

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE *Quorum Sensing* ENTRE *Lactobacillus spp.*
CONTRA *Salmonella* Heidelberg EM FRANGOS DE CORTE.

ANA CAROLINA IZIDORO DE MORAES

BOTUCATU
MAIO 2019

ANA CAROLINA IZIDORO DE MORAES

AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE *Quorum Sensing* ENTRE *Lactobacillus spp.*
CONTRA *Salmonella* Heidelberg EM FRANGOS DE CORTE.

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre.

Orientador Prof. Dr. Adriano Sakai Okamoto

BOTUCATU
MAIO 2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Moraes, Ana Carolina Izidoro de.

Avaliação do mecanismo de *Quorum Sensing* entre
Lactobacillus spp. contra *Salmonella* Heidelberg em frangos
de corte / Ana Carolina Izidoro de Moraes. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia

Orientador: Adriano Sakai Okamoto

Capes: 50501062

1. Aves domésticas. 2. Frango de corte. 3. Probióticos. 4.
Salmonella. 5. *Lactobacillus*. 6. Percepção de *Quorum*.

Palavras-chave: aves; comunicação bacteriana; filtrado;
probiótico; spot on the lawn.

Nome do Autor: Ana Carolina Izidoro de Moraes

Título: AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE *Quorum Sensing* ENTRE *Lactobacillus spp.* CONTRA *Salmonella* Heidelberg EM FRANGOS DE CORTE.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof Dr Adriano Sakai Okamoto

Presidente da banca e Orientador

Departamento de Clínica veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof Dr Raphael Lucio Andreatti Filho

Membro da banca

Departamento de Clínica veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a Dr^a Vera Lúcia Mores Rall

Membro da banca

Departamento de Microbiologia e Imunologia

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Data da Defesa: 30 de Maio de 2019.

Agradecimentos

A parte mais difícil de escrever, pois a vida não se encaixa em metodologias e a importância das pessoas em nossa vida não é uma análise estatística.

À Deus por me dar saúde, sabedoria e resiliência.

Ao meu orientador Professor Doutor Adriano Sakai Okamoto por confiar em mim e em meu trabalho durante esses anos.

Aos meus pais Marcos Moraes e Silvana Moraes e minha irmã Ana Carla Moraes que sempre me motivaram na vida, por estarem presentes em todos os momentos, me ajudando a ser um ser humano melhor.

Aos colegas de laboratório, companheiros de vida acadêmica Leticia Gross, Amanda Laurindo, Isabella Ribeiro, Igor Vellano, Camila Oro e a todos que estiveram presente durante esses anos, me auxiliando na condução do projeto e no meu desenvolvimento profissional.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/UNESP pela oportunidade e suporte na realização do mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do auxílio a pesquisa numero do processo 2017/17712-4.

A Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela concessão da bolsa de mestrado.

Finalmente, faço questão de agradecer todos os que torceram por mim, amigos, colegas e familiares, pois ninguém vence sozinho.

LISTA DE QUADROS, TABELAS FIGURAS

TABELA 1 <i>Lactobacillus</i> spp. Referência (ATCC).....	34
TABELA 2 Sequência, condições e referências dos primers utilizados na identificação dos <i>Lactobacillus</i> spp.....	35
FIGURA 1 Teste <i>Spot on the Lawn</i>	41
TABELA 3 Resultados expressos em média e desvio padrão de halos de inibição do <i>Lactobacillus</i> spp (isolados). contra <i>Salmonella</i> Heidelberg.....	41
TABELA 4 Média dos halos de inibição de todos <i>Lactobacillus</i> spp. isolados cultivados com todos os filtrados contra <i>Salmonella</i> Heidelberg.....	42
TABELA 5 Resultados da contagem de <i>Salmonella</i> Heidelberg nos cecos das aves, nos diferentes grupos experimentais e colheitas.....	45
TABELA 6 Média, desvio padrão, mínimo e máximo da contagem de <i>Salmonella</i> Heidelberg das colheita.....	46
ANEXO 1 Análise de variância entre os grupos e as coletas (valores de P)....	55
Normas para publicação.....	56
Artigo Publicado Bacterial communication between <i>Lactobacillus</i> spp. isolated from poultry in the inhibition of <i>Salmonella</i> Heidelberg—proof of concept.....	57

Sumário

CAPÍTULO 1	8
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. Salmonelose	13
2.3. Microbiota intestinal das aves	16
2.4. Probióticos	17
2.5. Comunicação bacteriana	18
3. OBJETIVO	19
3.1. Objetivo específico <i>in vitro</i>	20
3.2. Objetivo específico <i>in vivo</i>	20
CAPÍTULO 2	31
DESCRIÇÃO DO PROBLEMA	32
MATERIAIS E MÉTODOS	34
Amostras	34
Identificação dos <i>Lactobacillus</i> spp.	35
Experimento <i>in vitro</i>	36
Cultivo das amostras com filtrado	37
Experimento <i>in vivo</i>	37
Aves	37
Local	37
Comissão de ética	37
Delineamento experimental	38
Desafio com <i>Salmonella</i> Heidelberg	38
Contagem da <i>Salmonella</i> Heidelberg	39
RESULTADOS	40
CONCLUSÃO	48

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE *Quorum Sensing* ENTRE *Lactobacillus spp.* CONTRA *Salmonella* Heidelberg EM FRANGOS DE CORTE.

MORAES, A. C. I. AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE *Quorum Sensing* ENTRE *Lactobacillus spp.* CONTRA *Salmonella* Heidelberg EM FRANGOS DE CORTE. Botucatu, 2019. 62p. Defesa Mestrado Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

RESUMO

Uma das principais doenças transmitida por alimento é a salmonelose, causada pela bactéria *Salmonella spp.*, ela está presente em vários aviários, e com o aumento da produção avícola, se disseminou nos aviários, tornando-se um problema pertinente e de grande importância na saúde pública e animal. Com isso medidas de controle foram instituídas, entre elas o uso de antimicrobiano, causando diversas discussões, principalmente em relação a resistência bacteriana á antimicrobianos utilizados na medicina humana, onde medidas alternativas estão sendo desenvolvidas para evitar o uso dos antimicrobianos. Dessa forma o objetivo do projeto foi avaliar a capacidade dos *Lactobacillus spp.*, isolados na inibição da *Salmonella* Heidelberg (SH), pelo mecanismo de *quorum sensing in vitro* e *in vivo*. Foram colhidos de suabes cloacal de frangos de corte que passaram por provas fenotípica e molecular. Esses isolados foram submetidos ao teste de inibição em placa para avaliar a capacidade de inibição da SH. Em seguida foram produzidos os filtrados, a partir dos *Lactobacillus sp.* (ATCC), separadamente, com contato com a SH. Esses isolados foram cultivados com os filtrados, separadamente e em seguida submetidos novamente ao teste de inibição em placa. Dessa maneira, foi possível medir e comparar os halos de inibição, para a verificação da ocorrência da comunicação bacteriana entre os *Lactobacillus sp.* (ATCC) e os isolados. Foi realizada a análise estatística selecionando um *Lactobacillus spp.* isolado de frango de corte e um filtrado os quais obtiveram melhores resultados no teste *in vitro*. O teste *in vivo* foi dividido em quatro tratamentos, *Lactobacillus spp.*, filtrado, *Lactobacillus spp.* mais o filtrado e o sem tratamento, todos foram desafiados com SH. Após o teste *in vivo* pode se concluir que o filtrado e o *Lactobacillus spp.* interferiram diretamente na redução de SH nas aves.

Palavra chave: Aves, comunicação bacteriana, filtrado, probiótico, *Spot on the Lawn*.

MORAES, A. C. I. EVALUATION OF THE *Quorum Sensing* MECHANISM BETWEEN *Lactobacillus* spp. AGAINST *Salmonella* Heidelberg IN cut chicken. Botucatu, 2019, 62p. Dissertation, (Master). School of Veterinary Medicine and Animal Science, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT:

One of the main food-borne diseases is salmonellosis, caused by the bacterium *Salmonella* spp., It is present in several aviaries, and with the increase of poultry production, it has spread in aviaries, becoming a relevant problem and of great importance in health public and animal. With this, control measures were instituted, including the use of antimicrobial, causing several discussions, mainly regarding bacterial resistance to antimicrobials used in human medicine, where alternative measures are being developed to avoid the use of antimicrobials. Thus, the objective of the project was to evaluate the ability of *Lactobacillus* spp., isolated in the inhibition of *Salmonella* Heidelberg (SH), by in vitro and in vivo quorum sensing mechanism. They were harvested from cloacal swabs of chickens that underwent phenotypic and molecular tests. These isolates were subjected to plaque inhibition test to assess the inhibitory capacity of SH. Filtrates were then produced from *Lactobacillus* sp. (ATCC), separately, with SH. These isolates were cultured with the filtrates separately and then re-plate inhibited. In this way, it was possible to measure and compare inhibition halos to verify the occurrence of bacterial communication between *Lactobacillus* sp. (ATCC) and the isolates. Statistical analysis was performed by selecting a *Lactobacillus* spp. isolated from chickens and a filtrate which obtained better results in the in vitro test. The in vivo test was divided into four treatments, *Lactobacillus* spp., filtered, *Lactobacillus* spp. plus the filtrate and the untreated, all were challenged with HS. After in vivo testing it can be concluded that the filtrate and *Lactobacillus* spp. interfered directly in SH reduction in chickens.

Keyword (s): chickens, bacterial communication, inductor, pro-biotic, Spot on the Lawn.

1. INTRODUÇÃO

A avicultura industrial tem como objetivo produzir alimento de qualidade a baixo custo, sendo um produto promissor para o consumidor final (SILVA, ANDREATTI FILHO, 2000).

O Brasil ocupa a segunda posição na produção mundial de carne de frango, atrás dos Estados Unidos (FRANCO, 2017), mas é o maior exportador desde de 2004 (UBABEF, 2011). E por isso se faz necessário que as criações avícolas tenham um programa rigoroso de biosseguridade para diminuir o desafio às doenças.

As enterobactérias mais frequentes em doenças transmitida por alimentos são do gênero *Salmonella* spp. (MARCHI *et al*, 2011) e entre os sorovares com maior importância é a *Salmonella* Heidelberg, pois tem um alto poder zoonótico (HOFER, SILVA FILHO, REIS, 1997), além disso é o sorovar com maior invasão comparando com os outros sorovares, causando a doença de forma mais grave (COLLA *et al*. 2012).

Com o intuito de controlar as *Salmonellas* spp. nos aviários, iniciou o uso de antimicrobianos que por muitas vezes era feito de forma indiscriminada, o que promoveu o aumento das amostras multirresistentes aos antimicrobianos, se tornando uma preocupação com a saúde pública e dos animais (BASSANI, 2017), por isso medidas alternativas estão sendo desenvolvidas, que são os probióticos, bactérias que fazem parte da microbiota natural das aves, auxiliando no equilíbrio da microbiota intestinal, pela competição do sítio de ligação nos enterócitos e competição por nutrientes com bactérias patogênicas, melhoram absorção de nutrientes, modulam a resposta imunológica das aves e produzem substâncias bactericidas (SILVA, ANDREATTI FILHO, 2000; KURITZA, WESTPHAL, SANTIN, 2014; MEDINA-SAAVEDRA *et al*, 2017).

Na composição dos probióticos existem diversas bactérias e leveduras sendo o *Lactobacillus* spp., a principal bactéria encontrada nos produtos comerciais.

Uma outra forma que o *Lactobacillus* spp. utiliza para a inibição da *Salmonella* spp. é através da produção de bacteriocinas e comunicação intra e interespecie que ocorre pelo mecanismo do *Quorum Sensing*, onde as bactérias notam as mudanças no ambiente por meio de substâncias sinalizadoras secretadas por células individuais, são reconhecidas por receptores específicos de outras bactérias. O que leva a modificação do comportamento bacteriano, resultando em resposta coletiva a qual regulam atividades fisiológicas que podem ser vantajosas, como mudança para um ambiente com maior oferta de nutrientes, formação de biofilme que conferem proteção contra ação do ambiente, controle da densidade populacional, expressão gênica, fatores de virulência, produção de bacteriocinas, para sobreviver e prosperar no ambiente (HAWWER *et al*, 2016).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Salmonelose

A salmonelose é uma doença causada por *Salmonella* spp. (BOYLE, CLIVER 1990) sendo uma das principais doenças transmitidas por alimentos. Dessa forma tem sido foco de discussões nos últimos anos, devido à preocupação mundial com estratégias que permitam seu controle. Mesmo com o aumento da tecnologia, ainda é um problema pertinente e de ocorrência mundial (BOYLE *et al.*, 2007), onde os produtos de origem animal normalmente estão envolvidos por favorecer o desenvolvimento dos microrganismos (MALDONADO, 2008).

Assim vale a pena lembrar que desde a década de 70, a salmonelose tem sido relatada como um problema na saúde pública e animal, no Brasil e no mundo, especialmente em produtos de origem aviária (GOUVÊA *et al.*, 2012).

A contaminação por *Salmonella* spp. ocorre pela ingestão do alimento contaminado (SCHWARTZ, 2000). Elas aderem-se e proliferam no intestino delgado e invadem a mucosa intestinal (VAN ASTEN *et al.*, 2005). A *Salmonella* spp. chega a mucosa intestinal, causa uma patologia gastroentérica e quando a ultrapassa pode causar a doença generalizada (OHL, MILLER, 2001).

Um dos principais alimentos contaminados por *Salmonella* spp. é os derivados de aves, onde a contaminação pode ocorrer desde o processo de criação até o abate mesmo com práticas de higiene adequadas (COLLA, 2012).

A forma que a doença se manifesta em humanos depende da quantidade de células ingeridas, sorovar envolvido e imunidade do doente. As principais manifestações clínicas estão ligadas ao trato digestório, causando vômito, diarreia, cólicas abdominais (COLLA, 2012).

2.2. *Samonella* spp.

Pertencente à família Enterobacteriaceae (GRIMONT, WELL, 2007) são bastonetes gram negativas e móveis na sua maioria. Sua primeira descrição foi em 1885, por Daniel Elmer Salmon um veterinário microbiologista do departamento de agricultura dos Estados Unidos (GAST, 2008). São classificadas em duas espécies *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, pelas suas características bioquímicas. A espécie *Salmonella enterica* é dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* e *hountae* (MCLELLAND *et al.*, 2004), sendo a espécie mais isolada com potencial zoonótico (CAMPOS, 2015).

Já se identificou de 2659 sorovares de *Salmonella* spp., onde 10% já foram isolados em aves. As salmonelas paratíficas se destacam por não serem específica de aves (ISSENHUTH-JEANJEAN *et al.*, 2014).

O isolamento de *Salmonella* spp. em aves e seus subprodutos tem maior ocorrência quando comparado a produtos provenientes de outros animais (ANDREATTI FILHO, 2007). Além disso, a presença de animais portadores assintomáticos facilita a disseminação da *Salmonella* spp. aumentando a ocorrência da contaminação alimentar, mostrando a importância deste agente na saúde pública mundial e por isso medidas de controle devem ser adotadas (SHINOHARA *et al.*, 2008).

O isolamento de *Salmonella* spp. em amostras contaminadas é relativamente difícil, devido ao grande número de outras bactérias, tornando difícil apenas pelo plaqueamento direto em ágar, fazendo-se necessário o uso de caldos de pré-enriquecimento, caldos de enriquecimento seletivo e ágaros seletivos para diferenciação das bactérias, facilitando a identificação e isolamento (D'AOUST, MAURE, 2007).

Nos testes bioquímicos, este gênero fermenta glicose, algumas produzem gás e ácido, utiliza citrato como fonte de carbono e catalase positiva e reduzem nitrato em nitrito (D'AOUST, MAURE, 2007).

Um dos fatores que mantem a *Salmonella* spp. no ambiente é a presença de roedores e aves silvestres, que podem ser reservatórios ambientais (SILVA, DUARTE, 2002). Uma ferramenta alternativa no controle

tem sido a vacinação específica em poedeiras e reprodutoras, no entanto o procedimento mais indicado para o controle é aquisição e produção de lotes livres do agente (SOUZA *et al* 2002).

No ambiente de produção animal é comum encontrar cepas de *Salmonella* spp., por isso seu isolamento é frequente em produtos de origem animal (EFSA, 2014, WHO, 2016). Mesmo com o controle ambiental e a profilaxia com o uso da vacina contra *Salmonella* spp. Assim tornando-se um dos principais agentes envolvidos nas enteroinfecções, resultando em perda de milhões de dólares para a agroindústria (RODRIGUES, 2011).

Para o controle, os antimicrobianos foram utilizados na tentativa de reduzir a disseminação da *Salmonella* spp. nos aviários, porém promoveu o aumento da resistência antimicrobiana e a multirresistência, causando a manutenção de lotes positivos para *Salmonella* spp. (RIBEIRO *et al*, 2008).

Em 1993, a *Salmonella* Enteritidis apareceu como um grande problema para a saúde pública no Brasil. Alguns estudos sugeriram que ela entrou no país via importação de material genético avícola contaminado desde 1962 (HOFER, SILVA FILHO, REIS, 1997, DICKEL, 2004) e o crescimento da produção avícola no Brasil criou condições favoráveis para a manutenção e proliferação nos aviários (SILVA, DUARTE, 2002).

Desde 1996, Nascimento e colaboradores relataram que a *Salmonella* Heidelberg foi um dos sorovares mais isolados em produtos de origem aviária destacando-se por ser um sorovar mais invasivo e preocupante para a saúde pública e para a avicultura, atualmente continua sendo a *Salmonella* enterica mais isolada em produtos avícolas (VELGE, CLOECKAERT, BARROW, 2005).

A *Salmonella* Heidelberg pertence ao grupo de *Salmonellas* paratíficas, causando doença em humanos e em animais. Por elas terem um alto grau de adaptabilidade acabam disseminando e se mantendo nos ambientes (BERNDT *et al* 2007), além disso é uma das principais *Salmonellas* spp. associadas a doença transmitida por alimento em humanos e uma das mais encontradas em aves (FOLEY, LYNNE, 2008).

Vale a pena salientar que dentre as salmoneloses que causam infecção em humanos, a *Salmonella* Heidelberg parece ser a mais invasiva e causar

doenças com maior gravidade que outros sorovares paratíficos (PUBLIC *et al.*, 2007).

2.3. Microbiota intestinal das aves

A microbiota intestinal das aves é um ecossistema complexo, composto por uma grande diversidade de microrganismos benéficos, como as leveduras, fungos, protozoários, vírus e em especial as bactérias que vivem no intestino grosso e delgado, possuindo atividade que influenciam no desenvolvimento das aves (ANDREATTI FILHO, 2007; MAIORKA, 2004; TANNOCK, 1998). Algumas espécies protegem o vilo intestinal e outras auxiliam na regeneração de danos nos vilos (OKAMOTO, ANDREATTI FILHO, 2016).

O sistema digestório das aves recém nascidas é completa anatomicamente, mas funcionalmente incompleto (MURAROLLI, 2008). As aves nascidas em incubatórios, por não terem o contato com a mãe durante a incubação, nascem com uma microbiota incompleta e em formação (MAIORKA *et al.*, 2006)

A formação da microbiota intestinal se inicia pela ingestão de alimentos e pelo contato com o ambiente, podendo ser um fator prejudicial a ingestão de alimentos contaminados, possibilitando a entrada de agentes patogênicos como a *Salmonella* spp. (TORTUERO, 1973; SILVA, ANDREATTI FILHO, 2000; MAIORKA *et al.*, 2006). Nas aves adultas, a microbiota pode chegar a até 500 espécies, variando ao longo do trato gastrointestinal e favorecendo a digestão e protegendo a mucosa intestinal (YAN, POLK, 2004; ITO *et al.*, 2007).

A constituição da microbiota intestinal bacteriana pode ser alterada por fatores internos como alteração na imunidade da ave e externos como alimentos contaminados, e uma das maneiras de controlar estas alterações é com o uso de probióticos (YIN *et al.*, 2010).

2.4. Probióticos

Probióticos foram definidos por Lilly e Stillwell em 1965 como substâncias produzidas por protozoários que induzem o crescimento de outros microrganismos. Já Fuller em 1989 conceituou-os como suplementos de microrganismos vivos que geram benefícios à saúde do hospedeiro (JOHNSON, KLAENHMMER, 2014). Atualmente são definidos como microrganismos vivos, que conferem benefício ao hospedeiro quando administrado em quantidade adequada (JOINT FAO/WHO, 2002).

Os probióticos são utilizados como alimentos funcionais, pois promovem melhoria da saúde do hospedeiro e auxiliam no combate de doenças (SILVA, ANDREATTI FILHO, 2000), bactérias probióticas fazem parte da microbiota normal das aves e são produtos naturais, porém não apresentam todas as ações que os antimicrobianos, mas não geram resíduos nos produtos de origem animal e não estimulam a resistência as drogas utilizadas em humanos (SILVA, ANDREATTI FILHO, 2000). Atuam na microbiota intestinal pela produção de substâncias com ação antimicrobiana, competição por sítio de ligação e estímulo ao sistema imunológico (LEE *et al*, 2010). São utilizados para corrigir disfunções do sistema imunológico, impedir a fixação de microrganismos patogênicos e estabilizar a função da barreira da mucosa intestinal (HOLZAPPELL *et al* 1998).

Diante disso, houve um aumento nas pesquisas de como utilizar produtos alternativos em vez dos antimicrobianos para melhorar a saúde intestinal das aves, obter um desempenho zootécnico acima do esperado, além de auxiliar no controle de doenças como a salmonelose e reduzir a contaminação das bactérias na carcaça de aves (HUYGHEBAERT *et al* 2011) sem o uso do tradicional antimicrobiano. Os probióticos estão sendo utilizados como nova medida bioterapêutica (SOLA- OLADOKUN, CULLINGAN, SLEATOR, 2017).

A principal bactéria probiótica encontrada no mercado e mais utilizada nas aves é os *Lactobacillus* spp., bacilos gram-positivo, variando de bacilos longos e delgados a cocobacilos curtos a maior parte imóvel e não formador de esporos. Este gênero é determinado pela produção de produtos metabólicos e

a grande maioria deles transforma ácido láctico a partir de glicose, sendo o principal produto de fermentação, denominados homofermentador. No entanto algumas espécies são intituladas de heterofermentadoras onde produzem 50% de ácido láctico, quantidades variáveis de CO₂, ácido acético e etanol a partir de glicose (KONEMAN *et al*, 2001).

Os *Lactobacillus* spp. são bactérias probióticas que aumentam a barreira natural do epitélio intestinal contra bactérias patogênicas (FERREIRA *et al* 1998), além disso, os *Lactobacillus* spp. induzem o equilíbrio da microbiota intestinal, onde eles produzem vários metabólitos com ação antimicrobiana, competem por sítios de ligações com bactérias patogênicas, imunomodulação no organismo animal, auxiliam na melhoria da absorção de nutrientes e podem ser utilizados como melhoradores de desempenho animal, auxiliando as aves a enfrentarem diversas condições desfavoráveis (SILVA, ANDREATTI FILHO, 2000; KURITZA, WESTPHAL, SANTIN, 2014).

Alem disso eles possuem um mecanismo de comunicação que podem inibir o crescimento de bactérias patogênicas (NADER DE MARCIAS *et al*, 1993).

2.5. Comunicação bacteriana

Em 1994, Fuqua e colaboradores descreveram o mecanismo *quorum sensing* como uma comunicação bacteriana, por meio de moléculas sinalizadoras liberadas no ambiente durante a sua multiplicação.

As bactérias utilizam este mecanismo de sinalização célula- célula para detectar alterações nas concentrações das moléculas sinalizadoras no ambiente (WATERS; BASSLER, 2005; READING; SPERANDIO, 2006), que são secretadas por células individuais e chamadas de filtrados e reconhecidas por receptores específicos (GRIFFITHS, 2005), ocasionando a modificação do comportamento bacteriano, resultando em resposta coletiva, a qual regula atividade fisiológica que pode ser vantajosa como, mudança para um ambiente com maior oferta de nutriente, formação de biofilme que confere proteção contra ação do ambiente, monitoria da densidade populacional, expressão gênica de fatores de virulência, a produção de bacteriocinas com atividade

antimicrobiana e a esporulação, isso tudo para sobreviver (HAWVER *et al*, 2016).

O reconhecimento dessas substâncias ocorre pelo aumento das mesmas no ambiente, onde as bactérias produzem e liberam no meio externo para o reconhecimento os filtrados, assim regulando atividades fisiológicas (MILLER, BASSLER, 2001; SOLA *et al*, 2012).

Algumas bactérias são capazes de produzir bacteriocinas, que são substâncias com capacidade de inibir o crescimento ou inativar outras bactérias, ocorrendo pelo mecanismo de *quorum sensing* (RUMJANEK, FONSECA, XAVIER, 2004), pela comunicação de bactérias do mesmo gênero e diferentes gêneros (GRIFFITHS, 2005).

3. OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi produzir um filtrado proveniente de *Lactobacillus* spp. padrão (ATCC) para estimular outros presentes na microbiota intestinal de frangos de corte na inibição da *Salmonella* Heidelberg.

3.1. Objetivo específico *in vitro*

Isolar e identificar *Lactobacillus* spp. de frangos de corte saudáveis

Produzir o filtrado de sete *Lactobacillus* spp. (ATCC)

Sensibilizar os *Lactobacillus* spp. isolados de frango de corte com os filtrados, na inibição da *Salmonella* Heidelberg.

3.2. Objetivo específico *in vivo*

Avaliar o controle da *Salmonella* Heidelberg com o uso de *Lactobacillus* spp. isolado de frango de corte, em associação ou não com o filtrado.

REFERÊNCIAS

ANDREATTI FILHO, R.L. Paratifo aviário. Saúde aviária e doenças. São Paulo: Roc, p. 96- 111, 2007.

BASSANI,J. Eficácia de sanitizantes e susceptibilidade antimicrobiana de *Salmonella* Heidelberg isoladas de fontes avícolas em 2006 e 2016. . Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 66f. Porto Alegre, BR-RS, 2017.

BERCHIERI JR, A. Salmonellose Aviária. In: Berchieri Júnior, A.; Macari, m. Doença das aves, Campinas: Facta, 2000. Cap 4, p. 185-195.

BERNDT, A.; WILHELM, A.; JUGERT, C.; PIEPER, J.; SACHSE, K.; METHNER, U. Chicken cecum immune response to *Salmonella* enterica serovars of different levels of invasiveness. Infection and Immunity, v. 75, n. 12, p. 5993-6007, 2007.

BOYLE, E.C; BISHOP, J.L; GRASSL, G.A.; FINLAY, B.B. *Salmonella*: from pathogenesis to therapeutics. J. Bacteriol. Mar; v. 189, ed. 5, p.1489–1495. 2007.

CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). Microbiologia. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015, p. 351-360.

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. 79(4):603-606 2012.

D'AOUST, J.Y.; MAURER, J. *Salmonella* species. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R. (Ed). *Food Microbiology: Fundamentals and Fontiers*. Washington: ASM Press, 2007.

DICKEL, E.L. Utilização da técnica microbiológica convencional, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de *Salmonella* em carcaças de frango para o controle higiênico sanitário do processo de abate. 2004. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

DOYLE, M.P.; CLIVER, D.O. *Salmonella*. In: CLIVER, D.O. (Ed.). *Foodborne Diseases*. London: Academic Press, 1990. p.185-201.

EFSA. European Food Safety Authority. EFSA explains zoonotic diseases: *Salmonella*. 2014. Disponível em: <
[http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/factshe
etsalmonella.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/factsheets/salmonella.pdf) > Acesso em 05 de maio de 2019.

FERREIRA, A.J.P.; FERREIRA, C.A.; PETRELLA NETO, R.; OLIVEIRA, D.R.; NUREMBERGER JUNIOR, R.; LOPES, V.C.B.A. Probiotics: benefits and efficiency in poultry production. *Arqs Inst. Biológico*, São Paulo, 65:139-49. 1998.

FOLEY, S.L; LYNNE, A.M. Food animal-associated *Salmonella* challenges, pathogenicity and antimicrobial resistance. *Journal of Animal Science*, v. 86, p. 173- 187, 2008.

FRANCO, A.S.M. Avicultura no Brasil. *ANÁLISE CONJUNTURAL*, v.39, n.1-2/jan./fev. 2017 Disponível em:
http://www.ipardes.gov.br/biblioteca/docs/bol_39_1_c.pdf acessado em 01.05.2019

FULLER , R. Probiotics in man and animals: a review. J. of Appl. Bacteriol. v.66, p. 365-378, 1989

FUQUA, W.C.; WINANS, S.C.; GREENBERG, E.P. (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density LuxI family of cell density-responsive transcripti responsive transcriptional regulators. onal regulators. J. Bacteriol., 176:269 176:269-275. Fuqua, W.C.; Winans, S.C.; Greenberg, E.P. (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density LuxI family of cell density-responsive transcripti responsive transcriptional regulators. onal regulators. J. Bacteriol., 176:269 176:269-275.

GAST, R.K. Salmonella infections. In: SAIF, Y. M. (Ed.). Diseases of Poultry. 12 ed. Iowa: Blackwell p. 619-631. 2008.

GRIFFITHS,M. Quorum sensing. In: M. Griffiths. Understanding pathogen behaviour: virulence, stress response and resistance. Woodhead.Cap.22, p.580-640. July 2005.

GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F.X. Antigenic formulae of the *Salmonella* Serovars. 9th ed. Paris: Institut Pasteur. WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*. 2007.

HAWVER, L.A.; JUN G, S.A.; Ng,Wai-Leung.Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems. Federaton of European Microbiological Societies. Microbiology Reviews, v. 40, n.5, p. 738–752, 2016.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 17, n. 2, p. 55-62, jun. 1997.

HOLZAPFEL, W.H. et al. Overview of gut fl ora and probiotics. International Journal of Food Microbiology, v.41, p.85-101, 1998.

HUYGHEBAERT, G. et al. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Veterinary Journal*, v.187, p.182-188, 20

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; DE PINNA, E.; NAIR, S.; FIELDS, P. I.; WEILL F. X. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, Paris, v. 165, n. 7, p. 526-530, 2014

ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; OKABAYASHI, S. M. Saúde intestinal em frangos de corte. *Aviagen Brasil*. 2007. Disponível em: Acesso em: 25 de agosto de 2018

JOINT FAO/WHO Food and Agricultural Organization/World Health Organization *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London, 11 p.Ontario, Canada. April 30 and May 1, 2002.

JOJNSON, B.R.; KLAENHAMMER, T.R. Impact of the field of probiotic research: histotical perspectives to modrn paradigms. *Antonie van Leeuenhoek*. p. 141-156. 2014.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN Jr., W.C. *Diagnóstico Microbiológico. Texto e Atlas colorido*. Ed Guanabara K oognan S.A. p. 679 -680 Rio de Janeiro. 2001.

KURITZA, L.N.; WESTPHAL, P.; SANTIN, E. Próbiótico na avicultura. *Cienc. Rural* vol.44 no.8 Santa Maria, 2014.

LEE, K. et al. Direct-fed antimicrobials and their impact on the intestinal microflora and immune system of chickens. *Journal of Poultry Science*, v.47, p.106-114, 2010. Disponível em: . Acesso em: 10 fev. 2012. doi: 10.2141/jpsa.009096

LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics. Growth promoting factors produced by micro- organisms. Science, v.147, p.747-748, 1965. Disponível em: . Acesso em: 07 fev. 2012. doi:10.1126/science.147.3659.747.

McCLELLAND, M.; SANDERSON, K.E.; SPIETH, J.; CLIFTON, S.W.; LATREILLE, P.; COURTNEY, L.; PORWOLLIK, S.; ALI, J.; DANTE, M.; DU, F.; HOU, S.; LAYMAN, D.; LEONARD, S.; NGUYEN, C.; SCOTT, K.; HOLMES, A.; GREWAL, N.; MULVANEY, E.; RYAN, E.; DOM, H.; FLOREA, L.; MILLER, W.; STONEKING, T.; NHAN, M.; WATERSTON, R.; WILSON, R.K. Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2. Letters to Nature [online], v.413, p.852–856, 2001. Disponível em: <http://www.nature.com/nature/journal/v413/n6858/pdf/413852a0.pdf> Acesso em: 20 12. 2018..

MAIORKA, A. Impacto da saúde intestinal na produtividade avícola. In: V Simpósio Brasil Sul de Avicultura. Anais. Chapecó, 2004, p. 26-41.

MAIORKA, A.; DAHLKE, F.; MORGULIS, M.S.F.A. Broiler adaptation to post-hatching period. Ciência Rural. Santa Maria, v. 36, n. 2, 2006.

MALDONADO, A. G. Ocorrência de Salmonella spp em amostras de carcaças e miúdos de frango obtidos em uma feira e um mercado municipal na zona oeste da cidade de São Paulo: Análise crítica entre a técnica convencional em meios de cultivo e reação em cadeia pela polimerase – PCR. 2008. 75 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MARCHI, D.M.; BAGGIO, N.; TEÓ, C.R.P.A.; BUSATO, M.A. Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos no Município de Chapecó, Estado de Santa Catarina, Brasil, no período de 1995 a 2007. Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília, 20(3):401-407, jul-set 2011

MEDINA-SAAVEDRA, T.; ARROYO-FIGEUIROA, G.; HERRERA-MÉNDEZ, C.; MEXICANO- SANTOYO, L. *Bacillus subtilis* as a probiotic in poultry farming: relevant aspects in recent research. *Abanico vet* vol.7 no.3 Tepic sep./dic. 2017.

MENDONÇA, E.P. Característica de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no Brasil. Tese para obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinária pela Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2016.

MILLER, M.B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* v.55: p.165-199, 2001.

MURAROLLI, V.D.A. Efeito de probiótico, prebiótico e simbiótico sobre o desempenho, morfologia intestinal e imunidade de frangos de corte. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias da Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP. 101p. 2008.

NADER DE MACIAS, M.E.; ROMER, M.E.; APELLA, M.C.; GONZALES, S.N.; OLIVER, G. Prevention of infectious diarrhea produced by *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by feeding fermentation milk with lactobacilli. *J. Food Prot.*, v. 56, p. 401-405, 1993.

NASCIMENTO, V.P.; SANTOS, L.R.; CARDOSO, M.O. Qualidade microbiológica dos produtos avícolas. II Simpósio Goiano de Avicultura da Associação Goiana de Avicultura e Escola de Veterinária da UFG, p. 13-17, 1996.

OHL, M.E.; MILLER, S.I. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annual Review Medical*[online], v.52, p.259-274, 2001. Disponível em:

[https://www.scirp.org/\(S\(i43dyn45teexjx455qlt3d2q\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1163855](https://www.scirp.org/(S(i43dyn45teexjx455qlt3d2q))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1163855) Acesso em: 01.05.2019

OKAMOTO, A.S. ANDREATTI FILHO, R.L. Probiotics: Reality of benefits for life, a review. *International Journal of Probiotics and Prebiotics* 11(1):7-14 · February 2016.

PATRICIO, I.S. Avicultura em perspectiva evolutiva. *Rev. Avicultura industrial*. N. 04 p. 38-39. 2015. Disponível em <https://www.aviculturaindustrial.com.br/imprensa/avicultura-em-perspectiva-evolutiva/20180126-155305-l016> acesso 05 de maio de 2019.

Public Health Agency of Canada. 2007. *Salmonella Heidelberg – Ceftiofur-Related Resistance in Human and Retail Chicken Isolates*. Acessado em 10 de fevereiro, 2019. <http://www.phac-aspc.gc.ca/cipars-picra/heidelberg/heidelberg-eng.php>

READING, N.C.; SPERANDIO, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, v. 254 ,p.1–11, 2006.

RIBEIRO ,A.R.; KELLERMANN ,A.; SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P. Resistência antimicrobiana de *Salmonella enteritidis* isoladas de amostras clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes pesadas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* , Belo Horizonte. Vol. 60, n.5 (out. 2008), p. 1259-1262.

RODRIGUES, D. P. Perspectivas atuais e falhas no diagnóstico antigênico de *Salmonella* spp.: importância no reconhecimento dos sorovares circulantes, emergentes e exóticos. In: *Memoria del Seminário Internacional sobre Salmonelose Aviar*, 2011, Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro, p. 1-7. 2011

RUMJANEK, N.G.; FONSECA, M.C.C.; XAVIER, G.R. Quorum Sensing em sistemas agrícolas. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Ed. 33 p. 35 - 50 Julho/Dezembro 2004.

SCHULTZ, M.; MUNRO, K.; TANNOCK, G.W.; MELCHNER, I.; GOTIL, C.; SCHWIETZ, H.; SCHOLMERICH, J.; RATH, H.C. Effects of feeding a probiotic preparation (SIM) containing insulin on the severity of colitis and on the composition of the intestinal microflora in HLA-B27 transgenic rats. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 11:581-587. 2004.

SCHWARTZ, K.J. Salmonellosis in: STRAW, B.E.; D'ALLAIRES, S.; MENGELING, W.L.; TAYLOR, D.J. Disease Swine. 8th ed. Ames: Iowa University Press, 2000

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. Rev. Bras. Cienc. Avic. vol.4 no.2 Campinas May 2002.

SILVA, E. N.; ANDREATTI FILHO, R. L. Probióticos e prebióticos na avicultura. IN: II Simpósio de Sanidade Avícola. Santa Maria, 2000.

SHINOHARA, N.K.S.; BARROS, V.B.; JIMENEZ, S.M.C.; MACHADO, E.C.L.; DUTRAS, R.A.F.; LIMA FILHO, J.L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. Ciênc. saúde coletiva vol.13 n.5 Rio de Janeiro Sep./Oct. 2008.

SOLA- OLADOKUN, B.; CULLIGAN, E.P; SLEATOS, R.D. Engineered Probiotics: Applications and Biological Containment. Annu. Rev. Food Sci Technol.p. 8.16,1-16.18. 2017.

SOLA, M.C.; OLIVEIRA, A.P.; FEISTEL, J.C.; REZENDE, C.S.M. Mecanismo de Quorum Sensing e sua relevância na microbiologia de alimentos.

Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, N.14; p.1 4 a 1 9 – 2012.

SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; BASTOS, R.R. et al. Avaliação de associações e similaridades em epidemiologia veterinária por meio da análise de correspondência. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.54, p.539-542, 2002.

TANNOCK, G. W. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. International Dairy Journal, Barking, v. 8, n. 5-6, p. 527-533, 1998.

TORTUERO, F. Influence of the implantation of *Lactobacillus acidophilus* in chicks on the growth, feed conversion, malabsorption of fats syndrome and intestinal flora. Poultry Science. Madrid, v.52, p.197-203, 1973.

UBABEF. Resultados da avicultura brasileira em 2010. 2011. Disponível em: <https://www.aviculturaindustrial.com.br/imprensa/resultados-da-avicultura-brasileira-em-2010/20110113-133232-G124>. Acesso em: 09.05.2019.

VAN ASTEN, A.J.A.M.; KONINKX, J.F.J.G.; VAN DIJK, J.E. Salmonella entry: M cells versus absorptive enterocytes. Veterinary Microbiology [online], v.108, p.149-152, 2005.

VELGE, P., CLOECKAERT, A., BARROW, P. Emergence of Salmonella epidemics: The problems related to Salmonella enterica serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. Vet. Res. v. 36, p. 267-288, 2005.

WATERS C.M.; BASSLER B.L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. Annu Rev Cell Dev Biol 2005, v.21, p. 319-346, 2005.

WHO. World Health Organization. Salmonella (non-typhoidal). 2016. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/> > Acesso em: dez. 2016.

YAN, F.; POLK, D.B. Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. *Current Opinion Gastroenterology*. Nashville, v. 20, p. 565–571, 2004.

YIN, Y.; LEI, F.; LIVIYING, Z.; Li, S.; WU, Z.; ZHANG, R.; GAO, G. F.; ZHU, B.; WANG, X. Exposure of different bacterial inocula to newborn chicken affects gut microbiota development and ileum gene expression. *Isme Journal*. Beijing, v. 4, p. 367–376, 2010.

CAPÍTULO 2

***Quorum Sensing* entre *Lactobacillus spp.* *in vitro* e *in vivo* contra *Salmonella* Heidelberg em frangos de corte.**

DESCRIÇÃO DO PROBLEMA

Salmonelose é uma doença causada pela bactéria *Salmonella* spp. (DOYLE, 1990). É transmitida por alimentos (BOYLE *et al.*, 2007), estando presente no Brasil desde a década de 70, principalmente nos produtos de origem aviária (GOUVÊA *et al.*, 2012).

Após a ingestão do alimento contaminado (SCHWARTZ, 2000), elas aderem-se e proliferam no intestino delgado, invadindo a mucosa intestinal (VAN ASTEN *et al.*, 2005). O curso da doença depende da quantidade ingerida e da patogenicidade da *Salmonella* spp., mas causam patologia gastroentérica podendo evoluir para doença generalizada e levar à morte (OHL e MILLER, 2001).

Pertencente à família Enterobacteriaceae (GRIMONT, WELL, 2007) são gram negativas, de formato bacilar e a sua maioria móveis. Já se conhece 2659 sorovares de *Salmonella* spp. dentre eles destacam-se as paratíficas (ISSENHUTH-JEANJEAN *et al.*, 2014) por não serem específicas de aves, oferecem maior risco para contaminação humana (BERCHIERI JR, 2000).

E quando se compara a origem dos alimentos, os derivados de aves tem uma maior prevalência em estar contaminados com a *Salmonella* spp. que pode ocorrer da cria até o abate (COLLA, 2012; ANDREATTI FILHO, 2007). Um dos fatores que perpetuam a *Salmonella* spp. no ambiente é a presença de animais portadores assintomáticos facilitando a sua disseminação.

Isso mostra a importância deste agente na saúde pública mundial e por isso medidas de controle devem ser adotadas (SHINOHARA *et al.*, 2008). Por isso o ideal, no ponto de vista epidemiológico é a aquisição de lotes de animais livres de *Salmonella* spp. (SOUZA *et al.* 2002). A *Salmonella* spp. resulta em uma perda de milhões de dólares para a agroindústria (RODRIGUES, 2011). E para reduzir a ocorrência de *Salmonella* spp. começou o uso de antimicrobianos nas aves, assim promovendo o aumento da resistência antimicrobiana e a multirresistência causando a manutenção de lotes positivos para *Salmonella* Enteritidis (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Alguns estudos sugeriram que ela entrou no país via importação de material genético avícola contaminado, e o crescimento da produção avícola no

Brasil criou condições favoráveis para a manutenção e proliferação nos aviários (SILVA, DUARTE, 2002). Atualmente a *Salmonella* enterica sorotipo Heidelberg é um dos patógenos mais isolados de produtos avícolas onde é o mais invasivo, emergente e preocupante para a saúde pública e para a avicultura (VELGE, CLOECKAERT, BARROW, 2005).

A *Salmonella* Heidelberg é uma *Salmonella* paratífica, e se dissemina rapidamente, pois tem um alto grau de adaptabilidade (BERNDT *et al* 2007), sendo uma das principais *Salmonellas* spp. associadas a doença transmitida por alimento em humanos e uma das mais encontradas em aves (FOLEY, LYNNE, 2008).

E como a *Salmonella* Heidelberg é isolada frequentemente de produtos avícolas, é de extrema importância entender como é a microbiota das aves, pois a microbiota intestinal das aves é um ecossistema complexo que possui atividade que influencia no desenvolvimento (TANNOCK, 1998; MAIORKA, 2004; ANDREATTI FILHO, 2007). As aves que nascem em incubatórios, não tem contato com a mãe então nascem com uma microbiota incompleta, onde sua formação ocorre pela ingestão de alimentos e pelo contato com o ambiente, podendo ser um fator prejudicial na digestão de alimentos contaminados possibilitando a entrada de agentes patogênicos como a *Salmonella* spp. (TORTUERO, 1973; SILVA, ANDREATTI FILHO, 2000; MAIORKA *et al.*, 2006).

Um dos microrganismo presente na microbiota natural das aves é bactéria com ação de probiótico e conceituado como microrganismos vivos que geram benefícios a saúde do hospedeiro (JOHNSON, KLAENHAMMER, 2014). Eles não apresentam todas as ações que os antimicrobianos, mas não geram resíduos nos produtos de origem animal e não estimulam a resistência as drogas utilizadas em humanos (SILVA, ANDREATTI FILHO, 2000). Essas bactérias probióticas atuam na microbiota intestinal por meio de produção de substâncias com ação antimicrobiana, competição por sítio de ligação e estímulo do sistema imunológico (LEE *et al*, 2010) e são utilizados para corrigir disfunções do sistema imunológico, impedir a fixação de microrganismos

patogênicos e estabilizar a função da barreira da mucosa intestinal (HOLZAPPELL *et al* 1998).

E com todos esses benefícios estão sendo utilizados como medidas alternativas ao uso de antimicrobianos (HUYGHEBAERT *et al* 2011). Entre eles se destacam os *Lactobacillus* spp., bacilos gram-positivos, não esporulados, de formato bacilar, variando de bacilos longos e delgados a cocobacilos curtos e a maior parte é imóvel. Os *Lactobacillus* spp. utilizam do mecanismo de *quorum sensing* para a comunicação bacteriana, por meio de moléculas sinalizadoras os filtrados, liberadas e reconhecidas no ambiente durante a sua multiplicação (GRIFFITHS, 2005), assim resultando em resposta coletiva a qual regula atividade fisiológica como formação de biofilme, monitoria da densidade populacional, expressão gênica, fatores de virulência, produção de bacteriocinas, esporulação e bioluminocência (HAWVER *et al*, 2016).

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

As amostras de *Lactobacillus* spp. foram coletadas de 50 aves, machos, saudáveis, com 34 dias de idade da linhagem Cobb, localizado no município de Piratininga- SP, as amostras de *Lactobacillus* spp. foram colhidas com auxílio de suabe estéril, armazenado em meio Stuart e enviados ao laboratório.

Salmonella Heidelberg e os *Lactobacillus* spp. de referências (ATCC) (Tabela 1) são provenientes da bacterioteca do laboratório de Ornitopatologia (FMVZ UNESP- Botucatu).

As amostras dos *Lactobacillus* spp. de referências (ATCC) são resistentes aos antimicrobianos

TABELA 1 *Lactobacillus* spp. de referências (ATCC)

1	<i>L. acidophilus</i>	ATCC 4356
2	<i>L. casei</i>	ATCC 393
3	<i>L. delbrueckii</i>	ATCC 7830
4	<i>L. fermentum</i>	ATCC 9338
5	<i>L. helveticus</i>	ATCC 15009
6	<i>L. reuteri</i>	ATCC 23272
7	<i>L. salivarius</i>	ATCC 11742

Cultivo das amostras

Os *Lactobacillus* spp. foram cultivados em meio de Man Rogosa and Sharpe (MRS), a 37°C durante 24 horas.

A *Salmonella* Heidelberg foi cultivada em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) a 37°C por 24 horas.

Identificação dos *Lactobacillus* spp.

Teste fenotípico

As colônias sugestivas de *Lactobacillus* spp. foram submetidos a coloração de Gram, selecionando-se apenas bacilos gram positivos. Em seguida foram realizados o teste de catalase, produção de gás em glicose e produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) em *triple sugar iron* (TSI).

Biologia molecular

Os isolados positivos para *Lactobacillus* spp. no teste bioquímico e coloração de gram foram confirmados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A extração de DNA foi realizada pelo kit de extração E.Z.N.A.[®] Bacterial DNA Kit segundo as recomendações do fabricante. Para a amplificação do ácido nucleico foi utilizado 1,25 µl de cada primer, 5 µl de água ultrapura, 5 µl da amostra de DNA e 12,5 µl de Go Taq Green Master Mix (Promega[®]) segundo as recomendações do fabricante. Os *primers* que foram utilizados para a amplificação da região 16S/23S foram pesquisados no banco de dados (www.ncbi.nlm.nih.gov) e analisados no OligoAnalyzer (Tabela 2).

TABELA 2 Sequência, condições e referências dos primers utilizados na identificação dos *Lactobacillus* spp.

Primers	Condições	Referência
F: CTTGTACACACCGCCCGTCA	95 ° C/ 5 min	Dubernet et al., 2002.
	95 ° C/ 30s	
R: TCAAACTAAACAAAGTTTC	55°C/30s	
	72°C/30s	
	72°C/7min	

Experimento *in vitro*

Teste de antagonismo *Spot on the Lawn*

Após a identificação das bactérias do gênero *Lactobacillus* isolados, os mesmos foram submetidos ao teste de antagonismo em placa. Os *Lactobacillus* spp. isolados foram cultivados em caldo MRS a 37°C até atingir turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland, correspondendo a aproximadamente a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Subsequente 10µL de cada amostra foram semeados em forma de pontos em placa contendo 20mL de ágar MRS e incubados durante 24 horas a 37°C. Concomitantemente foi preparado o inóculo da *Salmonella* Heidelberg em caldo BHI na temperatura de 37°C até atingir a turvação 0,5 na escala de McFarland (10^8 UFC/ml). Posteriormente foram preparados 15mL de caldo BHI a 0,75% de Agar Agar e acrescentados 150µL do cultivo de *Salmonella* Heidelberg descrito anteriormente, sendo vertido sobre a placa contendo os *Lactobacillus* spp já cultivados, após solidificação do meio, novamente incubado a 37°C durante 24 horas e após foi realizado a leitura dos halos de inibição.

Preparo do filtrado

No preparo do filtrado os mesmos sete *Lactobacillus* sp. (ATCC) foram cultivados em caldo MRS e a *Salmonella* Heidelberg cultivada em caldo BHI, todos durante 24 horas a 37°C, em seguida homogeneizados na proporção de 1:1 (100µL do cultivo de cada *Lactobacillus* spp. (ATCC) e 100µL do cultivo da *Salmonella* Heidelberg já cultivados por 24 horas a 37°C, em 2ml de BHI mais MRS (1:1). Subsequente foram transferidos 100µL em caldo MRS (Nal/Rif) para a eliminação da *Salmonella* Heidelberg durante 24 horas a 37°C, em seguida 100 µL destes caldos foram semeados em caldo MRS e novamente incubados a 37°C por um período de 24 horas para a retirada de possíveis resíduos de antimicrobianos e finalizando, foi realizada a esterilização por filtração em membrana de nitrocelulose com poro de 0.22µm gerando sete filtrados.

Cultivo das amostras com filtrado

Cada um dos *Lactobacillus* spp. isolados foram incubados separadamente com os sete filtrados.

Foram dispostos 500µL do filtrado individualmente, 500µL MRS e mais 300µL de cada *Lactobacillus* spp. isolados em tubo plástico descartável de 2 ml e incubados à 37°C durante 24 horas. Depois de incubadas com os filtrados as amostras foram avaliadas novamente pelo teste de antagonismo *Spot-on-the-Lawn*, já descrito anteriormente, para comparação dos halos de inibição da mesma amostra de *Lactobacillus* spp. isolado antes e após o contato com os filtrados.

Experimento *in vivo*

Aves

Foram utilizados 140 pintos machos da linhagem Cobb de um dia de idade, provenientes de incubatório comercial com certificação de livres de *Samonella* spp. Os pintos foram alojados aleatoriamente em quatro grupos de 35 cada, gaiolas com aquecimento, água e ração à vontade. Antes de iniciar o experimento cinco aves foram eutanasiadas para verificar a ausência da *Salmonella* spp.

Local

O experimento foi realizado no infectório do Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (FMVZ-UNESP), Campus de Botucatu, São Paulo.

Comissão de ética

O protocolo experimental foi submetido e aprovado (Protocolo CEUA 0027/2018) pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ, de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Delineamento experimental

Os grupos foram divididos da seguinte maneira:

SH: Controle (sem tratamento)

Lacto: Recebeu o *Lactobacillus* spp. no primeiro dia de idade.

Filtrado: Recebeu somente o filtrado no segundo dia de idade.

Lacto + filtrado: Recebeu o *Lactobacillus* spp. no primeiro dia de idade e o filtrado no segundo dia de idade.

O filtrado selecionado foi o que induziu maior halo de inibição frente a *Salmonella* Heidelberg no teste *in vitro*. Cada ave recebeu 1mL do respectivo tratamento diretamente no ingluvírio com auxílio da agulha de gavagem.

O inóculo de *Lactobacillus* spp. foi preparado com o isolado que foi selecionado após a análise estatística, escolhendo o que obteve melhor resultado *in vitro* contra *Salmonella* Heidelberg em contato com o filtrado, esse isolado foi incubado a 37°C durante 24 horas em caldo MRS, até atingir a turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland.

Desafio com *Salmonella* Heidelberg

No terceiro dia de idade todas as aves de todos os grupos experimentais foram desafiadas com o inóculo de *Salmonella* Heidelberg (Nal/Rif). Foi cultivada em caldo BHI na temperatura de 37°C, correspondente à $2,3 \times 10^9$ UFC/mL.

O inóculo desafio foi administrado em dose única de 1mL por ave diretamente no ingluvírio com auxílio da agulha de gavagem.

Colheita das amostras

Dez aves de cada grupo foram eutanasiadas pelo método de deslocamento cervical, em seguida colhidos os conteúdos dos cecos individualmente. As colheitas foram realizadas com 24, 96, 168 horas após o desafio, de forma asséptica em sacos plásticos estéreis mantendo sob refrigeração até o momento do processamento.

Contagem da *Salmonella* Heidelberg

A contagem da *Salmonella* Heidelberg foi realizada das amostras colhidas, com diluição em phosphate buffered saline (PBS) na proporção de 1:10, sendo oito diluições decimais seriadas. De cada diluição foi semeada 0,1mL em placas contendo Ágar Verde Brilhante (AVB) com Nal e Rif (100µg/mL) e espalhadas com ajuda de uma alça de Drigalski esteril e incubadas por 24 horas a 37°C. Em seguida foram realizadas contagem de unidades formadoras de colônia por grama de ceco (UFC/gr).

Biossegurança

Toda manipulação no laboratório com as amostras de *Salmonella* Heidelberg, bem como dos reagentes e produtos químicos empregados para a execução das técnicas laboratoriais, foram realizadas utilizando dispositivos de biossegurança disponíveis no Laboratório de Ornitopatologia UNESP/FMVZ – Botucatu, como luvas de manipulação e máscaras descartáveis, equipamentos de proteção individual específico para cada tipo de manipulação, pipetadores automáticos e ponteiros com proteção para aerossóis, material plástico descartável, uso de capela de exaustão e de fluxo laminar para manipulação de produtos químicos, eliminação de material biológico e produtos tóxicos em “lixo hospitalar” para destruição de forma apropriada e esterilização por autoclave de todo material contaminado com bactérias.

RESULTADOS

No teste fenotípico das 50 (cinquenta) amostras colhidas apenas as amostras com características compatíveis com *Lactobacillus* spp. foram selecionadas. Dessas amostras 37 (trinta e sete) apresentaram se como bacilo gram positiv., foram submetidas a prova de catalase, onde apenas 27 se mostraram negativas. As 27 amostras negativas passaram pelas seguintes provas: de produção de gás em glicose e produção de H₂S em TSI positiva, em que 25 amostras foram compatíveis com as características de *Lactobacillus* spp. (KONEMAN *et al*, 2001).

Das 25 amostras compatíveis com *Lactobacillus* spp. no teste fenotípico, foram conferidas por prova molecular Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), segundo a referência de Dubernet e colaboradores (2002), onde foram confirmados 20 amostras para o gênero *Lactobacillus* spp.

Como relata Adak e colaboradores (2011) vem sido descrito um aumento na da multirresistência bacteriana em decorrência do uso de antimicrobiano de maneira indiscriminada. Em contra partida está sendo desenvolvida pesquisas relacionas ao mecanismo de *quórum sensing* para fins terapêuticos. Com essas pesquisas espera-se que possamos elucidar como o mecanismo funciona se atua individualmente ou de forma sinérgica com outros produtos.

Os resultados do teste *Spot on the Lawn* foram mensurados em halos de inibição que podem ser visualizados na figura 4. Demonstrando assim a inibição dos isolados de *Lactobacillus* spp. frente ao contato com os filtrados das cepas de *Lactobacillus* spp. controle (ATCC) contra a *Salmonella* Heidelberg.

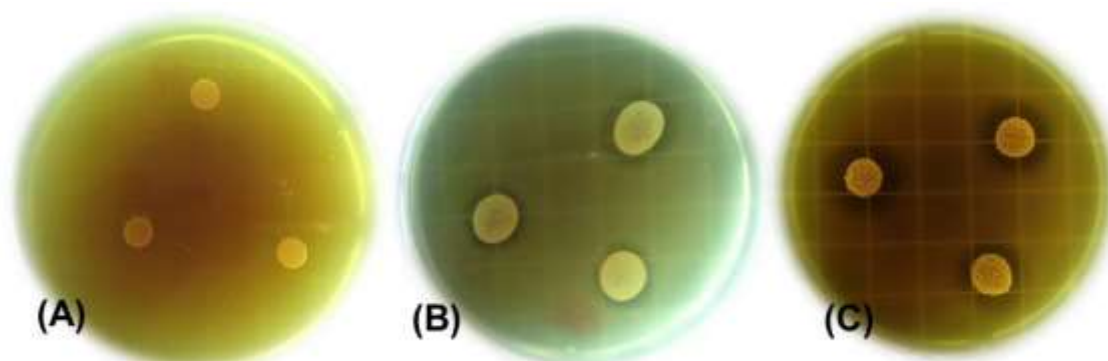


FIGURA 1: Teste Spot on the Lawn. (A) *Lactobacillus* spp. não inibiu o crescimento da *Salmonella* Heidelberg. (B) *Lactobacillus* spp. com pouca inibição da *Salmonella* Heidelberg. (C) *Lactobacillus* spp. com halo de inibição significativo frente a *Salmonella* Heidelberg.

Foi realizado o contato dos 20 *Lactobacillus* spp. com todos os sete filtrados dos *Lactobacillus* spp. de referência (ATCC) (Tabela 3)

TABELA 3 Resultados expressos em média (mm) e desvio padrão de halos de inibição do *Lactobacillus* spp (isolados). contra *Salmonella* Heidelberg.

	Média	Desvio padrão
Sem Contato	0,190 ± 0,216	
filtrado1	0,408 ± 0,261 a	<0,001
filtrado2	0,278 ± 0,305 b	0,071
filtrado3	0,322 ± 0,282 ab	0,005
filtrado4	0,355 ± 0,198 ab	<0,001
filtrado5	0,405 ± 0,166 a	<0,001
filtrado6	0,280 ± 0,265 b	0,044
filtrado7	0,295 ± 0,209 b	0,008
P	0,004	

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey.

Foi realizado o teste t (Student) para comparação da quantidade de halos de inibição das amostras sem contato com a *Salmonella* Heidelberg em relação a cada filtrado ($P < 0,05$). Também foi realizada análise de variância para verificação de diferenças nas quantidades de halos de inibição entre os filtrados avaliados ($P < 0,05$). As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

Apenas o filtrado2 não apresentou diferença estatística significativa na indução de halos de inibição, ou seja, não houve diferença estatística entre os valores encontrados nas amostras sem contato e os das amostras em contato com esse filtrado.

Comparando os 7 filtrados, o 1 e 5 obtiveram os maiores valores de halos de inibição em relação aos filtrados 2, 6 e 7. Os filtrados 3 e 4 não diferiram dos demais.

Foi realizada análise de variância para comparação dos 20 isolados dentro de cada filtrado separadamente ($P < 0,05$) (Tabela 4). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

TABELA 4 Média em milímetros dos halos de inibição de todos *Lactobacillus* spp. isolados cultivados com todos os filtrados contra *Salmonella* Heidelberg.

Lactobacillus spp. isolados	Filtrado 1	Filtrado 2	Filtrado 3	Filtrado 4	Filtrado 5	Filtrado 6	Filtrado 7
1 (0,0)	0,7 ab	0,5 abc	0,5 c	0,7 ab	0,5 bc	0,5 c	0,7 a
2 (0,0)	0,1 gf	0,1 bc	0,8 a	0,1 gh	0,6 b	0,6 b	0,7 a
3 (0,3)	0,0 h	0,0 c	0,0 e	0,3 ef	0,3 de	0,0 g	0,0 h
4 (0,2)	0,7 ab	0,6 ab	0,8 a	0,4 de	0,9 a	0,7 a	0,3 d
5 (0,0)	0,0 h	0,0 c	0,0 e	0,3 ef	0,2 ef	0,0 g	0,2 e
6 (0,0)	0,3 ef	0,0 c	0,0 e	0,4 de	0,3 de	0,0 g	0,3 d
7 (0,1)	0,8 a	0,1 bc	0,4 cd	0,8 a	0,3 de	0,5 c	0,5 b
8 (0,1)	0,7 ab	0,6 ab	0,6 b	0,3 ef	0,5 bc	0,1 f	0,0 h
9 (0,1)	0,2 fg	0,4 abc	0,1 e	0,3 ef	0,1 f	0,3 e	0,1 g
10 (0,1)	0,4 de	0,6 ab	0,1 e	0,2 fg	0,4 cd	0,0 g	0,2 f
11 (0,8)	0,2 fg	0,0 c	0,0 e	0,2 fg	0,4 cd	0,0 g	0,3 d
12 (0,3)	0,4 de	0,4 abc	0,0 e	0,4 de	0,4 cd	0,5 c	0,4 c
13 (0,0)	0,0 h	0,0 c	0,0 e	0,0 h	0,4 cd	0,7 a	0,4 c
14 (0,2)	0,4 de	0,1 bc	0,4 cd	0,1 gh	0,5 bc	0,3 e	0,5 b
15 (0,0)	0,4 de	0,1	0,3 d	0,5 cd	0,4 cd	0,5 c	0,3 d
16 (0,4)	0,7 ab	0,6 ab	0,7 ab	0,6 bc	0,5 bc	0,5 c	0,3 d
17 (0,6)	0,7 ab	0,9 a	0,5 c	0,3 ef	0,4 cd	0,0 g	0,0 h
18 (0,4)	0,4 de	0,2 bc	0,5 c	0,5 cd	0,3 de	0,0 g	0,0 h
19 (0,1)	0,5 cd	0,4 abc	0,4 cd	0,4 de	0,3 de	0,0 g	0,4 c
20 (0,1)	0,6 bc	0,0 c	0,3 d	0,3 ef	0,4 cd	0,4 d	0,3 d
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey.

Os isolados 1, 2, 4, 7 e 16 foram que apresentaram maior quantidade de halos de inibição, considerando todos os filtrados testados.

A escolha do filtrado do isolado foi feita de forma aleatória, entre os melhores resultados, sendo utilizado o filtrado 5, já para o isolado, o 4 foi escolhido devido a sua média superior aos outros isolados no teste *in vitro*.

A grande maioria dos *Lactobacillus* spp. isolados testados apresentaram potencial de inibição contra *Salmonella* Heidelberg. no teste *in vitro*, assim demonstrado o antagonismo a ela. Essa inibição pode ter ocorrido pelo fato que as bactérias reconhecem algumas moléculas que são produzidas e liberadas no meio para a comunicação, intra e entre espécies.

De acordo com Khmel and Metlitskaya (2006) a medida que a densidade populacional aumenta, as bactérias que possuem o mecanismo de Quorum sensing realizam a comunicação célula-célula, juntamente com isso, o autor considera a possibilidade sistema que regula o *Quorum sensing* combater infecções, pois produzem moléculas.

Essas moléculas são produzidas, liberadas e reconhecidas pelo mecanismo de *Quorum sensing*, que foi descrito por Fuqua e colaboradores (1994) onde as bactérias notam a mudança no ambiente, aumento da densidade populacional ou disponibilidade de nutriente. Esse reconhecimento gera uma resposta coletiva, na qual a finalidade é sobreviver e prosperar, além disso algumas bactérias tem a capacidade de produzir bacteriocinas.

Sendo assim alguns *Lactobacillus* spp. isolados demonstraram antagonismo a *Salmonella* Heidelberg no teste *in vitro*, onde produziram e liberaram moléculas no ambiente durante a sua multiplicação, assim inibindo parcialmente o crescimento da *Salmonella* Heidelberg pelo teste *Spot on the Lawn* (WATERS; BASSLER, 2005; READING; SPERANDIO, 2006).

Após o contato com o filtrado foi possível observar que os halos de inibição aumentaram, provavelmente devido o reconhecimento das substâncias que os filtrados produziram após o contato com a *Salmonella* Heidelberg, resultando na modificação do comportamento bacteriano, gerando uma resposta coletiva (GRIFFITHS, 2005).

Os resultados da contagem de *Salmonella* Heidelberg nas três coletas dos quatro grupos estão expostas na tabela 5.

Os resultados do teste *in vivo* após a análise estatística estão apresentados na tabela 6, demonstrando assim a inibição da *Salmonella* Heidelberg.

Foi realizado o teste t (Student) para comparação da quantidade de *Salmonella* Heidelberg (UFC/ mg) de ceco, para cada tratamento ($P < 0,05$).

1 TABELA 5 Resultados da contagem de *Salmonella* Heidelberg nos cecos das aves, nos diferentes grupos experimentais e colheitas.

Colheita 1					colheita 2					colheita 3				
Aves	L	L + I	I	SH	Aves	L	L + I	I	SH	Aves	L	L + I	I	SH
1	0,8*	0,009	2,7	7,2	1	18	13	13, 6	21	1	0,08	11	5, 2	27
2	2,7	0,002	1,5	79	2	40	8,4	29	6,2	2	4	6,7	8,7	14,2
3	46	1,55	3	22	3	45	2	9	24	3	10	6,4	10,6	4
4	8,4	2	4,5	38	4	35	4,5	6,7	39	4	24	19	8	1,9
5	1,6	3,4	12	18	5	61	52	11	17	5	7	10,5	22	15
6	3,7	1,9	3	75	6	4,3	210	17	99	6	27	2,1	50	6
7	14,6	1,03	130	12,6	7	65	11,1	18,6	10	7	36	16	13	13
8	4,7	3,08	5,8	30	8	24	16	120	7	8	21	12,2	4,3	6,3
9	9,5	27,3	7,4	6,7	9	22	25	39	12	9	18	10	9	3,3
10	11,5	1,81	20	58	10	36	14	14	2,4	10	7	11	14,5	5

2 * Valores expressos em UFC/gr/ceco ($\times 10^5$)

TABELA 6 Média, desvio padrão, mínimo e máximo de unidades formadora de colônia por grama de ceco de *Salmonella* Heidelberg das colheitas.

	Grupo	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Colheita 1	Lacto	10.222B	14.124	0.800	46.000
	Filtrado	18.878B	41.792	1.500	130.00
	Lacto	4.475B	8.640	0.002	27.300
	Filtrado				
	SH	32.056A	27.444	6.700	79.000
Colheita 2	Lacto	34.922	20.070	4.300	65.000
	Filtrado	29.256	35.549	6.700	120.000
	Lacto	38.000	66.216	2.000	210.000
	Filtrado				
	SH	26.133	29.182	6.200	99.000
Colheita 3	Lacto	16.342	11.871	0.080	36.000
	Filtrado	14.511	14.923	4.300	50.000
	Lacto	10.433	5.095	2.100	19.000
	Filtrado				
	SH	10.078	8.037	1.900	27.000

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey. As comparações foram realizadas dentro de cada colheita separadamente.

Diante destes resultados podemos observar que apenas na primeira colheita a contagem de *Salmonella* Heidelberg houve diferença estatística. Todos os grupos que receberam tratamento diferiram estatisticamente do grupo que não recebeu tratamento.

Os grupos tratados apresentaram menor unidades formadoras de colônias (UFC) nos cecos de *Salmonella* Heidelberg na primeira colheita, assim mostrando que por comunicação bacteriana houve mudança no comportamento coletivo que trabalha na sincronidade do comportamento bacteriano, como intuito de combater patógenos e sobreviver (BASSLER, LOSICK, 2006; HOOSHANGI, BENTLEY, 2008).

Os melhores resultados são observados na primeira colheita, onde o grupo que mais se destaca é o tratado com *Lactobacillus* spp. mais o filtrado, em seguida o grupo do filtrado e por último o grupo *Lactobacillus* spp. Isso mostra que quando as aves recebem o filtrado há uma redução da quantidade de *Salmonella* Heidelberg

nos cecos das aves semelhante ao que ocorre aos grupos que receberam uma bactéria probiótica, demonstrando que o filtrado é eficiente no controle da *Salmonella* Heidelberg no teste *in vivo*.

Essa diminuição na quantidade de *Salmonella* Heidelberg nos cecos das aves mostra que há alguma substância responsável pela comunicação entre as bactérias (ADAK *et al.*, 2011).

Embora não tenha ocorrido diferença estatística, biologicamente pode-se observar que o tratamento com *Lactobacillus* spp. mais o filtrado, foi o grupo que mais diminuiu a contagem de *Salmonella* Heidelberg nas aves, reforçando o já demonstrado no teste *in vitro*, onde foi utilizado o mesmo *Lactobacillus* spp. isolado de aves adultas que obteve a maior inibição contra a *Salmonella* Heidelberg, demonstrando assim a comunicação bacteriana.

Em relação aos *Lactobacillus* spp. já se sabe que deve ser administrado na dose correta e diariamente, para se ter efeito. Estudos mostram que é necessária dose de 5 milhões de unidade formadora de colônias (UFC) cerca de 5×10^9 por dia (COEURET, GUEGUEN, VERNOUX, 2004), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consultas (ANVISA) estabelece que probióticos devem conter quantidade mínima de 10^8 a 10^9 de unidades formadoras de colônia (UFC), são aceitos produtos com quantidade menor, mas sua eficácia deve ser comprovados (ANVISA).

Já a dose do filtrado ainda é desconhecida, sabemos que ele influencia diretamente no controle da *Salmonella* Heidelberg, no entanto estudos sobre sua composição e quantidade são necessários.

Assim esta pesquisa demonstra que os *Lactobacillus* spp. trazem benefícios na saúde do hospedeiro (FERREIRA, KUSSAKAWA, 1999) e reduzem a quantidade de microrganismos indesejáveis no intestino (NADER DE MARCIAS *et al.*, 1993).

CONCLUSÃO

Houve a comunicação bacteriana entre os *Lactobacillus* spp. de referência e os isolados de campo, tanto no experimento *in vitro* quanto no experimento *in vivo*, portanto o *quorum sensing* ocorre entre cepas de *Lactobacillus* spp. diferentes na microbiota intestinal de frangos de corte.

REFERÊNCIA

ADAK, S.;UPADRASTA, L.;KUMAR, S. P. J.;SONI, R.;BANERJEE, R. 2011. Quorum quenching – an alternative antimicrobial therapeutics. Science Against Microbial Pathogens. A. Mendez-Vilas ed. Formatex Research Center, Badajoz, Spain. p.586–593.

ANDREATTI FILHO, R.L. Paratifo aviário. Saúde aviária e doenças. São Paulo: Roc, p. 96- 111, 2007.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consultas: Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-uca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=2864062&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=probioticos&inheritRedirect=true

BASSLER, B.L.;LOSICK, R. 2006. Bacterially Speaking. Cell. 125:237–246.

BERCHIERI JUNIOR, A. Salmonellose Aviária. In: Berchieri Júnior, A.; Macari, m. Doença das aves, Campinas: Facta, 2000. Cap 4, p. 185-195.

BERNDT, A.; WILHELM, A.; JUGERT, C.; PIEPER, J.; SACHSE, K.; METHNER, U. Chicken cecum immune response to Salmonella enterica serovars of different levels of invasiveness. Infection and Immunity, v. 75, n. 12, p. 5993-6007, 2007.

BOYLE, E.C; BISHOP, J.L; GRASSL, G.A.; FINLAY, B.B. Salmonella: from pathogenesis to therapeutics. J. Bacteriol. Mar; v. 189, ed. 5, p.1489–1495. 2007.

COEURET V, GUEGUEN M, VERNOUX JP. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotics products. Int J Food Microbiol. V. 97(2), p.147-156, 2004.

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(4)p. 603-606, 2012.

DOYLE, M.P.; CLIVER, D.O. Salmonella. In: CLIVER, D.O. (Ed.). Foodborne Diseases. London: Academic Press, 1990. p.185-201.

DUBRNET, S.; DESMASURES, N.; GUÉGUEN, M. 2002. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. Microbiol. Let., 214: 271-275.

FERREIRA, F.A.B.; KUSSAKAWA, K.C.K. Uso de probióticos na alimentação de frangos de corte. Biotecnologia, v. 8, p. 40-43, 1999.

FOLEY, S.L; LYNNE, A.M. Food animal-associated Salmonella challenges, pathogenicity and antimicrobial resistance. Journal of Animal Science, v. 86, p. 173-187, 2008.

FUQUA, W.C.; WINANS, S.C.; GREENBERG, E.P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. J. Bacteriol. 1994, v.176 p. 269-275.

GRIFFITHS, M. Quorum sensing. In: M. Griffiths. Understanding pathogen behaviour: virulence, stress response and resistance. Woodhead July 2005 .Cap.22, p.580-640.

GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F.X. Antigenic formulae of the Salmonella Serovars. ed 9th, Paris: Institut Pasteur, 2007. WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella.

HAWVER, L.A.; JUN G, S.A.; Ng,Wai-Leung.Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems. Federaton of European Microbiological Societies. Microbiology Reviews, v. 40, n.5, p. 738–752, 2016.

HANSON, L.A.; YOLKEN, R.H. Probiotics, Other Nutritional Factors and Intestinal Microflora. Nestlé Nutrition Workshop Series, v. 42, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1999.

HOLZAPFEL, W.H. et al. Overview of gut fl ora and probiotics. International Journal of Food Microbiology, v.41, p.85-101, 1998.

HOOSHANGI, S.;BENTLEY, W.E. From unicellular properties to multicellular behavior: bacteria quorum sensing circuitry and applications. Curr. Opin. Biotechnol. V.19, p.550–555, 2008.

HUYGHEBAERT, G. et al. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. Veterinary Journal, v.187, p.182-188, 2011.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; DE PINNA, E.; NAIR, S.; FIELDS, P. I.; WEILL F. X. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Research in Microbiology, Paris, v. 165, n. 7, p. 526-530, 2014

JOHNSON B.R.; KLAENHAMMER, T.R. Impact of genomics on the field of probiotic research: historical perspectives to modern paradigms. Antonie Van Leeuwenhoek v.106 p.141–156. 2014

KHMELI, I. A.; METLISKAYA A. Z. Quorum sensing regulation of gene expression: a promising target for drugs against bacterial pathogenicity. Mol. Biol. v.40 p.169–182, 2006.

LEE, K. et al. Direct-fed antimicrobials and their impact on the intestinal microflora and immune system of chickens. *Journal of Poultry Science*, v.47, p.106-114, 2010.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN Jr., W.C. *Diagnóstico Microbiológico. Texto e Atlas colorido*. Ed Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro. 2001. p. 679 -680.

MAIORKA, A. Impacto da saúde intestinal na produtividade avícola. In: V Simpósio Brasil Sul de Avicultura. Anais. Chapecó, 2004, p. 26-41.

MAIORKA, A.; DAHLKE, F.; MORGULIS, M.S.F.A. Broiler adaptation to post-hatching period. *Ciência Rural*. Santa Maria, 2006. v. 36, n. 2.

MILLER, M.B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001. v.55: p.165-199.

NADER DE MACIAS, M.E.; ROMER, M.E.; APELLA, M.C.; GONZALES, S.N.; OLIVER, G. Prevention of infectious diarrhea produced by *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by feeding fermentation milk with lactobacilli. *J. Food Prot*, 1993. v. 56, p. 401-405.

READING, N.C.; SPERANDIO, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 2006; v. 254 ,p.1–11.

RIBEIRO ,A.R.; KELLERMANN ,A.; SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P. Resistência antimicrobiana de *Salmonella enteritidis* isoladas de amostras clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes pesadas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* , Belo Horizonte 2008. Vol. 60, n.5, p. 1259-1262.

RODRIGUES, D.P. Perspectivas atuais e falhas no diagnóstico antigênico de *Salmonella* spp.: importância no reconhecimento dos sorovares circulantes,

emergentes e exóticos. In: Simpósio Internacional sobre Salmonelose Aviária., 2011, São Paulo. Anais. São Paulo: UBABEF, 2011.

SCHWARTZ, K.J. Salmonellosis in: STRAW, B.E.; D'ALLAIRES, S.; MENGELING, W.L.; TAYLOR, D.J. Disease Swine. 8th ed. Ames: Iowa University Press, 2000

SILVA, E. N.; DUARTE, A. Salmonella Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. Rev. Bras. Cienc. Avic. 2002. vol.4 no.2.

SILVA, E. N.; ANDREATTI FILHO, R. L. Probióticos e prebióticos na avicultura. IN: II Simpósio de Sanidade Avícola. Santa Maria, 2000.

SHINOHARA, N.K.S.; BARROS, V.B.; JIMENEZ, S.M.C.; MACHADO, E.C.L.; DUTRAS, R.A.F.; LIMA FILHO, J.L. Salmonella spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. Ciênc. saúde coletiva. 2008. vol.13 n.5.

SOLA, M.C.; OLIVEIRA, A.P.; FEISTEL, J.C.; REZENDE, C.S.M. Mecanismo de Quorum Sensing e sua relevância na microbiologia de alimentos. Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, 2012 v.8, N.14; p.1 4 a 1 9.

SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; BASTOS, R.R. et al. Avaliação de associações e similaridades em epidemiologia veterinária por meio da análise de correspondência. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2002. v.54, p.539-542.

TANNOCK, G. W. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. International Dairy Journal, Barking. 1998 v. 8, n. 5-6, p. 527-533.

TORTUERO, F. Influence of the implantation of Lactobacillus acidophilus in chicks on the growth, feed conversion, malabsorption of fats syndrome and intestinal flora. Poultry Science. Madrid, 1973. v.52, p.197-203.

VAN ASTEN, A.J.A.M.; KONINKX, J.F.J.G.; VAN DIJK, J.E. Salmonella entry: M cells versus absorptive enterocytes. Veterinary Microbiology [online] 2005, v.108, p.149-152.

VELGE, P., CLOECKAERT, A., BARROW, P. Emergence of Salmonella epidemics: The problems related to Salmonella enterica serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. Vet. Res. 2005. v. 36, p. 267-288.

WATERS C.M.; BASSLER B.L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. Annu Rev Cell Dev Biol 2005, v.21, p. 319-346.

ANEXO 1

Análise de variância entre os grupos e as coletas (valores de P).

	Grupos	L	I	L+I	SH
Colheita 1	Lacto		0.9296	0.0703	0.0193
	Filtrado	0.9296		0.0575	0.0151
	Lacto Filtrado	0.0703	0.0575		0.0017
	SH	0.0193	0.0151	0.0017	
Colheita 2	Lacto		0.1711	0.1711	0.1575
	Filtrado	0.1711		0.5961	0.8251
	Lacto Filtrado	0.1711	0.5961		0.7573
	SH	0.1575	0.8251	0.7573	
Colheita 3	Lacto		0.6911	0.3311	0.2327
	Filtrado	0.6911		0.9648	0.4797
	Lacto Filtrado	0.3311	0.9648		0.5660
	SH	0.2327	0.4797	0.5660	

Foi realizada análise de variância para comparação dos 4 grupos nas 3 coletas ($P < 0,05$).

NORMAS DE ENVIO PARA Brazilian Journal of Poultry Science disponpivel em:
<https://mc04.manuscriptcentral.com/rbca-scielo>.



Artigo publicado

**Bacterial communication between
Lactobacillus spp. isolated from poultry
in the inhibition of *Salmonella* Heidelberg**

