 (min) 2,3 mg; Vitamin B2 (min) 9.1 mg; Pantothenic acid (min) 0.01 g; Vitamin B6 (min) 5.2 mg; Vitamin B12 (min) 32.5 mcg; Nicotinic Acid (min) 0.08 g; Folic acid (min) 2,6 mg; Biotin (min) 0,3 mg; Selenium (min) 0,4 mg.

²Mineral supplement. composition per kg of diet: Iron (min) 0.05 g; Copper (min) 0.01 g; Manganese (min) 0.06 g; Zinc (min) 0.06 g; Iodine (min) 1 mg.

³BHT.

⁴Anticoccidian.

⁵Washed sand or Viligen™ or Enramycin-based performance enhancer (8%) added in pre-initial, initial and growth phases of positive control (PC) treatment.

2.2 Challenge of the experimental animals

To challenge the animals with *Eimeria* oocysts, samples of litter were collected and the OPG test was performed in order to search for oocysts of *Eimeria* spp. based on the methodology described by Benedet et al. (2019). A hundred and fifty oocysts were found per gram of sample collected. The litter was placed in buckets with supersaturated water with sodium chloride so that the oocysts could float, then the supernatant was collected. On day 7, the water supply by nipple drinkers of all birds was suspended for 6 hours and replaced by infant drinkers containing the supernatant, following the methodology described by Santiani et al. (2012). At 17, 18 and 19 days of age, all birds received via esophagus to the crop by a pasteur pipette, 0,5 mL of a broth containing *Clostridium perfringens* strains individually at an dilution of 10⁸ CFU mL⁻¹ according to Bortoluzzi et al. (2019).

2.3 Growth performance and blood analysis

The broilers and feed weight were recorded on 1, 10, 21, 33 and 42 days and the feed intake (FI), weight gain (WG), and feed conversion ratio (FCR) were calculated. Mortality was recorded daily for FI and FCR corrections, according to Sakomura and Rostagno (2016).

For blood metabolites evaluation, two broilers were randomly selected per pen (n=50) on day 21, and 2 broilers per pen on day 40, and then submitted to fasting for 6

hours with blood collection by ulnar vein puncture, using vacuum tubes without anticoagulant. The blood samples remained at rest for 15 min for coagulation and centrifuged at 1050 g for 10 min (Kasvi K14–4000. Kasvi. São José dos Pinhais. PR. BR) at room temperature to obtain the serum. The time between sampling and freezing was approximately 30 min and then samples were stored at –20 °C for 30 d before analysis (Nunes et al., 2018). Serum concentrations of cholesterol (CHOL), triglycerides (TG), glucose (GLU), total proteins (TP), albumin (ALB), creatinine (CRE), uric acid (UA), alanine aminotransferase (ALT), gamma-glutamyltransferase (GGT), aspartate aminotransferase (AST) and urea (URE) analysis were performed using commercial kits (Elitech, Clinical Systems, Elitech Group, Paris, FR) in spectrophotometer with automatic calibration and high-performance analyzer (Flexor EL200; ELITech Latin America, Brazil).

2.4 Gut permeability

In order to evaluate the intestinal permeability, at day 21, one broiler per pen (n=50) selected at random received by a pasteur pipette, 0,5 mL of Fluorescein Isothiocyanate Dextran - FITC-d (100 mg, MW 4,000; Sigma-Aldrich, Canada) (2.2 mg bird⁻¹), via esophagus to the crop. FITC-d is a large molecule which under normal conditions is not able to cross the epithelial barrier, however during intestinal inflammation the tight junctions are disrupted, allowing the FITC-d to enter circulation, so the higher the gut permeability, the higher is the blood level of FITC-d. Two hours after the oral gavage, blood was collected through the ulnar vein to determine the FITC-d concentration per mL of serum and plasma, addapted from Bortoluzzi et al. (2019).

2.5 Intestinal macroscopic lesions

On day 28, two broiler per pen (n=100) were randomly selected, sacrificed, weighed, and examined for the presence of macroscopic findings compatible with necrotic enteritis (Mucoid material on jejunum, Peyer plates, Petechiae, suffusion, friable intestine, necrosis points, balloon intestine, Twisted Towel, and undigested feed).

The methodology used was adapted from Mesa et al. (2014), where in a degree of severity (DS) was assigned between 0 and 3, were grade 0 is unchanged, grade 1

mild change, grade 2 moderate alteration, and grade 3 severe alteration. The degrees of severity were added, and the average between the two birds per pen was calculated resulting in the average score (MS).

2.6 Intestinal morphometry, carcass cut yield and gastrointestinal tract liver weight

At day 21 and 42, one broiler from 5 pens per treatment (n=25), selected at random, was individually weighed, euthanized, and sacrificed accordingly to Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA Normative Resolution no. 37 of February 15, 2018, with subsequent plucking and evisceration. A section of the jejunum was collected at the midpoint between the bile duct entry and Meckel's diverticulum. Tissue was fixed in 10% buffered formalin routinely processed and after embedded in alcohol 70%. All samples were dehydrated, infiltrated and embedded in paraffin following common histological routine, and stained with hematoxylin and eosin adapted by Belote et al., (2018). For intestinal morphology two slides per animal and 5 intact intestinal villi and crypt per slide were observed to determine villus height, crypt depth, and villus-to-crypt ratio.

For carcass yield, at day 42, two broiler s per pen (n=100) were weighed and euthanized. The weight of the eviscerated carcass (without head, neck, feet, and abdominal fat) was calculated in relation to broiler live weight. For the yields of breast, leg and wing cuts, the weight of eviscerated carcass was considered. The percentage of abdominal fat (fat deposited around the gizzard, abdomen, and cloacal bursa) was related to broiler live weight. The relative weight of liver was determined by related to the weight of the liver (without gallbladder) to the live weight.

2.7 Statistical Analysis

Data were subjected to homogeneity (Levene) and normality tests (Shapiro-Wilk), and to analysis of variance was performed using General Linear Models. Dunnett's test was performed in order to compare the treatments PC vs NC, 500, 1,000, 1,500 g ton⁻¹, in which PC treatment was considered as control. Afterwards, regression analysis was performed using the NC treatments (0); 500; 1,000 and 1,500.

For the statistical analysis of intestinal injuries, the degrees of severity of the variables mentioned in item 2.5 were added, and the average between the two birds

per pen was calculated. Thus, for statistical analysis, the mean score among these birds was considered. Comparisons of medians were performed using the Wilcoxon test. All statistical procedures were performed using a 5% probability ($P < 0.05$). The statistical analysis was performed with SPSS version 25.

3. RESULTS

Animals from the negative control treatment (NC) showed higher feed conversion (FCR) when compared to positive control treatment (CP), in the periods 1 to 33 days (1.42 vs 1.39) ($P = 0.048$) and 1 to 42 days (1.51 vs 1.49) ($P < 0.001$). The other performance variables showed no significant difference ($P > 0.05$) between treatments during the experimental period, showed in Table 2.

Table 2. Effect of dietary treatments on growth performance of broilers challenged with *Eimeria* spp. and *C. perfringens*

Item	Treatments ¹					SEM ⁵	<i>P-value</i>		
	NC	PC	500	1,000	1,500		ANOVA	Linear	Quadratic
1-10 days									
FI ² g	258	259	258	261	263	2.43	0.977	0.088	0.271
BWG ³ , g	211	214	213	215	214	1.86	0.990	0.174	0.323
FCR ⁴	1.22	1.21	1.21	1.22	1.23	0.01	0.311	0.425	0.506
1-21 days									
FI, g	1,205	1,188	1,201	1,199	1,192	5.28	0.854	0.130	0.154
BWG, g	911	910	918	923	911	3.66	0.759	0.885	0.322
FCR	1.32	1.31	1.31	1.29	1.31	0.01	0.294	0.264	0.181
1-33 days									
FI, g	3,119	3,059	3,079	3,084	3,076	10.98	0.536	0.194	0.372
BWG, g	2,190	2,199	2,195	2,197	2,197	8.04	0.997	0.080	0.238
FCR	1.42*	1.39	1.40	1.40	1.40	0.01	0.048	0.140	0.340
1-42 days									
FI, g	4,734	4,701	4,750	4,733	4,721	17.17	0.922	0.392	0.406
BWG, g	3,128	3,164	3,187	3,181	3,168	11.89	0.558	0.452	0.277
FCR	1.51*	1.49	1.49	1.49	1.49	0.01	<0.001	0.220	0.149

¹NC – Control diet, without antimicrobials; PC – Control diet, added 0.12g ton⁻¹ of Enramycin (8%); 500 - NC, added 500 g ton⁻¹ of ViligenTM; 1,000 - NC, added 1,000 g ton⁻¹ of ViligenTM; 1,500 - NC, added 1,500 g ton⁻¹ of ViligenTM.

²FI = Feed intake.

³BWG = Body weight gain.

⁴FCR = Feed conversion ratio.

⁵SEM = Standard error of the mean.

* Differs from the antimicrobial treatment by Dunnett's test ($P < 0.05$)

Analyzing the results of blood parameters at 21 days, no significant difference between the treatments was observed ($P > 0.05$). A significant linear positive effect was observed for ALT ($P = 0.020$) and AST ($P = 0.040$), as a function of Viligen™ doses (Table 3).

Table 3 Effect of dietary treatments on blood parameters of broilers challenged with *Eimeria* spp. and *Clostridium perfringens* at 21 days of age

	Treatments ¹						P-value		
	NC	PC	500	1,000	1,500	SEM ¹¹	ANOVA	Linear	Quadratic
UA ² (mg DL ⁻¹)	6.61	7.21	5.79	8.28	8.22	0.35	0.137	0.233	0.617
Alt ^{3,12} (IU L ⁻¹)	5.84	6.06	6.09	6.90	7.28	0.26	0.391	0.020	0.193
Albumin (g L ⁻¹)	16.15	16.33	15.24	16.63	16.89	0.23	0.209	0.361	0.612
Ast ^{4,13} (IU L ⁻¹)	177.47	189.13	178.76	189.23	193.25	7.23	0.943	0.040	0.260
Cho ⁵ (mg DL ⁻¹)	115.59	116.70	105.63	119.11	113.75	2.30	0.407	0.820	0.956
Crea ⁶ (mg DL ⁻¹)	0.20	0.20	0.19	0.20	0.19	0.01	0.919	0.753	0.904
Ggt ⁷ (IU L ⁻¹)	10.89	10.68	10.74	9.24	9.07	0.36	0.341	0.068	0.362
Glu ⁸ (mg DL ⁻¹)	266.61	258.73	246.82	259.72	266.62	3.49	0.371	0.821	0.535
TP ⁹ (g L ⁻¹)	26.80	26.89	24.98	26.96	26.36	0.43	0.553	0.906	0.915
Trig ¹⁰ (mg DL ⁻¹)	63.96	58.69	47.25	69.20	62.09	3.55	0.379	0.776	0.929
Urea (mg DL ⁻¹)	4.14	3.24	3.75	4.72	3.99	0.20	0.216	0.844	0.959

¹NC – Control diet, without growth promoter antimicrobials; PC – Control diet, added 0.12g ton⁻¹ of Enramycin (8%); 500 - NC, added 500 g ton⁻¹ of Viligen™; 1,000 - NC, added 1,000 g ton⁻¹ of Viligen™; 1,500 - NC, added 1,500 g ton⁻¹ of Viligen™.

²Uric Acid. ³Alanine Amino transferase. ⁴Aspartate Amino Transferase. ⁵Cholesterol. ⁶Creatinine. ⁷Gama GT. ⁸Glucose.

⁹Total protein. ¹⁰Triglycerides.

¹¹SEM = Standard error of the mean.

¹²Linear effect ($p < 0.05$) of the treatments on the ALT ($y = 1.0251x + 5.7578$ $R^2 = 0.9595$)

¹³Linear effect ($p < 0.05$) of the treatments on the AST ($y = 11.562x + 176$ $R^2 = 0.9224$)

At 42 days of age, no significant difference between the treatments was observed ($P > 0.05$) to blood parameters. A significant quadratic effect was observed for the variables GGT ($P = 0.011$) with minimum point (12.9 IU L⁻¹) observed at the estimated

Viligen™ level of 375 g ton⁻¹, and Urea (P = 0.011) whose maximum point (3,92 mg DL⁻¹) was observed at the estimated Viligen™ level of 375 g ton⁻¹ (Table 4).

Table 4 Effect of dietary treatments on blood parameters of broilers challenged with *Eimeria* spp. and *Clostridium perfringens* at 42 days of age

Item	Treatments ¹						P-value		
	NC	PC	500	1,000	1,500	SEM ¹¹	ANOVA	Linear	Quadratic
UA ² (mg DL ⁻¹)	3.53	3.64	3.40	3.16	3.23	0.79	0.137	0.122	0.335
Alt ³ (IU L ⁻¹)	11.69	9.81	9.62	10.11	9.92	0.43	0.648	0.330	0.454
Albumin (g L ⁻¹)	16.75	16.42	16.13	16.81	16.44	0.21	0.839	0.901	0.969
Ast ⁴ (IU L ⁻¹)	498.23	463.65	458.97	499.51	442.86	15.63	0.723	0.430	0.803
Cho ⁵ (mg DL ⁻¹)	123.72	119.71	123.47	127.34	125.90	2.28	0.863	0.271	0.659
Crea ⁶ (mg DL ⁻¹)	0.13	0.13	0.13	0.13	0.12	0.01	0.936	0.721	0.200
Ggt ^{7,12} (IU L ⁻¹)	13.08	13.68	12.92	13.39	14.45	0.54	0.910	0.142	0.011
Glu ⁸ (mg DL ⁻¹)	254.19	260.64	264.36	250.52	260.83	2.42	0.375	0.875	0.992
TP ⁹ (g L ⁻¹)	29.41	29.48	29.51	30.25	29.39	0.35	0.932	0.786	0.705
Trig ¹⁰ (mg DL ⁻¹)	74.37	70.51	70.09	60.96	64.43	2.93	0.617	0.154	0.379
Urea ¹³ (mg DL ⁻¹)	3.86	3.32	3.91	3.75	3.37	0.16	0.669	0.141	0.011

¹NC – Control diet, without growth promoter antimicrobials; PC – Control diet, added 0.12g ton⁻¹ of Enramycin (8%); 500 - NC, added 500 g ton⁻¹ of Viligen™; 1,000 - NC, added 1,000 g ton⁻¹ of Viligen™; 1,500 - NC, added 1,500 g ton⁻¹ of Viligen™.

²Uric Acid. ³Alanine Amino transferase. ⁴Aspartate Amino Transferase. ⁵Cholesterol. ⁶Creatinine. ⁷Gama GT. ⁸Glucose. ⁹Total protein. ¹⁰Triglycerides.

¹¹SEM = Standard error of the mean.

¹²Quadratic effect (P < 0.05) of the treatments on the GGT ($y=1.223x^2 - 0.9187x + 13.079$ R² = 0.9999)

¹³Quadratic effect (P < 0.05) of the treatments on the UREA ($y=-0.4341x^2 + 0.3252x + 3.8579$ R² = 0.9999).

It was observed that the animals that received the NC treatments and 500 g ton⁻¹ of Viligen™ presented a higher score of intestinal injuries, when compared to the animals that received 1,500 g ton⁻¹ of Viligen™ (Table 5).

Table 5 Effect of dietary treatments on mean final score of intestinal lesions of broilers challenged with *Eimeria* spp. and *C. perfringens* at 28 days of age

Treatments ¹				
NC	PC	500	1,000	1,500

Mean Score ²	4.75 (4.0-6.5) ^a	4.00 (3.5-5.5) ^{ab}	5.00 (2.0-6.5) ^a	4.50 (2.0-6.0) ^{ab}	4.00 (2.5-5.0) ^b
----------------------------	--------------------------------	---------------------------------	--------------------------------	---------------------------------	--------------------------------

¹NC – Control diet, without growth promoter antimicrobials; PC – Control diet, added 0.12g ton⁻¹ of Enramicyn (8%); 500 - NC, added 500 g ton⁻¹ of ViligenTM; 1,000 - NC, added 1,000 g ton⁻¹ of ViligenTM; 1,500 - NC, added 1,500 g ton⁻¹ of ViligenTM.

² Median of mean score.

^{a,b} Different letters in a line are significantly different (p<0.05) by the Wilcoxon test.

There was no significant difference (P > 0.05) between treatments for serum and plasma concentrations of FITC-d at 21 days. At 21 days, treatment 500 increased height of villus and villus:crypt ratio when compared to positive control (Table 6).

Table 6 Effect of dietary treatments on concentration of FITC-d on plasma and serum and intestinal morphometry evaluations in jejunum of broilers challenged with *Eimeria* spp. and *C. perfringens* at 21 and 42 days of age

	Treatments ¹					SEM ⁴	P-value		
	NC	PC	500	1,000	1,500		ANOVA	Linear	Quad
ConC. of FITC-d									
² Plasma (ng mL ⁻¹)	207	225	191	177	244	0.01	0.469	0.560	0.349
³ Serum (ng mL ⁻¹)	229	242	244	199	208	0.01	0.632	0.317	0.725
Morphometry									
21 days									
Villus (µm)	762	780	1,067*	887	806	19.40	<0.001	0.953	0.560
Crypt (µm)	238	228	229	219	259	5.97	0.271	0.606	0.374
Villus:crypt (µm:µm)	3.5	3.5	4.9*	4.2	3.4	0.12	<0.001	0.841	0.372
42 days									
Villus	1,240	1,169	1,034	1,232	1,209	27.07	0.109	0.860	0.827
Crypt	192	223	201	186	230	5.62	0.054	0.352	0.548
Villus:crypt	7.0	5.7	5.7	6.5	5.7	0.19	0.121	0.399	0.763

¹NC – Control diet, without growth promoter antibiotics; PC – Control diet, added 0.12g ton⁻¹ of Enramicyn (8%); 0.5 - NC, added 500 g ton⁻¹ of ViligenTM; 1.0 - NC, added 1000 g ton⁻¹ of ViligenTM; 1.5 - NC, added 1500 g ton⁻¹ of ViligenTM.

²Concentration of FITC-d on Plasma.

³Concentration of FITC-d on Serum.

⁴SEM = Standard error of the mean;

* Differs from the antimicrobial treatment by Dunnett's test (P < 0.05).

There was no significant difference between the treatments on carcass characteristics of s slaughtered at 42 days ($P > 0.05$) (Table 7).

Table 7 Effect of dietary treatments on carcass characteristics of broilers challenged with *Eimeria* spp and *C. perfringens* at 42 day of age

Item (%)	Treatments ¹						<i>p</i> -value		
	NC	PC	500	1,000	1,500	SEM ⁴	ANOVA	Linear	Quadratic
HCY ²	69.87	69.71	69.64	70.47	69.22	0.13	0.061	0.722	0.779
CCY ³	70.80	70.72	70.69	71.40	70.43	0.14	0.278	0.875	0.792
Breast	28.66	29.43	29.00	29.11	29.05	0.11	0.324	0.177	0.129
Thighs	31.77	31.86	31.74	31.63	32.11	0.09	0.552	0.436	0.421
Wing	10.32	10.34	10.39	10.07	10.18	0.05	0.310	0.345	0.753
Sassami	6.22	6.41	6.29	6.16	6.19	0.04	0.418	0.537	0.866
Liver	1.86	1.80	1.86	1.84	1.83	0.02	0.865	0.104	0.336
Fat	1.59	1.41	1.36	1.34	1.46	0.03	0.110	0.528	0.076

¹NC – Control diet, without growth promoter antimicrobials; PC – Control diet, added 0.12g ton⁻¹ of Enramycin (8%); 500 - NC, added 500 g ton⁻¹ of ViligenTM; 1,000 - NC, added 1,000 g ton⁻¹ of ViligenTM; 1,500 - NC, added 1,500 g ton⁻¹ of ViligenTM.

²HCY= Hot Carcass Yield.

³CCY = Cold Carcass Yield.

⁴SEM = Standard error of the mean.

4. DISCUSSION

In the present study, it was observed that animals that received dietary antimicrobial treatment (PC) showed better feed conversion compared to animals that did not receive any additives (NC). In this way, the best feed conversion presented by the animals that received AGP can be attributed to the reduction of pathogens and consequent intestinal inflammation, allowing the best use of the nutrients from the diet and the reduction of energy expenditure with inflammation, and the use of energy from dietary nutrients for animal growth.

The blood parameters evaluated in the present study were not influenced by the treatments, demonstrating that the product has no toxicity. The effect of NE on blood parameters of broilers is still poorly studied and it varies according to the severity of the disease, but in the present experiment, the variables are within normal limits. At 21 days of age, there was a positive linear response of the enzymes ALT and AST

according to Viligen™ concentration. Such enzymes are used to determine recent liver or muscle injuries when in association with other parameters such as GGT and CK, but individually they are not widely used to assess normal organ activity (Traesel et al., 2009). GGT activity was not altered by different levels of Viligen™, reducing the possibility of liver alteration at 21 days. At 42 days, a significant quadratic effect was observed for the variables GGT ($P = 0.011$) and Urea ($P = 0.011$), but the values are into the normal parameters.

The evaluation of intestinal lesions is generally used to define the severity of the experimental model of NE (Cooper and Songer, 2009). The infection model proposed by the present study is compatible with the lesions caused by subclinical necrotic enteritis described by Paiva & McElroy (2014) and Timbermont et al. (2011). The analysis of the lesions showed that the NC and 500 g ton⁻¹ of Viligen™ had a higher score of intestinal injury when compared to the treatment with the addition of 1500 g ton⁻¹ of Viligen™. Bortoluzzi et al. (2019) by adding an organic (proteinate) and inorganic (sulfate) source of Zinc to the diet of broilers contaminated with *Eimeria maxima* and *C. perfringens* showed that Zinc supplementation showed antiinflammatory effect, related to the proliferation of crypt cells, which increases cell turnover, maintaining the intestinal barrier structure and function (Hu et al., 2013; Mocchegiani et al., 2013). Studies have shown that dietary supplementation with products from yeast reduces the presence of intestinal lesions compatible with NE (Tian et al., 2016; Ahiwe et al., 2019; Liu et al., 2019). YCW compounds bind to the cell wall of pathogenic microorganisms and to the host epithelium, reducing the ability of pathogenic microorganisms to adhere (Liu et al., 2017), in addition to stimulating the release of macrophages, monocytes and cytokines to improve host immune response (Tian et al., 2016). In the present study, the dietary addition of 1500 g ton⁻¹ of Viligen™ reduced intestinal lesions compatible with subclinical necrotic enteritis, resulting in a similar result to the addition of AGP in the diet, which can be considered as a potential substitute for AGP in subclinical infections due to NE in broilers.

In this trial, FITC-d values in plasma and serum were not influenced by the dietary treatments. NE is well known by increased intestinal permeability (Latorre et al., 2018) by the production of enzymes and toxins by *C. perfringens*. Among the toxins produced, *C. perfringens* enterotoxin (CPE) binds to receptors present in

proteins that form *tight junctions*, called claudins (Benz & Popoff, 2018), forming a pore in the plasma membrane, inducing cell apoptosis. At higher doses of CPE, the formation of several pores in the membrane occurs, which leads to a massive process of cell necrosis called oncosis (Freedman et al., 2016). This process leads to an increase in intestinal permeability, which can result in the passage of microorganisms and toxins into the bloodstream (Emami et al., 2019), and can be measured through the administration of FITC-d, a compound with high molecular weight (3-5 kDa) that in normal conditions does not cross the epithelial barrier. However, during intestinal inflammation, it can be found in the bloodstream (Baxter et al., 2017). In the present experiment, the administration of performance-enhancing antibiotic (Enramycin 8%) or different doses of ViligenTM did not reduce the passage of FITC-d into the bloodstream, showing that these compounds did not interfere with the protection of the intestinal barrier.

At 21 days, the birds from treatment 500 increased height of villus and villus: crypt ratio when compared to the positive control treatment, similar to study of Sikandar et al. (2017) that added sodium butyrate to broiler diets and found better morphology of lymphoid organs and gut mucosa in broiler. Butyrate is considered an important energy source for enterocytes, which can increase cell mitosis in the crypt, villus height and consequent villus: crypt relationship (Ahsan et al., 2016) and in association with hydrolyzed yeast and zinc properties in the 500 treatment showed a better gut morphology.

In the present study, dietary treatments did not show significant difference for the carcass yield variables and these results agree with Pascual et al. (2020).

5. CONCLUSION

The addition of different levels of ViligenTM (500, 1000 and 1500 g ton⁻¹) to the diet of broilers submitted to an experimental challenge with *Eimeria* spp. and *C. perfringens* resulted in productive performance similar to animals that received AGP in the diet and there was reduction in the intestinal lesion score and improvement in the intestinal morphology of the birds.

With these results, ViligenTM can be an alternative to replace Enramycin used as AGP in broiler diets, and can be used in the dosage of 1500 g ton⁻¹ with positive

effects on the intestinal health of broilers subjected to an experimental challenge of subclinical necrotic enteritis.

6. REFERENCES

- Adhikari, P., Kiess, A., Adhikari, R., Jha, R., 2020. An approach to alternative strategies to control avian coccidiosis and necrotic enteritis. *Journal of Applied Poultry Research*. 29, 515–534. <https://doi.org/10.1016/j.iapr.2019.11.005>
- Ahiwe, E.U., Chang'a, E.P., Abdallh, M.E., Al-Qahtani, M., Kheravii, S.K., Wu, S., Graham H., Iji, P.A., 2019. Dietary hydrolysed yeast cell wall extract is comparable to antibiotics in the control of subclinical necrotic enteritis in broiler s. *British Poultry Science*, 60(6), 757-765. <https://doi.org/10.1080/00071668.2019.1664727>
- Ahsan, U.C., Özcan, R., Ifrah, K., Eren, C., Muhammad F.A.I., Zafar, U., Sajid, C.S., 2016. Sodium butyrate in chicken nutrition: the dynamics of performance, gut microbiota, gut morphology, and immunity. *World's Poultry Science Journal*. 72. 265-275. <https://doi.org/10.1017/S0043933916000210>
- Alizadeh M., Rogiewicz A., McMillan E., Rodriguez-lecompte, J.C., Patterson, R., Slominski, B.A., 2016. Effect of yeast-derived products and distillers dried grains with solubles (DDGS) on growth performance and local innate immune response of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *Avian Pathology*. Vol. 45 (3), 334–345. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1155693>
- Baxter, M.F.A., Merino-Guzman, R., Latorre, J.D., Mahaffey, B.D., Yang, Y., Teague, K.D., Graham, L.E., Wolfenden, A.D., Hernandez-Velasco, X., Bielke, L.R., Hargis, B.M., Tellez, G., Optimizing Fluorescein Isothiocyanate Dextran Measurement As a Biomarker in a 24-h Feed Restriction Model to Induce Gut Permeability in Broiler Chickens. *Frontiers in veterinary science*. 4 (56), 6. <http://www.frontiersin.org/Journal/10.3389/fvets.2017.00056/abstract>
- Belote, B.L., Tujimoto-Silva, A., Hummelgen, P.H., Sanches, A.W.D., Wammes, J.C.S., Hayashi, R.M., and E. Santin., 2018. Histological parameters to evaluate intestinal health on broilers challenged with *Eimeria* and *Clostridium perfringens* with or without enramycin as growth promoter. *Poultry Science*. 97, 2287–2294 <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey064>

Benedet, J.P., 2019. Avaliação de tratamentos de camas de frangos contra *Clostridium perfringens*, enterobactérias e oocistos de *Eimeria* spp. em aviários dark house e convencional de frango de corte. Dissertação de mestrado – IFC. Concórdia. 47.

Benz R., & Popoff M.R., 2018. *Clostridium perfringens* enterotoxin: the toxin forms highly cation-selective channels in lipid bilayers. *Toxins*. 10, 341-354. <https://doi.org/10.3390/toxins10090341>

Berto, P.N., Tse, L.P.M., Ramos, R.A.D., Saleh, A.D.M., Miassi, G.M., Yamatogi, R.S., Berto, D.A., Neto, M.A.T., 2019. Necrotic Enteritis in Broiler Chickens: The Role of Tight Junctions and Mucosal Immune Responses in Alleviating the Effect of the Disease. *Microorganisms*. 7 (8), 231. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080231>

Bortoluzzi, C., Lumpkins, B., Mathis, G.F., Franca, M., King, W.D., Graugnard, D.E., Dawson, K.A., Applegate, T.J., 2019. Zinc source modulates intestinal inflammation and intestinal integrity of broiler chickens challenged with coccidia and *Clostridium perfringens*. *Poultry Science*. 98, 2211–2219. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey587>

Bortoluzzi, C., Pedroso, A.A., Mallo, J.J., Puyalto, M., Kim, W.K., Applegate, T.J., 2017. Sodium butyrate improved performance while modulating the cecal microbiota and regulating the expression of intestinal immune-related genes of broiler chickens. *Poultry Science*. 96, 3981–3993. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pex218>

Cooper, K.K., & Songer, J.G., 2009. Necrotic enteritis in chickens: a paradigm of enteric infection by *Clostridium perfringens* type A. *Anaerobe*. 5(1-2), 55-60. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.01.006>

Emami N.K., Calik A., White M.B., Young M., Dalloul R.A., 2019. Necrotic enteritis in broiler chickens: the role of tight junctions and mucosal immune responses in alleviating the effect of the disease. *Microorganisms*. 7 (8), 231. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080231>

Eshak, M.G., Elmenawey, M.A., Atta, A., Gharib, H.B., Shalaby, B., Awaad, M.H.H., 2016. The efficacy of Na-butyrate encapsulated in palm fat on performance of broilers infected with necrotic enteritis with gene expression analysis. 9, 450-457. <http://www.veterinaryworld.org/Vol.9/May-2016/4.pdf>

- Fasina, Y.E., Newman, M.M., Stough, J.M., Liles, M.R., 2016. Effect of *Clostridium perfringens* infection and antibiotic administration on microbiota in the small intestine of broiler chickens. Poultry Science. 95, 247-260. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pev329>
- Fasina, Y.O., & Lillehoj, H.S., 2019. Characterization of intestinal immune response to *Clostridium perfringens* infection in broiler chickens. Poultry Science. 98, 188–198. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey390>
- Freedman, J.C., Shrestha A., McClane B.A., 2016. *Clostridium perfringens* Enterotoxin: Action, Genetics, and Translational Applications. Toxins. 8, 73-89. <https://doi.org/10.3390/toxins8030073>
- Halдар, S., Ghosha, T.K., Toshiwati., Bedford, M.R., 2011. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and yeast protein concentrate on production performance of broiler chickens exposed to heat stress and challenged with *Salmonella enteritidis*. Animal Feed Science and Technology. 168, 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.03.007>
- Hashim, O.H., Jayapalan, J.J., Lee, C.S., 2017. Lectins: an effective tool for screening of potential cancer biomarkers. Peer J. 5, 3084. <https://peerj.com/articles/3784/>
- Hu, H., Hu, J., Li, J., Pang, W., Hu, Y., Yang, H., Li, W., Huang, C., Zhang, M., Jiang, Y., 2013. Optimal dose of zinc supplementation for preventing aluminum-induced neurotoxicity in rats. Neural regeneration research, 8(29), 2754–2762. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2013.29.007>
- Jung, B., 2011. Evaluation of dietary nucleotides for broilers. Tese de doutorado. The University of Georgia.
- Latorre, J.D., Adhikari, B., Park, S.H., Teague, K.D., Graham, L.E., Mahaffey, B.D., Baxter, M.F.A., Hernandez-Velasco, X., Kwon, Y.M., Ricke, S.C., Bielke, L.R., Hargis, B.M., Tellez, G., 2018. Evaluation of the Epithelial Barrier Function and Ileal Microbiome in an Established Necrotic Enteritis Challenge Model in Broiler Chickens. Front. Vet. Sci. 5, 199. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00199>
- Lebel, A., Matte, J., Guay, F., 2014. Effect of mineral source and mannan oligosaccharide supplements on zinc and copper digestibility in growing pigs. Archives of Animal Nutrition. 2014, 68, 370-384. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2014.954357>

- Leung H., Patterson R., Barta JR., Karrow N, Kierie E., 2019. Nucleotide-rich yeast extract fed to broiler chickens challenged with *Eimeria*: impact on growth performance, jejunal histomorphology, immune system, and apparent retention of dietary components and caloric efficiency. Poultry Science Association. 0, 1–9. <https://doi.org/10.3382/ps/pez213>
- Liu, J.D., Bayir, H.O., Cosby, D.E., Cox, N.A., Williams, S.M., Fowler, J., 2017. Evaluation of encapsulated sodium butyrate on growth performance, energy digestibility, gut development, and Salmonella colonization in broilers. Poultry Science, 96 (10), 3638-3644. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pex174>
- Liu, J.D., Lumpkins, B., Mathis, G., Williams, S.M., Fowler, J., 2019. Evaluation of encapsulated sodium butyrate with varying releasing times on growth performance and necrotic enteritis mitigation in broilers. Poultry Science Association Inc. 0, 1–6. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez049>
- Macdonald, R.S., 2000. The role of zinc in growth and cell proliferation. The Journal of nutrition. 130, 1500–1508. <https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1500S>
- Mesa, D., Lourenço, M.C., Westphal, P., Kraieski, A., Santin, E., 2014. Modelo de protocolo experimental para induzir, classificar e avaliar as enterites inespecíficas em frangos de corte. Pesquisa Veterinária Brasileira. 10, 929-936. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014001000001>
- Mocchegiani, E., Romeo, J., Malavolta, M., Costarelli, L., Giacconi, R., Diaz, L.E., Marcos, A., 2013. Zinc: dietary intake and impact of supplementation on immune function in elderly. Age (Dordr). 35(3), 839-860. <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9377-3>
- Moore, R. J., 2016. Necrotic enteritis predisposing factors in broiler chickens. Avian Pathol. 45, 275–281. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1150587>
- Muthusamy, N., Haldar, S., Ghosh, T.K., Bedford, M.R., 2011. Effects of hydrolysed *Saccharomyces cerevisiae* yeast and yeast cell wall components on live performance, intestinal histo-morphology and humoral immune response of broiler. British Poultry Science, 52(6), 694-703. <https://doi.org/10.1080/00071668.2011.633072>
- Naz, S., Idris, M., Khalique, M.A., Zia-ur-rahman, Alhidary I.A., Abdelrahman M.M., Khan R.U., Chand N., Farooq U., Ahmad S., 2016. The activity and use of zinc in

poultry diets. World's Poultry Science Journal. 72, 159-167.
<https://doi.org/10.1017/S0043933915002755>

Paiva, D., McElroy, A., 2014. Necrotic enteritis: Applications for the poultry industry. J. Appl. Poult. Res. 23, 557–566. <https://doi.org/10.3382/japr.2013-00925>

Pascual, A., Pauletto, M., Giantin, M., Radaelli, G., Ballarin, C., Birolo, M., Zomeño, C., Dacasto, M., Bortoletti, M., Vascellari, M., Xiccato, G., Trocino, A., 2020. Effect of dietary supplementation with yeast cell wall extracts on performance and gut response in broiler chickens. Journal of Animal Science and Biotechnology. 11, 40.
<https://doi.org/10.1186/s40104-020-00448-z>

Santiani, F., Gomes, D.J., Piva, M.M., Carneiro, D.C.S., Mingotti, T.R., Prior, K.C., Weber, C.L., Silva, T.M., 2015. Comparativo de prevalência de *Eimeria* spp. em cama fermentada e não fermentada de frangos de corte e lesões encontradas no intestino das aves, na região do meio oeste catarinense. Revista Brasileira de ciência avícola. 21, 201-208.
https://eventos.fabricadesoftware.ifc.edu.br/media/upload/submissao/2017/09/06/comparativo_de_prevalencia_de_eimeria_spp_ts.pdf

Sikandar, A., Zaneb, H., Younus, M., Masood, S., Aslam, A., Khattak, F., Ashraf, S., Yousaf, M.S., Rehman, H., 2017. Effect of sodium butyrate on performance, immune status, microarchitecture of small intestinal mucosa and lymphoid organs in broiler chickens. Asian-Australas J Anim Sci. 30 (5), 690-699.
<https://doi.org/10.5713/ajas.16.0824>

Song, B., Lia, H., Wu, Y., Zhen W., Wang, Z., Xia, Z., Yuming, G., 2017. Effect of microencapsulated sodium butyrate dietary supplementation on growth performance and intestinal barrier function of broiler chickens infected with necrotic enteritis. Animal Feed Science and Technology. 232, 6–15.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.07.009>

Tian, X., Shao, Y., Wang, Z., Guo, Y., 2016. Effects of dietary yeast β -glucans supplementation on growth performance, gut morphology, intestinal *Clostridium perfringens* population and immune response of broiler chickens challenged with necrotic enteritis. Anim. Feed Sci. Technol., 215, 144-155.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.03.009>

Timbermont, L., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Van Immerseel, F., 2011. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. *Avian Pathology*, 40 (4), 341-347. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.590967>

Timbermont, L., Lanckriet, A., Dewulf, J., Nollet, N., Schwarzer, K., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Van Immerseel, F., 2009. Control of *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broilers by target-released butyric acid, fatty acids and essential oils. *Avian Pathology*. 39 (2) 117-121. <https://doi.org/10.1080/03079451003610586>

Traesel, C.K., 2009. Perfil bioquímico sérico de frangos de corte alimentados com dieta suplementada com óleos essenciais e pimenta. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Santa Maria. 55p.

Van Immerseel, F., Rood, J.I., Moore, R.J. and Titball, R.W., 2009. Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in broilers. *Trends in Microbiology*. 17, 32–36. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.09.005>

Wade, B., Keyburn, A.L., Haring, V., Ford, M., Rood, J.I., Moore, R.J., 2016. The adherent abilities of *Clostridium perfringens* strains are critical for the pathogenesis of avian necrotic enteritis. *Vet Microbiol*. 197, 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.vetmiC.2016.10.028>

Zhou, Z.Y., Packialakshmi, B., Makkar, S.K., Dridi, S., Rathb, N.C., 2014. Effect of butyrate on immune response of a chicken macrophage cell line. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 162, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.09.002>

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS, IMPACTO E PERSPECTIVAS

Diante do aumento na demanda de proteína animal para a próxima década, aliado às demandas de mercados cada vez mais exigentes, o desenvolvimento de alternativas não antibióticas que reduzam as perdas por patologias e mantenham ou aprimorem o desempenho produtivo dos animais são necessárias.

Diversos compostos apresentam características desejáveis para a melhora da saúde intestinal e consequente melhora nos parâmetros de desempenho, porém testes com aditivos isolados ainda não refletem no desenvolvimento de um produto que possa atuar em substituição aos AMD frente a um desafio subclínico de enterite

necrótica. Desta maneira, a associação de compostos é considerada promissora na busca por uma solução para esta enfermidade na produção de frangos.

No presente estudo, a adição de butirato de sódio, levedura hidrolisada e proteinato de zinco às dietas de frangos de corte desafiados com *Eimeria* spp. e *C. perfringens* apresentou desempenho similar ao obtido pela adição de Enramicina (8%), reduziu o score de lesão intestinal, e melhorou a morfologia intestinal dos animais, podendo ser considerado como alternativa aos AMD frente a um desafio subclínico de enterite necrótica. Dentre as dosagens do produto estudadas, a maior (1500 g ton⁻¹), mostrou-se mais eficiente, garantindo melhor saúde intestinal.

ANEXO (S)



Certificado Experimental no Uso de Animais em Pesquisa Nº 22/20 - CEUA

Certificamos que a proposta intitulada **“Butirato de zinco e propionato de sódio em rações para frangos de corte de 1 a 42 dias de idade”**, registrada com o número **“34-19”**, sob a responsabilidade de **“Ricardo Vianna Nunes”**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ (UNIOESTE), em reunião de 14/05/2020.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	20/agosto/2019 a 01/fevereiro/2020
Espécie/linhagem/raça	Ave: (<i>Gallus gallus domesticus</i>) Cobb
Nº de animais	1150
Peso/Idade	45g – 1 dia
Sexo	Masculino
Origem	Os animais serão adquiridos em incubatório comercial ou loja agropecuária da região

Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 3126/2018-GRE