

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

KAROLINA KENNEDY SILVA COSTA

**EFICIÊNCIA DE CEPAS PROBIÓTICAS *IN OVO* NO CONTROLE DE *Salmonella*
HEIDELBERG EM PINTINHOS DE UM DIA DE IDADE**

UBERLÂNDIA

2023

KAROLINA KENNEDY SILVA COSTA

**EFICIÊNCIA DE CEPAS PROBIÓTICAS *IN OVO* NO CONTROLE DE *Salmonella*
HEIDELBERG EM PINTINHOS DE UM DIA DE IDADE.**

Trabalho de Conclusão de Curso à Faculdade de
Medicina Veterinária da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do
título de bacharel em Medicina Veterinária

Orientador: Prof. Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca

UBERLÂNDIA

2023

KAROLINA KENNEDY SILVA COSTA

**EFICIÊNCIA DE CEPAS PROBIÓTICAS *IN OVO* NO CONTROLE DE *Salmonella*
HEIDELBERG EM PINTINHOS DE UM DIA DE IDADE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

Uberlândia, 01 de dezembro de 2023

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Belchiorina Beatriz Fonseca
Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Dr. Bruno Serpa Vieira
Universidade Federal de Uberlândia

MV. MSc. Simone Sommerfeld
Técnica Administrativa da Universidade Federal de Uberlândia

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo
estímulo, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, que me acompanhou durante toda a minha trajetória, por estar presente mesmo em dias que nada parecia dar certo e em momentos obscuros nos quais pensava em desistir, sempre me lembrando que tudo é possível naquele que me fortalece.

Não há palavras para agradecer meus pais, que sempre colocaram minha educação em primeiro lugar e abdicaram de seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu. Eu nada seria se não fossem vocês, Inalda e Kennedy. Não posso deixar de agradecer ao meu irmão Kennedy F., que sempre esteve ao meu lado, me motivando a seguir meus sonhos, sem desistir ou abaixar a cabeça para as dificuldades da vida. Tenho muito orgulho da pessoa que você é e me espelho muito em você, maninho.

Agradeço aos meus padrinhos, Mário Ênio e Izabel, que desde pequena me incentivaram a ter contato com os animais, me mostrando como o amor deles é puro e simples, onde descobri a minha verdadeira paixão. Agradeço à madrinha Santusa, que também sempre me motivou a continuar nessa caminhada e que ama os animais na mesma intensidade que a minha, obrigada pelo colo, pelas palavras confortantes e por acreditar em mim, não seria nada sem seu suporte.

Agradeço também à minha orientadora, Bia, que sempre esteve presente e me inspira como pessoa e como profissional, sempre acolhe seus alunos como filhos; a Universidade é um lugar melhor com a sua presença e seus ensinamentos. Agradeço ao LADOC, em especial a Simone e Paulinha, que me auxiliaram neste trabalho, riram comigo e compartilharam os surtos na elaboração. Obrigada pelo apoio, vocês são incríveis.

Agradeço às amigas que fiz ao longo dessa jornada, Any Carolina, Ana Caroline, Lorrayne, Maria Clara, Nicolli, Gabi Acerbi e Taynara, a vida é melhor e mais divertida com vocês, obrigada por todo apoio e todas as conversas.

Deixo um pequeno agradecimento as cevalinhas, Camila e Luana, colegas de trabalho que se tornaram grandes amigas. Obrigada por cada risada ao lado de vocês nesse pequeno tempo que nos conhecemos, o trabalho é bem melhor e mais divertido com as fofocas e risadas. Amo vocês

Agradeço ao meu namorado, Vitor F., que sempre me apoiou, que é lar em todos os momentos, que se faz presente mesmo com a distância que estamos, você faz toda diferença na minha vida, deixa tudo mais calmo e me faz enxergar a vida com outros olhos, te amo, obrigada por tanto.

Deixo aqui o meu muito obrigada à instituição da qual fiz parte por quase toda a minha jornada na graduação, querido D.A.C.A.W. Eu nada seria sem os amigos que fiz, a segunda família que conquistei dentro da nossa salinha, pelo ser humano e profissional que me tornei por causa de vocês. Agradeço às minhas Presidentes, Andressa e Lize, que me ensinaram a luta pelas causas que acredito. Agradeço ao Lucas Gayer, Carlos, Maria, Aline, Maressa, Cecília, Ully, Gadu, Arthur, Amanda, Vitória e Ailton pelas risadas mais sinceras que tive ao lado de vocês, por terem me inspirado, me incentivado a continuar nessa loucura que é a graduação e por terem sonhado esse sonho comigo, pois um sonho que se sonha só é só um sonho, mas um sonho que se sonha junto é realidade e nada disso seria realidade sem a presença de vocês. Amo cada um de vocês. Obrigada.

“There's always gonna be another mountain
I'm always gonna want to make it move
Always gonna be an uphill battle
Sometimes I'm going to have to lose
Ain't about how fast I get there
Ain't about what's waiting on the other side
It's the climb.”

(The Climb, Miley Cyrus)

RESUMO

O Brasil é o maior exportador mundial de carne de frango, o que significa que as granjas avícolas precisam ser cuidadosas nos programas de biossegurança para evitar o surgimento de patógenos que possam causar danos nos plantéis e ao produto final. O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de duas cepas probióticas aplicadas e sua ação sobre a inibição da *S. Heidelberg* no pintinho de 1 dia. Ovos embrionados aos dezoito dias de incubação foram inoculados com duas cepas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* UNICLON LA01 (LA01) e *Lactococcus lactis subsp. lactis* UNICLON LLL01 (LLL01), individualmente ou em associação e mais o controle negativo. Um dia após essa inoculação, os ovos foram inoculados ou não com a cepa de *Salmonella Heidelberg*. Eles ficaram incubados até o nascimento. Os pintinhos foram eutanasiados para avaliação de órgãos internos e contagem da *S. Heidelberg* em fígado e intestino. As placas de XLD e VB inoculadas com amostras de intestinos dos grupos tratados com LA01, LA01 + LLL01 e do grupo controle positivo, todos desafiados com *S. Heidelberg*, mostraram crescimento bacteriano. Os probióticos modulam a microbiota intestinal, equilibrando a saúde gastrointestinal e competindo com a *Salmonella* por nutrientes. Além disso, produzem substâncias antimicrobianas e ácidos que reduzem o pH intestinal, inibindo o crescimento de patógenos. O estudo evidenciou a eficácia da administração in ovo de cepas probióticas na redução de *Salmonella Heidelberg* em pintinhos de um dia.

Palavras-chave: Avicultura; *Lactobacillus*; resistência antimicrobiana; patógenos; microbiota intestinal.

ABSTRACT

Brazil is the world's largest exporter of chicken meat, which means poultry farms need to be careful with biosecurity programs to prevent the emergence of pathogens that could harm flocks and the final product. The aim of this study was to evaluate the use of two probiotic strains and their effect on the inhibition of *S. Heidelberg* in 1-day-old chicks. Eighteen-day incubated embryonated eggs were inoculated with two probiotic strains, *Lactocaseibacillus acidophilus* UNICLON LA01 (LA01) and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* UNICLON LLL01 (LLL01), either individually or in combination, along with a negative control. One day after this inoculation, the eggs were challenged with *Salmonella Heidelberg* or left unchallenged. They remained incubated until hatching. The chicks were euthanized for evaluation of internal organs and *S. Heidelberg* counts in the liver and intestines. XLD and VB plates inoculated with intestinal samples from the groups treated with LA01, LA01 + LLL01, and the positive control group, all challenged with *S. Heidelberg*, showed bacterial growth. Probiotics modulate the intestinal microbiota, balancing gastrointestinal health and competing with *Salmonella* for nutrients. Additionally, they produce antimicrobial substances and acids that lower intestinal pH, inhibiting pathogen growth. The study demonstrated the effectiveness of in ovo administration of probiotic strains in reducing *Salmonella Heidelberg* in 1-day-old chicks.

Keywords: Poultry farming; Lactobacilli; antimicrobial resistance; pathogens; intestinal microbiota.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1	<i>Salmonella</i> spp.....	12
2.2	<i>Salmonella</i> Heidelberg.....	13
2.3	Antibióticos.....	14
2.4	Probióticos	15
3	METODOLOGIA	17
4	RESULTADOS.....	19
5	DISCUSSÃO	20
6	CONCLUSÃO	22
	REFERÊNCIAS	23

1 INTRODUÇÃO

O projeto da produção de frango de corte no Brasil afeta consideravelmente o mercado interno e externo, com 33% voltado para a exportação e 67% para o mercado interno, em conjunto chegando a quase 14 milhões de toneladas de carne de frango (ABPA, 2022). Para que a alta demanda seja alcançada com qualidade, é necessário um controle sanitário minucioso, reduzindo a contaminação de produtos de origem aviária e a própria carne por propagação de patógenos como a *Salmonella* spp. que é responsável pela ocorrência de toxinfecção em humanos.

A utilização de antibióticos e quimioterápicos começou no início da avicultura, por volta de 1950 e com o decorrer do tempo começaram a ser utilizados como melhoradores de desempenho. A constância da utilização dos antimicrobianos é capaz de facilitar resistência de bactérias selecionadas, sendo assim, dificultando o tratamento das patologias e fazendo com que gerações subsequentes venham a ser resistentes (Dibner; Richards, 2005).

Aos poucos, os países da União Europeia proibiram o uso de antibióticos como aditivos promotores de crescimento, visando reduzir a resistência bacteriana. Dessa forma, países que realizam exportações devem se adequar às novas normas. No ano de 2018 os seguintes antibióticos foram excluídos do quadro de aditivos alimentares no Brasil: tetraciclina, penicilinas, cloranfenicol, sulfonamidas sistêmicas, furazolidona, nitrofurazona, e avoparcina (Cardinal; Pires; Ribeiro 2020). Na busca de alternativas para o crescimento da produção de frango de corte que atingisse as expectativas do consumidor sem deixar resíduos no produto, há o uso de probióticos adicionados na ração, na água de bebida ou via spray (Silva, 2016).

Salmonella spp. é um patógeno de impacto na saúde pública, com alta prevalência em aves. Promover alternativas aos antibióticos em aves é fundamental para reduzir a incidência desse microrganismo patogênico, e importante na disseminação da resistência aos antimicrobianos, o que em consequência diminui as perdas econômicas e infecções alimentares em humanos (Siqueira, 2022).

Entre as alternativas para o uso de antibiótico pode citar o uso dos probióticos, definidos como um preparado de microrganismos conhecidos, viáveis ou inativados, em quantidades ideais pode fornecer benefícios ao hospedeiro (Fuller, 1989; Ramlucken *et al.*, 2020). Dessa forma, a utilização auxilia no ganho de peso, melhorando a conservação alimentar e maior rendimento de carcaça. (Bertechini e Hossain, 1993; Jin *et al.*, 1998).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de cepas probióticas administradas *in ovo* no controle da multiplicação de *Salmonella* Heidelberg em pintinhos de 1

dia, que pode auxiliar no processo de substituição dos antibióticos como promotores de crescimento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Salmonella* spp.

Salmonella é uma das principais bactérias da família das Enterobacteriaceae, que pode causar intoxicação alimentar e, em alguns casos, pode acarretar graves infecções, levando a óbito. Ela possui duas espécies que podem afetar os seres humanos: *S. enterica* e *S. bongori*. A primeira tem seis subespécies, com a seguinte denominação: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (BRASIL, 2011). Dentro da subespécie *enterica* inclui os sorotipos paratíficos que possuem relação com a ocorrência de Salmoneloses aviárias e são zoonóticas. Nesse grupo, podem ser exemplificadas: Enteritidis, Hadar, Heidelberg, Kentucky e Typhimurium (Silva, 2018).

Morfolologicamente, são bastonetes Gram-negativos, não esporogênicos, anaeróbios facultativos e oxidase negativos. Possuem a forma de bacilos curtos, temperatura de crescimento variável de 5 a 45°C, com temperatura ótima de crescimento de 37°C. Há uma variação no pH entre 4 e 9, com pH ideal de crescimento de 7. Entre as estruturas dessas bactérias, pode-se citar lipopolissacarídeos, flagelos, fimbrias e determinadas proteínas de membrana externa que desempenham um papel na adesão e/ou invasão do epitélio intestinal. A maioria são móveis devido à presença de flagelos (Mendonça, 2016).

A transmissão do microrganismo pode ocorrer de forma vertical, via transovariana, onde o patógeno adentra no ovo ainda na formação deste no oviduto (Barancelli; Martin; Porto, 2012; Mendonça, 2016). Por meio dos poros presentes na casca do ovo, pode ocorrer a penetração da bactéria, devido às fezes contaminadas, quando o ovo passa pela cloaca. Como os ovos contaminados não causam morte embrionária, surgem pintinhos eclodidos, que constituem uma importante fonte de infecção e transmissão no aviário (Mendonça, 2016).

Ter conhecimento que a *Salmonella* é facilmente transmitida no ambiente pecuário, é de grande importância para o controle da Salmonelose e para identificação e eliminação de fatores que favorecem a reprodução desse microrganismo. Na cadeia de produção e processamento de frangos de corte, desde o nascimento até a mesa do consumidor, a *Salmonella* spp. podem ser transmitida por diversas formas, por isso sua epidemiologia é muito complexa, sendo difícil determinar como as aves são infectadas e como a transmissão desse patógeno ocorreu no aviário (Mendonça, 2016).

A salmonelose em humanos tem importância econômica e é uma das principais doenças zoonóticas. O período de incubação pode variar de acordo com o sorovar envolvido na

toxinfecção e da quantidade de células ingeridas. Os primeiros sinais clínicos aparecem em torno de 12 a 36 horas, podendo ser náusea, vômitos, dor abdominal e diarreia (pode persistir por até 7 dias), raramente os casos evoluem para uma infecção extra-intestinal, podendo gerar quadros de septicemia, otite, osteomielite, artrite, hepatite, pneumonia, meningite entre outros (Bassani, 2017).

2.2 *Salmonella* Heidelberg

A *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Heidelberg pertence ao grupo de salmonelas paratíficas, que podem causar doenças em animais ou humanos quando há consumo de carne crua ou ovos contaminados. Um dos fatores mais importantes que auxiliam para a alta prevalência de salmonelas paratíficas é a alta diversidade antigênica desse gênero, o que facilita a sua adaptação a diferentes hospedeiros. A *S. Heidelberg* é uma das principais espécies relacionadas à infecção humana e uma das mais frequentes isoladas em galinhas, perus e suínos (Bassani, 2017).

A *S. Heidelberg* foi relatada pela primeira vez no Brasil a partir de um estudo retrospectivo de 30 anos, entre o ano de 1962 até 1992, e foi relatada a presença do sorovar nos órgãos como coração, fígado e fezes das aves (Hofer; Filho; Reis 1997). Ao passar dos anos, o sorovar Heidelberg foi apontado como um dos principais sorovares envolvidos em surtos alimentares decorrentes do consumo de alimentos à base de ovos, carnes e derivados (Kottwitz *et al.*, 2010; Bassani, 2017).

Pulido-Landinez *et al.* (2013) realizaram estudo para avaliação da diversidade de *Salmonella enterica* na região sul do Brasil e conseguiram isolar o sorovar Heidelberg em 46% das amostras, demonstrando ser o de maior predominância. Em 2015 a *S. Heidelberg* se tornava o sorotipo de maior prevalência em análises oficiais de controle realizadas no sul do Brasil. No período de 2012 a 2014, a prevalência deste sorotipo foi de 20% a 33% do total de amostras positivas de *Salmonella* spp. (Bassani, 2017).

Colla *et al.* (2012) descreveram o perfil de resistência da *S. Heidelberg* isolada de abatedouros à clorexidina, amônia quaternária e ácido peracético. Os autores concluíram que as amostras isoladas em 2005 eram 100% suscetíveis à amônia quaternária, enquanto as amostras de 2009 eram 33% resistentes ao mesmo desinfetante.

A presença de fatores que favorecem a virulência e a formação de biofilmes, em conjunto, pode formar um ambiente favorável para a troca de genes plasmidiais, como os que

codificam resistência a quinolonas, polimixinas e beta lactâmicos, que podem expressar resistência a diferentes classes de antibióticos (Melo *et al.*, 2021).

Em 2017, Center for Disease Control and Prevention (CDC) divulgou a notícia sobre um surto que ocorreu em 15 estados dos Estados Unidos da América e foi causado por *Salmonella* Heidelberg multirresistente, devido à exposição a vacas leiteiras. Um total de 56 pessoas foram intoxicadas com o leite, 35% foram hospitalizadas e nenhuma morte foi relatada. Ao analisar, identificou-se uma cepa resistente a amoxicilina-clavulanato, ampicilina, cefoxitina, ceftriaxona, estreptomicina e tetraciclina. Além disso, foi observada suscetibilidade reduzida à ciprofloxacina. Todos os 10 isolados testados foram suscetíveis à azitromicina e meropenem (CDC, 2018; Reis, 2022).

2.3 Antibióticos

Os antimicrobianos têm sido utilizados há décadas na produção animal, com o objetivo preventivo e terapêutico. Além disso, os antibióticos são usados como promotores de crescimento, com o intuito de melhorar o desempenho de crescimento das aves, dessa forma aumentando a produtividade. Os antimicrobianos que foram mais utilizados ao longo da década com esse propósito foram as tetraciclina, os macrolídeos e as penicilinas (Bassani, 2017).

Atualmente, o Brasil ocupa a posição de segundo maior produtor de carne de frango no mundo, sendo que aproximadamente 33% de toda a sua produção é destinada ao mercado externo. Desde 2008, o país conquistou a colocação de maior exportador deste produto, mantendo esse destaque até os dias atuais, seguido pelos Estados Unidos e União Europeia (ABPA, 2022), com produção automatizada e rigoroso controle sanitário para *Salmonella* spp. Portanto, considerando sua ampla distribuição e variedade de hospedeiros, diferentes fatores que afetam sua prevalência, resistência a drogas e aumento de virulência devem ser estudados para implementar medidas de controle (Melo *et al.*, 2021).

Há uma preocupação crescente com o impacto da resistência a antibióticos nos efeitos de múltiplas drogas em bactérias animais de importância para a saúde pública, que também incluem o sorotipo *S. Heidelberg*. O aumento da resistência à penicilina e cefamicina, carbapenêmicos e cefalosporinas de amplo espectro, e outros grupos como as tetraciclina, quinolonas, sulfonamidas e polimixinas, amplificam a gravidade dos casos clínicos que requerem internação, por serem importantes agentes terapêuticos (Melo *et al.*, 2021).

Alguns antibióticos promotores de crescimento não são absorvidos pela microbiota intestinal, gerando resíduos na carne de frango. O problema de resistência e de resíduos gera

uma percepção negativa frente ao consumidor sobre o uso de antibióticos como promotores de crescimento em dietas. Há evidências de uma relação entre antibióticos usados como aditivos promotores de crescimento e resistência à classe de antibióticos, tanto em humanos como animais. Em decorrência da pressão da sociedade e problemas percebidos que ocorrem com o uso de antibióticos promotores de crescimento, é necessária a busca de uma alternativa para a indústria avícola (Abd El-Hack *et al.*, 2022).

2.4 Probióticos

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos, que concedem benefícios à saúde quando ingeridos em quantidades necessárias (FAO/OMS, 2002). Os benefícios dos probióticos são: melhoria de desempenho, modulação da microbiota intestinal, inibição de patógenos, melhoria da integridade intestinal e modulação imunológica do frango de corte. Os probióticos devem ser resistentes à bile e aos ácidos, não ter efeitos colaterais, resistir ao processamento de alimentos e reduzir o número de microrganismos patogênicos (Abd El-Hack *et al.*, 2021).

A avicultura fortaleceu sua posição na indústria agroalimentar nos últimos anos (Konkol; Korcynski, 2021). Atualmente, os aditivos alimentares e suplementos nutricionais estão ganhando importância na indústria avícola e nos sistemas de saúde devido aos seus amplos benefícios, como promoção do crescimento e produção, fortalecimento do sistema imunológico e proteção da saúde (Abd El-Hack *et al.*, 2020). Adicionalmente, o ano de 2006 foi um marco na indústria pecuária, pois a União Europeia proibiu o uso de antibióticos como melhoradores de crescimento na nutrição animal sob o Regulamento do Conselho (EC) N° 2821/98 (Konkol; Korcynski, 2021).

As bactérias ácido lácticas (BAL), dentre elas os *Lactobacillus*, são microrganismos Gram-positivos, não esporulados, catalase-negativos, que podem se apresentar na forma de cocos ou bacilos. Encontra-se em meios ricos em nutrientes, como gastrointestinal, urogenital, em alimentos fermentados, carne e grãos. As BAL auxiliam para a vida útil do alimento, diminuindo seu pH ou pela produção de peptídeos antagonistas a outras bactérias (Freire *et al.*, 2021).

Uma das vantagens do uso de probiótico é o efeito positivo no trato gastrointestinal e no sistema imunológico, dessa forma preenchendo as lacunas abertas pelos antibióticos. Os microrganismos mais comuns a serem utilizados como probióticos, são as bactérias *Bifidobacterium* spp., *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. (Konkol; Korcynski,

2021). *Bacillus subtilis* têm sido usados na dieta de frangos de cortes desafiados com *S. Heidelberg* e já no 1º dia de vida diminui a presença da bactéria no conteúdo cecal, diminuindo a disseminação da infecção (Silva, 2016). Zhang e Kim (2014) demonstraram que o acréscimo de cepas *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis* e *Clostridium butyricum*, na dieta de frangos de cortes melhorou o ganho de peso e conversão alimentar, aumentou a concentração de imunoglobulinas no soro e *Lactobacillus* spp. nos cecos. A via de inoculação e a determinação do momento ideal para a aplicação da associação entre as espécies bacterianas selecionadas para a terapia probiótica tem sido objeto de pesquisa na prevenção de patógenos entéricos (Silva, 2016).

3 METODOLOGIA

O experimento foi conduzido com 30 ovos embrionados (Linhagem Ross) no Laboratório de Incubação de Aves (LIAVE-UFU), até o nascimento. Os ovos foram incubados em incubadora automática (Premium Ecológica®) a 37°C e 55% de umidade e aos 18 (dezoito) dias de incubação, foram inoculados por via âmnio (AM) com *Lactocaseibacillus acidophilus* UNICLON LA01 e (LA01) ($3,6 \times 10^5$ UFC/embrião) ou um blend constituído por LA01 associada com *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* UNICLON LLL01 (LLL01) ($3,6 \times 10^5$ de LA01 e $1,1 \times 10^7$ de LLL01). Um dia após, os ovos tratados e o CP foram inoculados ou não com $1,9 \times 10^6$ UFC/ovo de *Salmonella* Heidelberg (SH) via membrana da casca (MC) (Tabela 1).

Tabela 1. Grupos formados utilizando cepas probióticas isoladas ou em blend e desafiados com *Salmonella* Heidelberg.

Grupo	Número ovos	Tratamento	Desafio
G1	5	LA01	SH
G2	5	LA01 + LLL01	SH
G3	5	LA01	Salina
G4	5	LA01+LLL01	Salina
G5 (CN)	5	Salina	Salina
G6 (CP)	5	Salina	SH

LA= *Lactocaseibacillus acidophilus*, LL=*Lactococcus lactis*, SH= *Salmonella* Heidelberg, CN= Controle negativo e CP= Controle positivo

Os grupos foram dispostos aleatoriamente nas incubadoras e separados por saco de redinha para frutas, foi colocado uma divisória entre o controle negativo, para que não houvesse contaminação com os outros grupos. Os embriões foram incubados até a eclosão e após o nascimento foram sedados com 0,4 mg/Kg de Xilazina e 100 mg/Kg de Quetamina aplicadas via intracelomática e eutanasiados por deslocamento cervical. Foi realizada a coleta inteira de fígado e intestino de forma asséptica para contagem bacteriana de SH. Os órgãos coletados foram macerados em 10mL de solução salina 0,85%, em seguida foi realizada diluição seriada e inoculação em placa de ágar Xyiose Lisina Desoxicolato (XLD) (Biokar®) e Verde Brilhante (VB) para posterior contagem. Ágar XLD é um meio de crescimento seletivo utilizado no isolamento de espécies de *Salmonella* spp. Ele permite o crescimento dos microrganismos em um ambiente seguro e sem riscos. Bactérias que produzem H₂S formam colônias negras (colônias características) sendo altamente presuntivo de *Salmonella*. A inibição de

microrganismos Gram positivos é obtida pela presença do desoxicolato de sódio (LB Laborclin, 2022). O Verde Brilhante também é um meio seletivo para o isolamento de *Salmonella* produzindo colônias incolores ou rosadas.

A contagem foi realizada em duplicata e foram consideradas placas com 15 a 250 colônias. Após a contagem o número de bactérias foi transformado em $\log_{10}$, e avaliado se os dados seguem distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Como a distribuição foi paramétrica, foi realizado o teste da ANOVA seguido pelo teste t de Tukey. O programa GraphPadprism 10.0.2 foi usado para realizar o teste e foi considerado uma diferença significativa o $p < 0,05$.

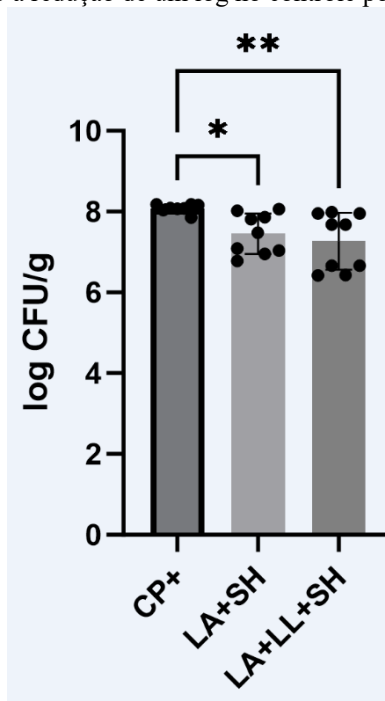
4 RESULTADOS

As placas de XLD e VB oriundas de amostras de fígado e intestino dos grupos controle negativo inoculados com LA01 ou LA01 + LLL01 e desafiados com salina não apresentaram crescimento bacteriano, conforme o esperado. Não houve crescimento bacteriano nas placas de XLD e VB inoculadas com amostras de fígado de nenhum dos grupos testados ou controle positivo.

As placas de XLD e VB inoculadas com amostra de intestinos dos grupos inoculados com LA01 e LA01 + LLL01 desafiados com *S. Heidelberg* e do grupo controle positivo, inoculado com salina e desafiado com *S. Heidelberg* apresentaram crescimento bacteriano.

Houve redução do crescimento bacteriano de *Salmonella Heidelberg* em 1 log (Figura 1) para os dois tratamentos testados em relação ao grupo inoculado com a bactéria patogênica e previamente tratado com salina. No entanto, a redução observada no tratamento LA01 foi similar ao do tratamento LA01 + LLL01.

Figura 1. Gráfico demonstrando a redução de um log no controle positivo e nos tratamentos.



LA= *Lacticaseibacillus acidophilus*, LL=*Lactococcus lactis*, SH= *Salmonella Heidelberg*, CP= Controle positivo. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

5 DISCUSSÃO

A *S. Heidelberg* é um microrganismo patogênico e multirresistente para humanos, e alguns isolados carregam resistência aos beta-lactâmicos. É considerado o sorovar mais comum que causa salmonelose e resulta em infecção sanguínea. Após a proibição do uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação das aves, houve uma redução da resistência aos antibióticos em humanos. Com isso, há uma pressão significativa sobre as indústrias agropecuárias para melhorar o mecanismo de defesa dos animais, de forma que o uso de probiótico vem tomando um espaço significativo (Sabo *et al.*, 2020).

A *S. Heidelberg* foi inoculada via membrana da casca, atingiu o embrião, porém não alcançou o fígado. Não é possível explicar tal evento, mas provavelmente isso pode ter ocorrido devido a um período de tempo curto, já que a *Salmonella* foi inoculada aos 19 dias de incubação e o nascimento ocorre próximo ao dia 21. Ou ainda porque o sistema imune inato hepático realizou um *clearance* de bactérias no fígado.

Salmonella Heidelberg é um importante patógeno de transmissão vertical (Wilsman, 2022) e controlar essa bactéria desde o primeiro dia de vida do pintinho é fundamental para a não disseminação desse patógeno (Oro *et al.*, 2023). No presente trabalho, houve a redução de um log de bactéria patogênica nos grupos tratados com probióticos em relação ao controle positivo. A redução do tratamento LA01 foi similar ao do tratamento LA01 + LLL01, mostrando que provavelmente o LA01 foi responsável pela queda. Embora a quantidade de redução de *S. Heidelberg* possa parecer pequena, na verdade, ela poderia representar mais um controle no frango de corte, já que uma queda de 1 log representa 90% de inibição. *Lactobacillus* pode diminuir *S. Heidelberg* em pintinhos e no terceiro dia após a exposição os pintinhos apresentam uma queda significativamente maior na quantidade de *S. Heidelberg* no intestino (Oro *et al.*, 2023). No presente trabalho, foi inoculado uma alta quantidade *S. Heidelberg* e realizada a coleta apenas no primeiro dia de idade. Portanto, estudos futuros devem ser realizados inoculando doses menores de *S. Heidelberg* e avaliando o pintinho até idades mais tardias, como 7 dias de idade.

Os probióticos são microrganismos que modulam a microbiota intestinal e alteram a saúde do trato gastrointestinal, deixando-o mais equilibrado. Dessa forma, a interação entre probiótico e a *Salmonella* ocorre em diferentes níveis, incluindo a competição por nutrientes, a produção de substâncias antimicrobianas, secreções que reduzem o pH intestinal, como os ácidos graxos voláteis e ácidos orgânicos produzidos durante a degradação do produto probiótico o que inibe o crescimento patogênico (Abd-El-Hack *et al.*, 2022; Al-Fatah, 2020;

Sanders, 2019), a modulação do sistema imunológico do hospedeiro (Bron *et al.*, 2017) e a exclusão competitiva. Os mecanismos tendem a oferecer uma abordagem promissora para o controle de *Salmonella* em criações avícolas, contribuindo para ter uma carne mais segura e sem risco para a saúde pública.

Além dos benefícios da inibição direta, o uso de probióticos ainda na vida embrionária pode levar a uma diminuição no uso de antibióticos, que é uma questão emergente importante.

É crucial uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos pelos quais os probióticos influenciam a microbiota intestinal das aves. A modulação positiva da microbiota não só melhora as defesas naturais dos hospedeiros contra infecções, mas também pode ter efeitos benéficos na digestão e na absorção de nutrientes, impactando assim positivamente o desempenho geral das aves (Kers *et al.*, 2018). Abd El-Hack *et al.* (2022), afirma que dentre as características essenciais dos probióticos, deve-se incluir a resistência à bile e aos ácidos, especificidade da cepa, ausência de efeitos colaterais, redução no número de microrganismos patogênicos e resistência ao processamento de alimentos. Isto é essencial para atender à crescente demanda por uma produção avícola eficiente e sustentável.

Os ácidos graxos de cadeia curta que são produzidos por bactérias benéficas demonstram aumentar a expressão gênica do peptídeo de defesa do hospedeiro. Em concentrações altas interrompem a força motriz do próton e as reações metabólicas das bactérias quando pequenos ácidos não ionizados atravessam as membranas bacterianas e então se dissociam em prótons e ânions no citoplasma (Abd-El-Hack *et al.*, 2022). Os compartimentos intracelulares, local onde ocorre a força motriz do próton, ficam ácidos, perturbando as reações metabólicas, e os ânions interrompem o equilíbrio osmótico (Sun; O’Riordan, 2013). *Lactobacillus* spp. é conhecido por secretar ácido láctico, que age reduzindo o pH intestinal e inibe o crescimento patogênico (Abd-El-Hack *et al.*, 2022).

Em 1997, Edens *et al.* (1997) conduziram estudos visando determinar o potencial de exclusão competitiva de *Lactobacillus* spp. inoculados *in ovo*. Os resultados indicaram uma alta colonização dessas bactérias nos cecos das aves após a eclosão, ao contrário do grupo controle. A inoculação não demonstrou impactos adversos na eclodibilidade e na mortalidade, além de reduzir a prevalência de *Salmonella*. No presente trabalho, a inoculação de *Lactocaseibacillus acidophilus* UNICLON LA01 (LA01) ou em combinação com *Lactococcus lactis subsp. lactis* UNICLON LLL01 (LLL01) também não resultou em mortalidade ou lesões em pintinhos, evidenciando a segurança da prática e seu potencial no auxílio para o controle de *Salmonella*.

6 CONCLUSÃO

O estudo destacou a eficiência da administração *in ovo* de cepas probióticas com ênfase na redução de *Salmonella* Heidelberg em pintinhos de 1 dia de vida. Especificamente, a cepa de LA01 foi identificada como mais eficiente. A inoculação de LA01 em embriões com 18 dias de incubação apresentou ser segura e resultou em uma queda de 1 log UFC/intestino de *S. Heidelberg* em pintinhos nascidos.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-HACK, M. E.; EL-SAADONY, M. T.; SHAFI, M. E.; QATTAN, S. Y. A.; BATIHA, G. E.; KHAFAGA, A. F.; ABDEL-MONEIM, A. E.; ALAGAWANY, M. Probiotics in poultry feed: A comprehensive review. **J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.**, v.104, p.1835–1850, 2020.
- ABD EL-HACK, M. E.; EL-SAADONY, T. M.; SALEM, M. H.; EL-TAHAN, A. M.; SOLIMAN, M. M.; YOUSSEF, G. B. A.; TAHA, A. E.; SOLIMAN, S. M.; AHMED, A. E.; EL-KOTT, A. F.; AL SYAAD, K. M.; SWELUM, A. A. Alternatives to antibiotics for organic poultry production: types, modes of action and impacts on bird's health and production. **Poultry Science**, v.101, p.101696, 2022.
- ABPA (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL). **Relatório Anual 2022**. Disponível em: <<https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/01/abpa-relatorio-anual-2022.pdf>>. Acesso em 21 de abr. de 2023.
- AL FATAH, M. ABD. Probiotic Modes of Action and Its Effect on Biochemical Parameters and Growth Performance in Poultry. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v.10, n.1, p.9-15, 2020.
- BARANCELLI, G. V.; MARTIN, J. G. P.; PORTO, E. Salmonella em ovos: relação entre produção e consumo seguro. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v.19, n.2, p.73-82, 2012.
- BASSANI, J. **Eficácia de sanitizantes e susceptibilidade antimicrobiana de Salmonella Heidelberg isoladas de fontes avícolas em 2006 e 2016**. 2017. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de Salmonella spp.:** diagnóstico laboratorial do gênero Salmonella. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- BRON, P. A.; KLEEREBEZEM, M.; BRUMMER, R-J.; CAN, P. D.; MERCENIER, A.; MACDONALD, T. T.; GARCIA-RÓDENAS, C. L.; WELLS, J. M. Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? **British Journal of Nutrition**, v.117, n.1, p.93-107, 2017.
- CARDINAL, K. M.; PIRES, P. G. S.; RIBEIRO, A. M. L. Growth promoter in broiler and pig production. **Pubvet**, v.14, n.3, p.115-120, 2020.
- CDC (Center for Disease Control and Prevention). **Multistate Outbreak of Multidrug-Resistant Salmonella Heidelberg Infections Linked to Contact with Dairy Calves (Final Update), 2018**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/salmonella/heidelberg-11-16/index.html>>. Acesso em: 7 de nov. de 2023.
- COLLA, F. L.; RODRIGUES, L. B.; BORSOI, A.; DICKEL, E. L.; NASCIMENTO, V. P.; SANTOS, L. R. Isolamento de Salmonella Heidelberg em diferentes pontos da tecnologia de abate de frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.79, n.4, p. 603-606, 2012.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. Antibiotic Growth Promoters in Agriculture: History and Mode of Action. **Poultry Science**, v.84, p.634-643, 2005.

EDENS, F.W.; PRAKHURST, C. R.; CASAS, I. A.; DOBROGOSZ, W. J.; Principles of ex ovo competitive exclusion and in ovo administration of *Lactobacillus reuteri*. **Poultry Science**, v.76, n.1, p.179-196, 1997.

FREIRE, T. T.; SILVA, A. L. T.; FERREIRA, B. K. O.; SANTOS, T. M. Lactic acid bacteria its characteristics and importance: review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, p. e513101119964, 2021.

HOFER, E.; FILHO, S. J. S.; REIS, E. M. F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v.17, n.2, p.55-63, 1997.

KERS, J. G.; VELKERS, F. C.; FISCHER, E. A. J.; HERMES, G. D. A.; STEGEMAN, J. A.; SMIDT, H. Host and Environmental Factors Affecting the Intestinal Microbiota in Chickens. **Frontiers in Microbiology**, v.9, n.1, p.235-240, 2018.

KONKOL, K. K. D.; KORCYNISKI, M. Overview of the Use of Probiotics in Poultry Production. **Animals**, v.11, p.1620, 2021.

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

MELO, R. T.; GALVÃO, N. N.; GUIDOTTI-TAKEUCHI, M.; PERES, P. A. B. M.; FONSECA, B. B.; PROFETA, R.; AZEVEDO, V. A. C.; MONTEIRO, P. G.; BRENIG, B.; ROSSI, D. A. Molecular Characterization and Survival Abilities of *Salmonella* Heidelberg Strains of Poultry Origin in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v.12, p.674147, 2021.

MENDONÇA, E. P. **Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no Brasil**. 2016. 82f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) –Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

ORO, C. S.; OUROS, C. C.; RIBEIRO, G. C.; SANTOS, C. B. T.; OKAMOTO, A. S.; HATAKA, A.; MORAES, G. N.; MILBRADT, E. L.; FILHO, R. L. A. Evaluation of probiotic and glutamine in ovo on broilers challenged with *Salmonella* Heidelberg. **J. Appl. Poult. Res.**, v.32, p.100328, 2023.

PULIDO-LANDÍNEZ, M.; SÁNCHEZ-INGUNZA, R.; GUARD, J.; NASCIMENTO, V. P. Assignment of serotype to *Salmonella enterica* isolates obtained from poultry and their environment in Southern Brazil. **Lett Appl Microbiol.**, v.57, n.4, p.288-294, 2013.

REIS, A. D. **Caracterização molecular dos mecanismos de resistência, perfil de virulência e diversidade genética de cepas de *Salmonella* Heidelberg**. 2022. 132f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

SABO, S. S.; MENDES, M. A.; ARAÚJO, E. S.; MURADIAN, L. B. A.; MAKIYAMA, E. N.; LEBLANC, J. G.; BORELLI, P.; FOCK, R. A.; KNOBL, T.; OLIVEIRA, R. P. S. Bioprospecting of probiotics with antimicrobial activities against *Salmonella* Heidelberg and

that produce B-complex vitamins as potential supplements in poultry nutrition. **Scientific Reports**, v.10, p.7235, 2020.

SANDERS, M. E.; MERENSTEIN, D. J.; REID, G.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A.; Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v.16, p.605-616, 2019.

SILVA, I. G. O. **Efeito da inoculação in ovo de probiótico e produto de exclusão competitiva em frangos de corte desafiados com Salmonella Heidelberg**. 2016. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2016.

SILVA, R. A. **Infecção por Salmonella Heidelberg em pintos de cortes alimentados com dietas contendo compostos bioativos comerciais**. 2018. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2018.

SIQUEIRA, M. B. **Probióticos no controle de Salmonella spp. na criação de frango**. 2022. 46f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Zootecnia) - Instituto Federal Goiano, Ceres, 2022.

SUN, Y.; O’RIORDAN, M. X. D. Regulation of Bacterial Pathogenesis by Intestinal Short-Chain Fatty Acids. **Adv. Appl. Microbiol.**, v.85, p.93-118, 2013.

WILSMANN, D. E. **Atividade antimicrobiana da água eletroquimicamente ativada na redução da contaminação de carcaças e na formação de biofilmes de Salmonella Heidelberg em superfícies de matadouro frigorífico de aves**. 2022. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2022.

ZHANG, Z. F.; KIM, I. H. Effects of multistrain probiotics on growth performance, apparent ileal nutrient digestibility, blood characteristics, cecal microbial shedding, and excreta odor contents in broilers. **Poultry Science**, v.93, n.2, p.364 – 370, 2014.