

LETICIA SOARES FRANCO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO BACTERICIDA DE LISOZIMA EM ESTIRPES DE
Salmonella spp.**

São Paulo

2023

LETICIA SOARES FRANCO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO BACTERICIDA DE LISOZIMA EM ESTIRPES DE
Salmonella spp.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profa. Dr^a Terezinha Knöbl

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

4306
FMVZ

Franco, Leticia Soares
Avaliação do efeito bactericida de lisozima em estirpes de *Salmonella* spp/ Leticia
Soares Franco. – 2023.
89 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2023.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientadora: Profa. Dra. Terezinha Knöbl.

1. *Salmonella* Heidelberg. 2. *Salmonella* Minnesota. 3. Lisozima. 4. Avicultura.
5. Sanidade avícola. I. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito bactericida de Lisozima em estirpes de *Salmonella* spp. com perfil de resistência múltipla aos antimicrobianos", protocolada sob o CEUA nº 8036250718 (ID 005771), sob a responsabilidade de **Terezinha Knöbl** e equipe; *Leticia Soares Franco* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 07/11/2018.

We certify that the proposal "Evaluation of the bactericidal effect of Lysozyme on *Salmonella* spp. with multiple antimicrobial resistance profile", utilizing 400 Birds (males and females), protocol number CEUA 8036250718 (ID 005771), under the responsibility of **Terezinha Knöbl** and team; *Leticia Soares Franco* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 11/07/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 12/2018 a 07/2022 Área: Patologia Experimental E Comparada

Origem: Amostras biológicas estocadas

Espécie: Aves

sexo: Machos e Fêmeas

idade: 1 a 45 dias

Quantidade: 400

Linhagem: Cobb

Peso: 42 a 2500 g

São Paulo, 12 de março de 2023

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo





CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação in vivo da lisozima de ovo sobre a colonização intestinal de aves com *Salmonella Heidelberg* e *Salmonella Minnesota*", protocolada sob o CEUA nº 7091130921 (ID 009305), sob a responsabilidade de **Terezinha Knöbl** e equipe; *Leticia Soares Franco* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 14/04/2022.

We certify that the proposal "In vivo evaluation of egg lysozyme against avian intestinal colonization with *Salmonella Heidelberg* and *Salmonella Minnesota*", utilizing 144 Birds (144 males), protocol number CEUA 7091130921 (ID 009305), under the responsibility of **Terezinha Knöbl** and team; *Leticia Soares Franco* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 04/14/2022.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 05/2022 a 07/2022 Área: Patologia Experimental E Comparada

Origem: Animais provenientes de estabelecimentos comerciais

Espécie: Aves

sexo: Machos

idade: 1 a 21 dias

Quantidade: 144

Linhagem: Cobb

Peso: 50 a 550 g

São Paulo, 12 de março de 2023

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo



FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FRANCO, Leticia Soares

Título: **Avaliação do efeito bactericida de lisozima em estirpes de *Salmonella* spp.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais...
Aos meus animais...
...que sempre me incentivaram.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Terezinha Knöbl, pela disponibilidade de me orientar, por toda a atenção, carinho, orientação e conversas em todos esses anos. Sou extremamente grata por todas as oportunidades que me deu, e sei que não acabaremos aqui, nossa história vai muito além desse projeto.

À equipe do Laboratório de Medicina Aviária, Maria Gabriela, Yamê, Beatriz, Marcos e André pela companhia, ajuda e conversas diárias que ajudaram a melhorar a rotina, todos foram fundamentais para o meu crescimento e aprendizado.

À Fernanda Barbosa por todos os anos de companheirismo, por ser meu braço direito nessa jornada, sempre me ajudando em tudo, e sempre nos divertindo com nossas aventuras.

À professora Dra. Andrea Micke Moreno pela colaboração e contribuição. E à toda equipe do Laboratório de Sanidade Suína e Virologia pelo apoio e disponibilidade, em especial ao Vasco Túlio de Moura Gomes.

Aos meus colegas do Departamento de Patologia Experimental e Comparada, pelas conversas e troca de informações diária.

Aos funcionários do departamento de Patologia Experimental e Comparada por toda a ajuda enquanto estive na Universidade. Vocês sempre serão pessoas sensacionais, e que serei muito grata por toda vida, em especial, à funcionária Magali e a secretária Milena.

À Ana Paula G. Christ, Maria Inês Z. Sato e Mikaela Roberta Funada Barbosa, pela identificação das amostras isoladas neste projeto, através do MALDI TOF.

A Biogenic pelo fornecimento do material para o projeto, pelo apoio e pela oportunidade. Em especial à M.V. Carina Nishio, que sempre acreditou no meu trabalho.

Aos meus amigos que estiveram presentes durante todo esse percurso, me apoiando e me incentivando a continuar, mesmo que de longe, Amanda, Kauã, Laís e Thaynná.

À minha noiva, que esteve presente em grande parte dessa jornada, sempre me incentivando e correndo junto comigo nas batalhas do dia a dia. Sem a sua compreensão, afeto, parceria e cumplicidade, tudo seria muito mais difícil de acontecer.

Aos meus pais, Arleide e Odil, e ao meu irmão, Lucas, pelo incentivo, pela força e pelo amor e carinho, mesmo que de longe, todos os conselhos me serviram. Agradeço imensamente e eternamente tudo o que fazem por mim e sei o quanto estamos juntos nessa vida para o que der e vier.

A minha avó Aliete por toda a preocupação e carinho e pelas ligações inesperadas. Foram conversas que me incentivavam a continuar. E a minha família por todo o amor e compreensão.

Aos meus animais, que sempre me motivaram a continuar tudo, e que mesmo de longe são extremamente amorosos e companheiros. Me inspiram todos os dias a continuar.

Ao Bernardo, que hoje está em outro plano, mas que foi a razão pra muita coisa acontecer e com certeza, foi o meu maior apoiador nesses anos.

A todos que fizeram parte de alguma forma durante esse percurso, seja me incentivando, acreditando e aconselhando. Muito obrigada.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela concessão da bolsa de doutorado – nº 165385/2018-9 e auxílio de bancada.

RESUMO

FRANCO, L.S. **Avaliação do Efeito Bactericida de Lisozima em estirpes de *Salmonella* spp.**. [Evaluation of the Bactericidal effect of Lysozyme on strains of *Salmonella* spp.] 2023. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Salmonellas são bactérias Gram negativas, da família Enterobacteriaceae, considerada um dos principais patógenos entéricos de transmissão alimentar, com grande importância para a saúde pública. Sorovares de *Salmonella* spp. com fenótipo de resistência múltipla aos antimicrobianos emergiram na avicultura a partir de 2004, justificando a busca por produtos alternativos no controle da infecção nas aves. A lisozima ou 1,4- β -N-acetilmuramidase é uma enzima natural, presente no sistema imune inato dos animais e seres humanos, que possui propriedade bactericida. O mecanismo de ação utilizado é pela via não-enzimática, na presença de atividade de peptídeos catiônicos antimicrobianos e propriedades hidrofóbicas, induzindo a morte celular por alteração na membrana. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito bactericida da lisozima nos sorovares *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Minnesota. Foram isoladas 44 estirpes de *Salmonella* spp., em 4 granjas da região sudeste (SP e MG), sendo 28 identificadas como *S. Heidelberg* e 16 como *S. Minnesota*. O percentual de isolados com resistência múltipla aos antimicrobianos foi de 97,72%. A Concentração Bactericida Mínima para 90% das estirpes (CBM90) foi ≤ 15 ppm. Ensaio *time-kill* em tempos pré-estabelecidos demonstraram que a redução de 71,42% das estirpes de *Salmonella* Heidelberg entre 4 e 8 horas, embora alguns isolados tenham resistido à exposição por mais de 24 horas em concentrações de 1000 e 2000 ppm. Para *Salmonella* Minnesota, a redução foi de 62,5%. O desafio *in vivo* com *S. Heidelberg* revelou redução da frequência de frangos colonizados após o desafio, com 63,66% de frangos positivos aos 21 dias no controle positivo e 26,08% dos frangos colonizados no grupo tratado com lisozima 1000 ppm. Foram detectadas diferenças estatísticas significativas na contagem de colônias no ingluvío e nos cecos de frangos tratados, na comparação com os grupos controles. Esses resultados sugerem que a lisozima possui potencial como substância alternativa no uso de antimicrobianos nas infecções por sorovares resistentes de *S. Heidelberg* e *S. Minnesota*.

Palavras-chave: *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Minnesota, Liozima, Sanidade avícola

ABSTRACT

FRANCO, L.S. **Evaluation of the Bactericidal effect of Lysozyme on strains of *Salmonella* spp.** [Avaliação do Efeito Bactericida de Lisozima em estirpes de *Salmonella* spp.] 2023. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Salmonellas are Gram-negative bacteria, from the Enterobacteriaceae family, considered one of the main enteric pathogens of food transmission, with considerable importance for public health. Serovars of *Salmonella* spp. with multiple antimicrobial resistance phenotypes emerged in poultry from 2004 onwards, justifying the search for alternative products to control bird infections. Lysozyme or 1,4- β -N-acetylmuramidase is a natural enzyme, present in the innate immune system of animals and humans, which has bactericidal properties. The mechanism of action is based on the non-enzymatic route, the presence of antimicrobial cationic peptide activity and hydrophobic properties, inducing cell death by membrane modification. The aim of this work was to evaluate the bactericidal effect of lysozyme on *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Minnesota serovars. Forty-four strains of *Salmonella* spp. were isolated from 4 farms in the southeast region (SP and MG), 28 of which were identified as *S.* Heidelberg and 16 as *S.* Minnesota. The percentage of isolates with multiple antimicrobial resistance was 97.72%. The Minimum Bactericidal Concentration for 90% of the strains (CBM90) was \leq 15 ppm. Time-kill assays at pre-established times demonstrated a reduction of 71.42% of most strains of *Salmonella* Heidelberg, between 4 and 8 hours, although some isolates resisted exposure for more than 24 hours at concentrations of 1000 and 2000 ppm. *Salmonella* Minnesota isolates presented a reduction of 62.5%. The *in vivo* challenge with *S.* Heidelberg revealed a reduction in the frequency of chickens colonized after the challenge, with 63.66% of chickens positive at 21 days in the positive control and 26.08% of chickens colonized in the group treated with lysozyme 1000 ppm. Significant statistical differences were detected in colony counts in the proventriculus and cecum of treated chickens, in comparison with the control groups. These results suggest that lysozyme has potential as an alternative substance in the use of antimicrobials in infections by resistant serovars of *S.* Heidelberg and *S.* Minnesota.

Keywords: *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Minnesota, Lysozyme, Poultry health.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura cristalográfica da lisozima do ovo de galinha - tipo c, através da difração de raio-x com resolução de 1,29Å	39
Figura 2. Distribuição dos antimicrobianos no painel utilizado para realização da CIM	46
Figura 3. Scienceware® replicator 96-well, Sigma	47
Figura 4. Dendograma com os diferentes perfis de resistência antimicrobiana de Salmonella spp. São Paulo, Brasil.	55
Figura 5. Comparação da contagem de S. Heidelberg no grupo de tratamento, em comparação com grupo desafiado e não tratado (controle positivo) e não desafiado (controle negativo).....	65

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva de morte bacteriana dos isolados de Salmonella Heidelberg.....59

Gráfico 2. Curva de Morte Bacteriana dos isolados de Salmonella Minnesota60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Padrões de interpretação da CIM.....	46
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estirpes positivas para Salmonella spp. em amostras coletadas de granjas de São Paulo e Minas Gerais, 2020.....	52
Tabela 2. Distribuição das 44 estirpes de Salmonella spp. segundo valores de CIM dos antimicrobianos testados, São Paulo, Brasil.....	54
Tabela 3. Distribuição das 44 estirpes de Salmonella spp. segundo valores de CBM para lisozima em ppm, São Paulo, Brasil.....	57
Tabela 4. Frequência de isolamento de Salmonella Heidelberg em fezes de frangos de corte dos grupos controle positivo, controle negativo e desafiados e tratados com lisozima na dose de 1000ppm. São Paulo, Brasil.	62
Tabela 5. Estatística descritiva dos resultados de isolamento de S. Heidelberg por grupo de tratamento com o número de animais por categoria (N) e a porcentagem com o intervalo de confiança (IC) de 95% e teste de associação qui-quadrado com correção de Yates.....	62
Tabela 6. Resultados da análise semelhante a ANOVA (ANOVA não paramétrica) referente à frequência de positividade por grupo de tratamento e dia de análise.	63
Tabela 7. Contagem de Unidades Formadoras de Colônias no ingúvio de frangos nos grupos controle positivo e tratado com lisozima 1000 ppm, no abate aos 21 dias. São Paulo, Brasil.	64
Tabela 8. Contagem de Unidades Formadoras de Colônias nos cecos de frangos dos grupos controle positivo e tratado com lisozima 1000 ppm, no abate aos 21 dias. São Paulo, Brasil.	64
Tabela 9. Número de animais (N), média com desvio padrão (DP), mediana com intervalo interquartil (IIQ) e valores mínimo e máximo da variável com teste de associação Kruskal-Wallis e teste de Dunn (post-hoc) dos valores da contagem bacteriana do ceco de frangos.	65

LISTA DE ABREVIações

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal

AUG – Amoxicilina com ácido clavulânico

AMI – Amicacina

AMP – Ampicilina

AZI – Azitromicina

AR – Ácido-resistente

ART – Ácido-tolerante

BHI – Broth Heart Infusion

C-type – Chicken type

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CFO – Cefoxitina

CHL – Cloranfenicol

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CIP – Ciprofloxacina

CLSI – Clinical Laboratory Standards Institute

CN – Controle negativo

COL – Colistina

CP – Controle positivo

CRO – Ceftriaxona

CTX – Cefotaxima

DP – Desvio padrão

EIA – Imunoensaio Enzimático

ELISA – Ensaio Imuno-enzimático indireto

ENO – Enrofloxacin

ESBL – Beta-lactamase de espectro estendido

FFN – Florfenicol

FIA – Análise por Injeção de Fluxo

FOS – Fosfomicina

G-type – Goose eggs type

GEN – Gentamicina

I – Intermediário

IC – Intervalo de Confiança

IIQ – Intervalo Interquartil

I-type – Invertebrate type

IAL – Instituto Adolfo Lutz

IMS – Separação Imuno-magnética

IN – Instrução Normativa

LB – Lúria Bertani

LPS – Lipopolissacarídeo

MALDI-TOF MS – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MAR – Marbofloxacin

MDR – Resistência Múltipla aos Antibióticos

MERO - Meropenem

MG – Minas Gerais

N – Número de animais

NAL – Ácido Nalidíxico

NEO – Neomicina

OXI – Oxitetraciclina

PCR – Reação em Cadeia pela ação da Polimerase

PNSA – Programa Nacional de Sanidade Avícola

ppm – Parte por milhão

POS - Positivo

R – Resistente

S – Sensível/Susceptível

SH – *Salmonella* Heidelberg

SIF – Serviço de Inspeção Federal

SM – *Salmonella* Minnesota

SP – São Paulo

STX – Sulfametoxazol-trimetoprim

SUL – Sulfonamidas

T1SS – Sistema de secreção Tipo 1

TIO – Ceftiofur

TSA – Difco Bacto Tryptic Soy Agar

TT – Tratamento

UFC – Unidade Formadora de Colônias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 ETIOPATOGENIA.....	23
2.2 IMPORTÂNCIA EM SAÚDE ANIMAL E SAÚDE PÚBLICA	30
2.3 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	31
2.4 DIAGNÓSTICO DE SALMONELOSES.....	34
2.5 CONTROLE DE INFECÇÕES POR <i>Salmonella</i> EM AVES	35
2.6 LISOZIMA	38
3. OBJETIVOS	42
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 COLETA DAS AMOSTRAS	43
4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA.....	43
4.3 DETERMINAÇÃO DO SOROGRUPO	44
4.4 DETECÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA – CIM PARA ANTIMICROBIANOS	45
4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DA LISOZIMA	47
4.6 CURVA DE MORTE BACTERIANA PELO MÉTODO <i>Time Kill</i>	48
4.7 AVALIAÇÃO DA LISOZIMA NA COLONIZAÇÃO INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE EXPERIMENTALMENTE DESAFIADOS COM <i>S. Heidelberg</i>	48
4.7.1 Amostra bacteriana	48
4.7.2 Aves e instalações.....	49
4.7.3. Delineamento experimental	49
4.7.4 Análise microbiológica de determinação de <i>Salmonella</i>	50
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
5. RESULTADOS	52
5.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES	52
5.2 SENSIBILIDADE <i>in vitro</i> À AÇÃO DA LISOZIMA	57
5.3 Ensaios de morte bacteriana (<i>Time Kill</i>)	58
5.4 DESAFIO DE FRANGOS COM <i>S. Heidelberg</i>	61
6. DISCUSSÃO	66
7. CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1. INTRODUÇÃO

A avicultura no Brasil é uma das mais produtivas e tecnificadas do mundo. Segundo dados do relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal, no ano de 2020, o Brasil produziu 13.845 milhões de toneladas de carne de frango, exportando 4.231 mil toneladas e liderando o *ranking* mundial de exportações de carne de frango. Em 2021, houve um aumento na produção, chegando à marca de 14.329 milhões de toneladas com exportação de 4.610 mil toneladas de carne. A produção brasileira sustenta 67,83% do mercado interno, permitindo um consumo de carne de frango de 48,56kg/habitante (ABPA, 2022). No mercado externo, o país é responsável pelo fornecimento de carne de frango para mais de 150 países dos cinco continentes (ABPA, 2022; Webber *et al.*, 2019). Segundo o Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada da Esalq/USP, o crescimento exponencial da avicultura brasileira deve ser mantido nos próximos anos em razão dos focos de influenza aviária em diversos países asiáticos, europeus e americanos, com aumento da procura por produtos com melhor *status* sanitário (CEPEA, 2018).

Hoje, a avicultura brasileira alberga mais de 150 mercados importadores de carne de frango, embarcando mais de 4 milhões de toneladas por ano. Além do mercado de ovos, que possui grandes polos de produção, com elevados índices de postura. As altas taxas de produção e exportação são devido ao avanço das tecnologias em genética, ambiência e manejo. Esses pontos de melhoria permitiram ao Brasil destaque e referência no mercado mundial.

Dentre os fatores que favorecem a produção e a exportação de aves podemos destacar a qualidade sanitária do plantel de aves no país e o cumprimento das exigências sanitárias do mercado externo, resultando em maior segurança do alimento (Berchieri, Neto, 2009). O Brasil é considerado país livre da maioria das enfermidades classificadas como barreiras sanitárias pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2018) e desde 1994 possui um Programa Nacional de Sanidade Avícola - PNSA, com diretrizes relacionadas ao controle do Tifo aviário, da Pulorose e das infecções paratífóides causadas pelos sorovares *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (BRASIL, 1994).

Apesar dos esforços para o controle dos sorovares *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, o controle do paratifo aviário ainda é um dos maiores desafios do setor,

reforçado nos últimos anos pela emergência de sorovares de *Salmonella*, tais como *S. Heidelberg*, *S. Minnesota*, *S. Saint Paul*, *S. Agona*, *S. Infantis*, entre outros (Foley *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2013; Gast, Porter Jr, 2020; Castro-Vargas *et al.*, 2020). Estes sorovares têm sido apontados como barreiras comerciais para a exportação devido a possibilidade de associação com surtos de doença de transmissão alimentar e, também representam uma preocupação pelos índices crescentes de resistência antimicrobiana (Tellez *et al.*, 2012).

A proibição sequencial do uso de aditivos zotécnicos melhoradores de desempenho é uma estratégia global para controlar a emergência de patógenos resistentes dentro do conceito de saúde única, e visa assegurar a eficácia de antimicrobianos de classe compartilhada, criticamente importantes e de elevada prioridade para saúde humana (Brasil, 2017; OMS, 2019). Diversos produtos alternativos têm sido registrados no mercado avícola, como estratégias necessárias para o controle das doenças aviárias bacterianas, incluindo prebióticos, probióticos, imunostimulantes, óleos essenciais, suplementação de ácidos orgânicos e enzimas (El-Shall *et al.*, 2019). Embora o efeito bactericida da lisozima extraída do ovo seja conhecido, não existem dados suficientes na literatura para avaliar se o composto seria uma alternativa viável para o controle dos sorovares *S. Heidelberg* e *S. Minnesota* circulantes nas granjas brasileiras.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETIOPATOGENIA

Salmonellas são bactérias Gram negativas, da família Enterobacteriaceae. Consideradas anaeróbios facultativos e com identificação do gênero e biotipo feita através da fermentação de glicose e outros açúcares, ou através da descarboxilação de aminoácidos. A maioria dos seus sorotipos possuem flagelos, permitindo a mobilidade da estirpe, podendo ser flagelo monofásico ou bifásico (Campos *et al.*, 2015). Algumas variantes como *Salmonella Gallinarum* e *S. Pullorum* não possuem flagelos e são classificadas como imóveis (Jajere, 2018).

Atualmente são reconhecidas apenas duas espécies de *Salmonella* spp.: *S. bongori* e *S. enterica*, sendo a última dividida entre seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *salamae*, *S. enterica* subespécie

arizonae, *S. enterica* subespécie *diarizonae*, *S. enterica* subespécie *houtenae* e *S. enterica* subespécie *indica* (Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014). Essa designação se dá pela diferença de análises de sequência de 16 rRNA (Eng *et al.*, 2015). Já foram descritos mais de 2.659 sorotipos diferentes de *Salmonella*, abrangendo diversas classes animais, com aproximadamente 100 sorovares zoonóticos, incluindo os seres humanos como principal reservatório natural (Shinohara *et al.*, 2008; Freitas Neto *et al.*, 2020). Cerca de 90 sorovares podem afetar humanos e causar quadros de diarreia (Berchieri, Neto, 2009). Desde 1930, sua classificação por meio de sorovares pode ser descrita pelo esquema de identificação de White-Kauffman, caracterizado pela composição antigênica das salmonelas de acordo com seus antígenos somáticos (O), flagelar (H) e capsular (K) (Yoshida *et al.*, 2016; Alzwghaibi *et al.*, 2018).

O antígeno somático O é um oligossacarídeo componente da parede bacteriana, constituída por lipossacarídeo termoestável localizado na membrana externa da bactéria e está presente em cerca de 50 sorogrupos distintos de *Salmonella* (Zishiri, 2016). O antígeno H, caracterizado como termolábil é encontrado nos flagelos bacterianos e é responsável pela motilidade bacteriana e atua na estimulação da resposta imune do hospedeiro. Entre as salmonelas, é comum a ocorrência de dois genes que codificam flagelos em sua superfície, os genes *fliC* e *fliB*, podendo expressá-los cada um por vez, com variação de fase (McQuiston *et al.*, 2011). Essa característica permite que sejam classificados como difásicos, fase I e II. Na fase I, a expressão é responsável pela identidade imunológica, enquanto a fase II é inespecífica e pode ser expressa por muitos sorotipos distintos (McQuiston *et al.*, 2008; Jajere, 2019). Os antígenos capsulares K são polissacarídeos sensíveis ao calor localizados na superfície capsular bacteriana e encontrados em diversos sorotipos de *Salmonella* spp. Um exemplo clássico é o subtipo Vi, responsável pela virulência, protegendo a bactéria dos mecanismos de imunidade inata do hospedeiro, e pode ser encontrado apenas em sorotipos patogênicos de *Salmonella* Paratyphi C, *S. Dublin* e *S. Typhi* (Campos *et al.*; Eng *et al.*, 2015; Wattiau *et al.*, 2016).

O gênero *Salmonella* se destaca dos demais pelas características de invasibilidade, que resulta em risco de infecções sistêmicas potencialmente fatais se não diagnosticadas e tratadas em tempo (Silva *et al.*, 2013). O agente carrega em seu genoma, proteínas efetoras que viabilizam a invasão no epitélio intestinal, promovendo um desarranjo no citoesqueleto da célula do hospedeiro (Freitas Neto *et*

al., 2020). Além da sua capacidade de invadir as células, também pode se multiplicar dentro delas e resistir a destruição causada pelos fagócitos e o sistema complemento, dificultando seu combate (Menão, Knöbl, 2016). Possuem uma série de fatores de virulência que dificultam sua eliminação e tratamento, como cápsula, plasmídeos, fímbrias, sistemas de aderência, ilhas de patogenicidade, proteínas efetoras e outros fatores de virulência como o gene *ShdA*, Rck, LPS, superóxido desmutase, flagelina e o antígeno Vi (Campos *et al.*, 2015; Jajere, 2019). Quando relacionado a capacidade patogênica, todas as espécies de *Salmonella* podem invadir, replicar e sobreviver em células hospedeiras (Eng *et al.*, 2015).

Características de sobrevivência de *Salmonella* são fatores importantes para entender como elas se mantêm no ambiente, nos alimentos e no hospedeiro. Estirpes de *Salmonella* são consideradas mesófilas, podendo sobreviver a variação de temperaturas entre 2° e 54°C. Isso ocorre pela presença de fatores Sigma, que são proteínas capazes de desencadear o mecanismo de resposta celular para adaptação (Spector, Kenyon, 2012). Outra característica é a capacidade destas bactérias em sobreviver ao pH ácido, geralmente entre 4 e 5, por conta da sua fermentação ácido láctica. Sua resposta adaptativa pode favorecer a permanência em pH mais ácidos. A presença de fatores de virulência regulando o sistema PhoP/PhoQ das salmonelas permite que genes atuem no desenvolvimento da célula bacteriana, sobrevivendo dentro dos macrófagos, em pH baixo. Além desse sistema, *Salmonella* também apresenta a resposta ácido-tolerante (ATR), que permite a sobrevivência de bactérias em pH extremamente ácidos, como 3.0 e 4.0 (Andino, Hanning, 2015) e o sistema ácido-resistente (AR), reagindo a pH 2.5 (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2010). Esse mecanismo é de extrema importância para que cepas de *Salmonella* consigam sobreviver no trato gastrointestinal do hospedeiro devido ao pH ácido encontrado no estômago (Spector, Kenyon, 2012). Uma terceira característica importante é a atividade de água da *Salmonella*, que pode ser definida através da pressão de vapor da água de um determinado alimento e a pressão da água pura em uma mesma temperatura, e levando em consideração que quanto mais elevado o valor, mais rápido é o crescimento bacteriano (Labuza *et al.*, 1970; Andino, Hanning, 2015).

Um dos mecanismos de adesão em diferentes células e superfícies utilizado pela *Salmonella* é a presença de fímbrias (Campos, 2015). São estruturas anexas formadas de uma camada proteica, e uma de suas partes possibilita a interação com

o hospedeiro receptor, através da adesão na superfície (Wiedemann *et al.*, 2015). É possível através dessas estruturas ocorrer a transferência de genes e troca de informações com outros microrganismos (Baumler *et al.*, 1997). O grande desafio para entender a função e a importância de cada fímbria se dá pela presença de vários tipos em diversos sorovares diferentes, em uma ampla distribuição (Campos, 2015). Um exemplo é a *S. Typhimurium* que apresenta treze tipos de fímbrias (Wiedemann *et al.*, 2015). As fímbrias mais comumente encontradas são as do tipo I, fímbria *curli*, fímbria plasmidial e fímbria longa polar (Campos, 2015).

Fatores de virulência são amplamente estudados dentre as salmonelas, podendo assim caracterizar os diferentes sorovares. *Salmonella Typhimurium* e *S. Typhi* possuem 90% de similaridade nos seus genes, enquanto os 10% são correlacionados com os fatores de virulência dessas variações, que conferem o potencial patogênico a elas (de Jong *et al.*, 2012). A ShdA, por exemplo, é uma adesina formada de fibronectina e colágeno, e está associada com a colonização do ceco e da excreção de *Salmonella* nas fezes (Campos, 2015). Aparece em *S. Typhimurium* e em outros sorovares associados a infecção em humanos e animais de sangue quente (Kingsley *et al.*, 2000).

O LPS pode ser considerado um fator de virulência (Campos, 2015), e é o maior componente presente nas bactérias gram-negativas protegendo de componentes tóxicos e da ação de defensas (Campos, 2015; Wiedemann *et al.*, 2015).

É importante lembrar que grande parte dos genes de virulência de *Salmonella* estão localizados nas ilhas de patogenicidade. São descritas 21 ilhas de patogenicidade diferentes, porém apenas 5 são mais estudadas, dando destaque para a SPI-1 e SPI-2 (de Jong *et al.*, 2012; Campos, 2015) que conferem a capacidade de sobrevivência intracelular (Wang *et al.*, 2020).

Ilhas de patogenicidade são descritas por conferirem similaridade cromossomal e plasmidial entre salmonelas, ou seja, regiões clonais dentre os sorovares (Wang *et al.*, 2020). São a porção do DNA provenientes de transferência horizontal de outros microrganismos e são ausentes em estirpes não patogênicas (Zishiri *et al.*, 2016).

SPI-1 é reconhecida em todas as linhagens de *Salmonella* de ambas as espécies *S. bongori* e *S. enterica* (Lostroh, Lee, 2001); é uma das ilhas conhecida por possuir proteínas efetoras que induzem a invasão das células epiteliais através do

rearranjo do citoesqueleto de actina e a internalização da bactéria por enterócitos não fagocíticos (Zhang et al., 2018). Essas proteínas efetoras são translocadas para a célula hospedeira através de um Sistema de Secreção tipo III, denominado T3SS-1. Esse sistema possui um aparato de secreção semelhante a uma seringa, que permite a penetração e multiplicação dentro do hospedeiro (de Jong et al., 2012; Tran et al., 2018), com a colonização e invasão no epitélio intestinal, causando uma necrose e reações inflamatórias em macrófagos. SP-1 apresenta tamanho em torno de 40kb e possui estruturas estáveis (Wang et al., 2020). Genes conhecidos como *inv*, *spa*, *prg* e *org* codificam parte desse Sistema de Secreção tipo III (T3SS). Já os genes *sic/sip* codificam as proteínas efetoras e o translocon (*SipBCD*), uma estrutura formadora de poro que se insere na membrana da célula hospedeira e injeta as proteínas efetoras para o citoplasma da mesma (Lostroch, Lee; Campos, 2015; Wang et al., 2020). Muitos outros genes podem ser de extrema importância para os sorovares de *Salmonella*, e eles são principalmente descritos em *S. Typhimurium*, *S. Typhi* e *S. Paratyphi A* (Wang et al., 2020).

A SPI-2 está relacionada com mecanismos de sobrevivência da *Salmonella* e replicação no interior das células hospedeiras como células dendríticas, células M, monócitos, macrófagos e neutrófilos (Campos, 2015; Tran et al., 2018). Apresenta em sua composição 40 genes constituídos por 4 operons (Wang et al., 2020).

A SPI-3 apresenta tamanho médio de 17kb e contém 10 *ORFs* com seis unidades de transcrição. Um dos genes de importância pertencentes a SPI-3 é o *mgtCB*, que tem alta afinidade por magnésio, sendo um sistema de captação adaptado as condições nutricionais intra fagossômica (Potard, Groisman, 1997). A SPI-3 está envolvida tanto no início da adesão quanto na disseminação sistêmica da bactéria (Campos, 2015).

A ilha de patogenicidade SPI-4 apresenta o sistema de secreção tipo 1 (T1SS). Embora apresente 27kb, ela contribui para a adesão da *Salmonella* na superfície epitelial da célula. O T1SS compreende cinco proteínas denominadas complexo *SiiABCDF*, caracterizadas por causar infecção intestinal (Barlag, Hensel, 2015), secretam adesinas formadoras de muco de membrana, facilitando essa adesão (Wang et al., 2020). Tanto a SPI-1 quanto a SPI-4 são intimamente necessárias por invadir células epiteliais polarizadas (Barlag, Hensel, 2015).

A presença de antígeno Vi em sorovares de *Salmonella* Typhi e *S. Paratyphi* permite a formação de uma cápsula de polissacarídeos que torna a bactéria menos imunogênica, promovendo sua evasão do sistema imune, auxiliando também a colonização no hospedeiro, resistindo a bacteriófagos e completando a sua ação de lesão ao sistema complemento (Liston *et al.*, 2016); e confere fatores de virulência que incluem produção de toxina tifoide (Wang *et al.*, 2020).

A SPI-5 é responsável pela enteropatogenicidade das salmonelas e apresenta um tamanho de 7kb. Compreende genes envolvidos na secreção de fluídos na mucosa intestinal (Wang *et al.*, 2020), em destaque, o gene *sopB* que codifica a proteína SopB, aumentando os fluídos através da secreção de cloro (Campos, 2015).

De acordo com dados metagenômicos, sorotipos de salmonelas também podem ser diferenciados de acordo com o tamanho do seu genoma. A variação entre eles pode ser de 4460 a 4857kb (Thomson *et al.*, 2008). Entre as salmonelas não-tifóides, *S. Gallinarum* apresenta um tamanho médio de 4658kb, com 52% de conteúdo G-C. De Jong e colaboradores (2012) compararam genomas de estirpes de *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli* e constataram que ambas apresentam apenas 10% de diferença genética, sugerindo que foram derivadas de um mesmo antecessor em 100 milhões de anos atrás.

Tanto o grupo de salmonelas tifóides quanto o não-tifóides são caracterizados por causar quatro diferentes estágios clínicos da doença: febre entérica, gastroenterite, bacteremia e complicações extra intestinais e estado crônico da doença (Darby & Sheorey, 2008). Complicações extra intestinais são responsáveis por 93,8 milhões de casos de gastroenterites, com 155 mil mortes anualmente (Vinuenza-Burgos *et al.*, 2016). A sintomatologia pode ser muito variada, com uma ampla gama de sintomas, desde infecções assintomáticas até casos mais graves com diarreia, hipertermia, êmese, panoftalmia e artrite, podendo evoluir para sepse e óbito (Kanashiro *et al.*, 2002; Soncini, 2002). Sua sintomatologia está diretamente ligada ao hospedeiro, devido a sua idade, estado imune, localização, condições ambientais, condições de estresse e nutricionais (Kanashiro *et al.*, 2002; Corrêa *et al.*, 2013).

Em casos de infecção em humanos, causada pelos gêneros de *Salmonella* Typhi e *S. Paratyphi*, a febre tifoide pode manifestar sintomas como gastroenterite, sepse e febre entérica e sua variação de sintomatologia também se deve ao sistema

imune do hospedeiro e a virulência do isolado (Andino, Hanning, 2015), com manifestação entre 7 e 14 dias (Crump *et al.*, 2015), sendo responsáveis por cerca de 200 mil mortes anuais na Ásia Central (Andino, Hanning, 2015). As salmoneloses não tifoides, caracterizadas por NTS, causadas por gêneros que não são hospedeiro-específico, podem incluir *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Newport* e *S. Heidelberg*. Conhecidas por causar quadros agudos de gastroenterites e bacteremias (Kurtz *et al.*, 2017), levando o hospedeiro a infecções mais graves, com necessidade de hospitalização (Andino, Hanning, 2015).

A infecção nas aves pode ocorrer devido a fatores de risco relacionados principalmente a questões sanitárias. Animais com uma higiene inadequada de cama e gaiola, em uma alta densidade de animais, unido ao estresse têm uma maior predisposição a desenvolver a doença, principalmente em animais mais jovens (Waltman *et al.*, 2008).

Quanto a colonização e sintomatologia nas aves, é preciso mencionar as vias de transmissão oral-fecal e cloacal. *Salmonella* pode ser transmitida na forma vertical, através da infecção de ovários e ovidutos, permitindo a contaminação dos ovos (Lutful Kabir, 2010; Foley *et al.*, 2011). A multiplicação do patógeno ocorre no trato gastrointestinal das aves, colonizando o órgão e contaminando o ambiente através da excreção pelas fezes. Uma das principais características é a invasão da mucosa intestinal, das tonsilas cecais e das placas de Peyer. No primeiro momento da infecção, a invasão é feita no trato gastrointestinal das aves (Chappell *et al.*, 2009). A *Salmonella* pode invadir os macrófagos após atravessar a barreira intestinal (Brown *et al.*, 2005) e, quando isso ocorre, há um aumento na multiplicação dentro de macrófagos, extravasando através da corrente sanguínea ou sistema linfático para outros órgãos como baço e fígado (Lutful Kabir, 2010; Foley *et al.*, 2011). Em um segundo momento, a infecção pode acometer também ovários, ovidutos, saco da gema, moela, pulmões, miocárdio e pericárdio (Barrow, 1993; Lutful Kabir, 2010; Foley *et al.*, 2011). De acordo com o sorovar em questão, a predileção por determinados órgãos pode variar. *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, por exemplo, colonizam órgãos do sistema reprodutor das aves de postura mais velhas, causando uma maior mortalidade de pintinhos ao nascimento (Dunkley *et al.*, 2009). *S. Pullorum* tem um maior tropismo pela Bursa de Fabricius, provocando uma inflamação intestinal no órgão (Henderson *et al.*, 1999). Já *S. Heidelberg*, tem uma predileção maior pelas

camadas do sistema reprodutor, utilizando um mecanismo semelhante a *S. Enteritidis* para invasão dos ovos (Gast *et al.*, 2004; 2007a; 2007b).

2.2 IMPORTÂNCIA EM SAÚDE ANIMAL E SAÚDE PÚBLICA

Salmonella spp. é considerada um dos principais patógenos entéricos, com grande importância para a saúde pública, pois representou o agente etiológico mais frequente isolado em surtos de origem alimentar no Brasil, entre 2000 e 2015 (SVS, 2015). São responsáveis por infecções tanto em humanos quanto animais e causam milhares de mortes anuais, juntamente com os gêneros *Escherichia*, *Campylobacter*, *Vibrio*, *Brucella*, *Shigella* e *Yersinia* (Tran *et al.*, 2018). Possuem grande importância econômica devido às doenças originadas por alimentos em países em desenvolvimento por conta dos custos com prevenção e tratamento (Crump *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2014; Eng *et al.*, 2015).

A problemática desses patógenos envolve sua transmissão oro-fecal, através da água e alimentos contaminados, além de aerossóis, solo e vegetação contaminada (Nair *et al.*, 2018), podendo permanecer por longos períodos nos sistemas de água. Atuam ainda na transmissão os artrópodes, e outros animais sinantrópicos (Allgayer *et al.*, 2009).

A presença de biofilme em estirpes de *Salmonella* pode favorecer a resistência bacteriana e sua persistência no ambiente. Os biofilmes são formados por estruturas multicelulares mantidas em rearranjo por fímbrias, pili, flagelo e exopolissacarídeo (Tran *et al.*, 2018). Estão associados a contaminação dos alimentos devido a sua capacidade de aderência em superfícies bióticas e abióticas (Beshiru *et al.*, 2018), resultando em infecções nos humanos (Chia *et al.*, 2009). Biofilme aparece promovendo uma proteção para bactérias aos desinfetantes, radiação ultravioleta, mudanças osmóticas, agentes antimicrobianos, entre outros (Nisson *et al.*, 2011). E relatos encontrados em literatura, descrevem a formação de biofilme *in vivo* como um dos principais componentes de cálculos biliares, além de agravar quadros de pacientes com doenças biliares pré-existentes (Mor, 2019).

O paratifo aviário persiste como um desafio sanitário nas criações, uma vez que as salmonelas do grupo paratifoide podem ser transmitidas ao homem por meio da ingestão de produtos de origem aviária (Berchieri; Neto, 2009). Um dos fatores de

suma importância na transmissão de *Salmonella* é a contaminação de alimentos de origem animal, particularmente a carne suína, de aves e os ovos (Li *et al.*, 2020). Alguns sorovares de *Salmonella* spp. são transmitidos pela via vertical, resultando em contaminação da progênie após a infecção no sistema reprodutor de galinhas (Jajere, 2019).

No contexto de saúde pública um dos maiores desafios é o controle de *Salmonella* Enteritidis (Rabello, 2020). Devido a necessidade de produzir carne de frango para mercado interno e mercado externo, a densidade de aves tem sido cada vez maior e a implementação de outros sistemas de criação, como o vertical, tem facilitado a propagação desse sorovar em granjas (Bailey, 1988; Velge *et al.*, 2005). Além da possibilidade de contaminação dos ovos, há aumento da proliferação do patógeno, causando uma consequente infecção em humanos (Foley *et al.*, 2011).

O maior desafio encontrado na avicultura são sorotipos de *Salmonella* que infectam as aves. São animais que se mostram assintomáticos dentro da granja, porém tem uma facilidade muito grande de disseminar o patógeno (Duchet-Suchaux *et al.*, 1997). Aves e seus produtos são potenciais carreadores de *Salmonella*, representando até 58% dos casos de salmonelose (Painter, 2013; Bearson, 2017). Podemos citar três tipos distintos que podem acometer as aves, *Salmonella* Gallinarum responsável por causar o tifo aviário, *Salmonella* Pullorum, causando a pulorose e outros sorotipos que não são específicos de aves, porém podem causar o paratifo aviário nesses animais (Freitas Neto *et al.*, 2020). Um estudo realizado na China por Gong e colaboradores (2014) identificou a *Salmonella* como um patógeno presente em grande frequência nas criações de aves comerciais. A pesquisa mostrou a prevalência de *Salmonella* em 12,4% em gansos, 6,8% em patos, 10,4% em perus e 9,8% em galinhas, sendo o último grupo, relacionado com mais de 20 sorovares distintos (Gong *et al.*, 2014).

2.3 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

O aumento da resistência bacteriana aos antibióticos utilizados na medicina veterinária e a transferência horizontal de genes de resistência entre as enterobactérias representam uma ameaça mundial (OMS, 2017). Estima-se que a mortalidade anual por infecções bacterianas causadas por microrganismos

multirresistentes afete 10 milhões de pessoas em 2050, se não forem adotadas medidas de uso prudente (O'Neill, 2014). O uso prudente de antibióticos faz parte dos programas governamentais da maioria dos países produtores e exportadores de carne e determina que as classes de antimicrobianos classificados como “criticamente importantes” na medicina humana não devem ser compartilhadas na medicina veterinária (OMS, 2017). Com o aumento do uso imprudente dos antibióticos, a busca por outros antimicrobianos cresceu, devido a dificuldades de encontrar alternativas para tratamento de outras doenças que não salmonelose, precisando encontrar associações para um resultado positivo (Glenn *et al.*, 2011).

Uma das características de infecções por *Salmonella* é sua capacidade autolimitante, permitindo muitas vezes que não haja a necessidade do uso de antimicrobianos. Porém, na medicina humana, pacientes imunodeprimidos, crianças e idosos, devem aderir ao uso de determinadas drogas para não agravar as consequências do quadro, progredindo para o óbito (San Martin *et al.*, 2005; Butaye *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2010; Foley *et al.*, 2011).

Por anos, como tratamento de eleição, foi recomendado o uso de ampicilina, cloranfenicol e sulfametoxazol-trimetoprim, porém, devido ao aumento da resistência e o aparecimento de estirpes bacterianas multirresistentes - MDR, as fluorquinolonas e cefalosporinas de amplo espectro tomaram espaço, e passaram a ser mais utilizadas (Carramiñana *et al.*, 2004; Butaye *et al.*, 2006; Jajere, 2019). O primeiro relato de *Salmonella* MDR reportado foi em 2003, apresentando infecções em humanos adquiridas pela ingestão de alimentos contaminados de origem animal (Jajere, 2019). Em relatos recentes, já foram reportadas estirpes de *Salmonella* carreando genes de resistência a colistina mediados pelo gene *mcr-1*, alertando a emergência para o uso racional de antibióticos (Doumith *et al.*, 2016; Pornsukarom *et al.*, 2018). O mesmo ocorre no gene *qnr*, que confere resistência a fluorquinolonas mediado por um plasmídeo, já reportado em estirpes de *Salmonella* em 2013 (Rabello *et al.*, 2020).

A emergência de salmonelas resistentes pode estar relacionada a mutações das estirpes, ou da dispersão de elementos genéticos móveis por meio da conjugação de plasmídeos, ou da aquisição de genes por via horizontal associada à transformação bacteriana, presença de transposons, integrons e bacteriófagos (Cogliani *et al.*, 2011). Nas últimas décadas, a resistência de *Salmonella* no Brasil

indicou ampicilina como o antimicrobiano menos suscetível, seguido pelas cefalosporinas de primeira e segunda geração, sulfonamidas, tetraciclina e nitrofurantoínas (Oliveira *et al.*, 2005). Porém um estudo realizado por Penha-Filho e colaboradores (2019) relata um perfil diferente de resistência em amostras de São Paulo e Goiás, apresentando uma maior prevalência de quinolonas em comparação com tetraciclina e sulfonamidas.

Em salmonelas, os mecanismos de multirresistência são amplamente estudados. Alguns sorotipos apresentam habilidade de carrear plasmídeos contendo genes que conferem resistência ao cloranfenicol, tetraciclina, ampicilina e estreptomicina (Guerra *et al.*, 2001; 2002). Nos estudos recentes, *Salmonella* aparece com um grande potencial de carrear plasmídeos de cefalosporinas de espectro estendido, incluindo ceftriaxona, dificultando o tratamento humano devido ao mecanismo de inativação do antibiótico feito por hidrólise de enzimas (Nair *et al.*, 2018). Outra característica importante é o aparecimento de estirpes ESBL, beta-lactamases de espectro estendido, conhecidas também como CTX-M. Comumente está sendo reportado estirpes que conferem transferência de genes ESBL CTX-M via conjugação de plasmídeos e transposons (Nair *et al.*, 2018).

Sainderberg e colaboradores (2022) identificaram isolados de *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Minnesota em aves, com perfil de multirresistência e portadoras de genes de resistência à cefalosporinas de terceira geração e fluorquinolonas, reforçando os riscos à saúde humana. Na medicina veterinária, o uso de antimicrobianos é atualmente restrito ao tratamento e profilaxia de doenças e a limitação do uso de medicamentos disponíveis no mercado pretende contribuir para diminuição da resistência de bactérias (Vinueza-Burgos *et al.*, 2016).

A hipótese de que o uso de promotores de crescimento em animais tenha relação com a emergência de bactérias multirresistentes determinou a proibição do uso de antibióticos como aditivos melhoradores de desempenho em alguns países, tornando-se uma barreira comercial (WHO, 2012; Shi *et al.*, 2019). Esta proibição, aliada à pressão da opinião pública, estimulou pesquisas de produtos substitutos, como por exemplo, os probióticos, prebióticos, enzimas e ácidos orgânicos (Wang *et al.*, 2016; Mohammadagheri *et al.*, 2016; Huff *et al.*, 2015; Nair *et al.*, 2018). Dentre as substâncias naturais encontradas, os peptídeos e proteínas se destacam devido a

facilidade de serem encontrados na natureza e pertencerem ao sistema imune de qualquer organismo (Kamysz, 2005).

2.4 DIAGNÓSTICO DE SALMONELOSES

Os métodos diagnósticos para identificação do gênero *Salmonella* ainda são os convencionais, baseados em cultura e isolamento do patógeno utilizando meios de cultura seletivos (Paniel, Nogueira, 2019). A amostra é previamente enriquecida com água peptonada e inoculada em caldo tetracionato para diminuir a carga microbiológica e selecionar o agente em pesquisa. Posteriormente, a amostra é semeada em ágar seletivo e após apresentar morfologia característica do agente, é submetida a confirmação pelo método sorológico (Ferrati *et al.*, 2001).

A preconização exigida pela Secretaria de Vigilância e Saúde exige como método diagnóstico o isolamento microbiológico e caracterização bioquímica do agente, porém o tempo gasto para obtenção de um resultado pode permitir a disseminação do patógeno para todo o lote em questão devido a sua fácil disseminação propagação bacteriana (Rubio, 2017). A vantagem dessa técnica é o baixo custo por amostra e a rápida classificação por coloração e morfologia das colônias (Paniel, Nogueira, 2019).

Outra desvantagem apresentada pelo método convencional é a possibilidade de contaminação da amostra e a presença de bactérias viáveis, mas não cultiváveis, que dificultam o isolamento da *Salmonella* (Oliver *et al.*, 2010; Ayrapetyan, Oliver, 2016). Essas bactérias podem aparecer como contaminantes devido a condições ambientais e de estresse, como alteração na temperatura, anoxia, salinidade e pH, sendo necessária a utilização de técnicas de desinfecção em alimentos (Li *et al.*, 2014), devido ao risco para consumo humano (Fakruddin *et al.*, 2013); necessitando metodologias mais robustas, com técnicas automatizadas e semiautomatizadas, utilizando DNA e anticorpos combinados com as técnicas bioquímicas (Paniel, Nogueira, 2019).

Testes imunológicos são recomendados para detecção de *Salmonella* por serem rápidos e específicos, porém apresentam baixa sensibilidade ao agente e baixa afinidade com o anticorpo quando há presença de contaminantes. Entre os ensaios imunológicos (IA) existentes, que permitem a identificação da célula bacteriana ou

células marcadas específicas (Brandão *et al.*, 2015), pode-se destacar para detecção de *Salmonella* o Imunoensaio Enzimático (EIA) (Sun *et al.*, 2015), Ensaio Imunoenzimático indireto (ELISA) (Schneid *et al.*, 2006), Análise por Injeção de Fluxo (FIA) (Abdel-Hamid *et al.*, 1999), Teste Imuno-cromatográfico (Xia *et al.*, 2016) e Separação Imuno-magnética (IMS) (Leon-Velarde *et al.*, 2009).

Métodos moleculares como PCR podem ser uma ótima opção, levando em consideração a especificidade e sensibilidade ao agente, além da rapidez, acurácia e a possibilidade de rodar uma quantidade maior de amostras ao mesmo tempo. (Paniel, Nogueira, 2019). Na detecção de *Salmonella* podem ser utilizados os métodos de PCR convencional, PCR real-time, PCR multiplex e RT-PCR (Oliveira *et al.*, 2002). Técnicas mais novas para detecção do agente como o sequenciamento de nova geração e o sequenciamento do genoma total, vêm revolucionando a rotina dos laboratórios, permitindo a caracterização de estirpes (Bell *et al.*, 2016).

Uma série de outros métodos como contagem de células, bioluminescência (Boer, Beumer, 1999), biosensores e biomarcadores têm surgido como alternativa para o diagnóstico, porém as técnicas de cultura e isolamento e bioquímicas convencionais, os métodos de PCR e as técnicas imunológicas ainda são o “*Gold Standard*” (Paniel, Nogueira, 2019).

2.5 CONTROLE DE INFECÇÕES POR *Salmonella* EM AVES

As ações de controle e monitoramento de salmonelas nas granjas no Brasil seguem condições impostas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), previstas no Programa Nacional de Sanidade Avícola - PNSA. Medidas diferem nas granjas comerciais de corte e reprodução e estabelecimentos de abate registrados pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) (Brasil, 1994).

As medidas específicas de controle de salmoneloses se baseiam em duas instruções normativas. A Instrução Normativa Nº78, de 03 de novembro de 2003, determina que granjas avícolas de reprodução devem realizar um controle sanitário periódico de salmonelas que são de importância na saúde pública e animal, sejam estabelecimentos permanentes ou eventuais. Todo esse controle é realizado pelo MAPA e laboratórios credenciados para certificação de Estabelecimento Avícola Livre de *Salmonella Gallinarum* e *S. Pullorum* e Livres ou Controladas para *Salmonella*

Enteritidis e *S. Typhimurium*. A Instrução Normativa Nº20, de 21 de outubro de 2016, prevê o controle e monitoramento de *Salmonella* spp. em estabelecimentos comerciais de corte de frangos e perus, estabelecimentos de abate de galinhas, frangos, perus de corte e reprodução registrados no SIF, com o objetivo de reduzir a prevalência de *Salmonella* spp., visando a proteção da saúde do consumidor.

Devido aos problemas com a saúde pública e animal e a rápida disseminação do patógeno, podendo infectar facilmente tanto os sistemas orgânicos – não convencionais quanto os sistemas convencionais de criação (Dibner, 1998), comercialmente, são encontradas vacinas para alguns sorovares de *Salmonella*. A utilização de vacinas para aves comerciais apresenta variáveis de acordo com o estabelecimento referido. Condições impostas pelo MAPA visam o uso de vacinas inativadas para matrizes e é vedado o uso de qualquer tipo de vacina em avoseiros, bizavoseiros e granjas de seleção de reprodutoras primárias de linhagem puras, segundo a IN78. A vacinação para controle de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* é possível nos setores de postura e nas matrizes, mas esta vacinação não reduz a presença de salmonelas com outras variantes antigênicas, e apresentam pouca ou nenhuma eficácia para o controle de outros sorovares (Gast, 2007).

Os planos de controle de *Salmonella* nos últimos anos foram implementados devidos a alta demanda da produção de carne de frango. Uma gama de opções que pudessem reduzir as doenças entéricas em aves e a presença do agente em carne de frango apareceram com grande ascensão no mercado (Patterson, Burkholder, 2003). Alternativas de tratamentos das salmoneloses têm sido cada vez mais estudadas diante do aumento da resistência antimicrobiana. Estudos recentes mostram a implementação do uso de prebióticos, probióticos, componentes derivados de plantas como óleos essenciais e ácidos orgânicos como substituição do uso de antibióticos (Nair *et al.*, 2018), que permitem a modulação do intestino das aves promovendo proteção da colonização de *Salmonella*, seja produzindo substâncias antimicrobianas, estimulando o sistema imune quanto competindo por nutrientes (Dibner, 1998).

Prebióticos são conhecidos por serem carboidratos não digestíveis que promovem o crescimento de bactérias benéficas ou da microbiota e promovem a produção de cadeias de ácidos graxos e o crescimento de bactérias intestinais como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Tran *et al.*, 2016; Nair *et al.*, 2018). Suas principais

funções são modular os microrganismos do intestino, estimular o sistema imune do hospedeiro e reduzir os fatores de virulência presentes nos patógenos (Tran *et al.*, 2016; Nair *et al.*, 2018). Características importantes dos prebióticos permitem a redução de danos no trato gastrointestinal, como a presença de um regulador de microbiota, não permitindo a colonização de uma grande quantidade de bactérias benéficas formadoras de ácido láctico, que por sua vez, podem promover a formação de biofilme, facilitando a adesão de agentes patogênicos e sua proliferação; além de um revestimento epitelial que facilita a adesão de patógenos na sua superfície, devido a presença de radicais glicosilados (Tran *et al.*, 2016). Para *Salmonella* Typhimurium, um dos mecanismos utilizados pelos prebióticos é a regulação de fatores de expressão de adesinas e fatores de virulência. Eles agem através de produtos finais de fermentação, como ácido acético e ácido propiônico, para inibir a expressão de fatores de adesinas e também a invasão desse sorovar (Tran *et al.*, 2016).

A utilização de probióticos visa a manutenção da microbiota animal, agindo como inibidor dos efeitos de patógenos (Patterson & Burkholder, 2003), utilizando agentes como *Bacillus subtilis*, cepas de *Lactobacillus*, *Saccharomyces* spp. e *Aspergillus oryzae*. Esses microrganismos possuem propriedades antimicrobianas que combatem diretamente estirpes de *Salmonella* spp. (Nair *et al.*, 2018). Comumente conhecidos e já implementados no mercado, é possível encontrar probióticos classificados como bactérias ácido-láticas e sua interação com a microbiota benéfica do hospedeiro, como espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Patterson, Burkholder, 2003) e uma gama de produtos probióticos que não são encontrados na microbiota, como *Saccharomyces boulardii* tendo efeito em infecções por *Escherichia coli* em humanos (Tellez *et al.*, 2012). De acordo com a microbiota de cada espécie, é possível direcionar o uso dos probióticos para limitar a população de *Salmonella* spp. no intestino das aves (Nakphaichit *et al.*, 2011).

Óleos essenciais possuem propriedades naturais extraídas de plantas e podem servir como uma alternativa no uso de antimicrobianos. Estudos relatam o uso eficaz de óleos quando empregado em metodologias de micro diluição (Burt, 2004). Tran e colaboradores (2012) relataram que cinamaldeído e eugenol obtiveram bons resultados na colonização de *Salmonella* em camas de frangos, reduzindo genes de motilidade e invasão. Um outro estudo apresenta uma redução significativa de estirpes multirresistentes de *S. Typhimurium* em suínos com o uso de óleo de canela e extrato

de oliva (Chen *et al.*, 2013). Uma das desvantagens no seu uso são o impacto negativo em relação as qualidades organolépticas, podendo reduzir o consumo do alimento.

O uso de ácidos orgânicos também se tornou uma alternativa para redução da carga microbiana. Ele propriamente não é utilizado como um antibiótico, porém seu uso na dieta auxilia a redução de microrganismos no trato gastrointestinal das aves, servindo como um aliado na conversão alimentar e no ganho de peso (Paul *et al.*, 2007). Devido a isso, os ácidos orgânicos se encontram em ascensão nos estudos, atuando com grande eficácia em estirpes de *Salmonella* spp. Podem ser encontrados nos ácidos fórmico, ácido acético, ácido propiônico e ácido sórbico e aumentam seus efeitos. Interações entre ácidos orgânicos e probióticos promovem maior eficácia na redução de microrganismos (Gunal *et al.*, 2006).

2.6 LISOZIMA

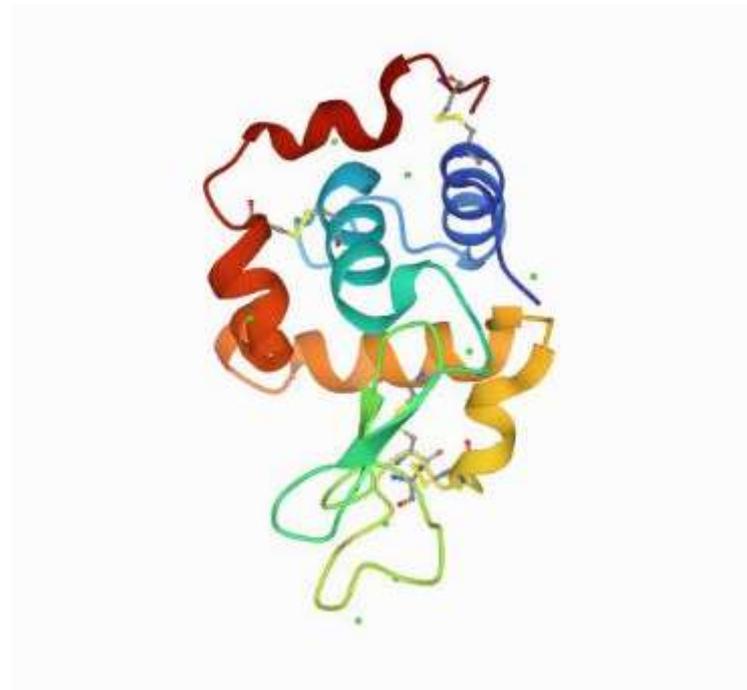
Descoberta por Alexander Fleming em 1922, a lisozima se tornou um dos componentes enzimáticos mais estudados. Presente no sistema imune inato dos animais e seres humanos, as lisozimas, podem ser usadas como alternativa para inibição de bactérias. A lisozima ou 1,4- β -N-acetilmuramidase é uma enzima natural, de estrutura globular, com importante papel na defesa contra microrganismos patogênicos (Marana *et al.*, 2006).

A lisozima é utilizada com frequência na indústria alimentar, principalmente para prevenção de *Clostridium tyrobutyricum* (Wasserfall & Teuber, 1979), devido a sua atividade antimicrobiana natural (Lima, 2017). Também é apresentada comercialmente como enzimas alimentares utilizadas em vinhos, pães, sucos e óleos; enzimas de alimentação animal e enzimas técnicas utilizadas em detergentes, produtos têxteis e de cuidados pessoais (Cherry, Fidantsef, 2003; Silva, 2019). É um dos poucos antimicrobianos naturais aprovados e liberados para uso regular nos alimentos, principalmente carnes e queijos (Nattress *et al.*, 2001).

Encontrada em diversos fluídos corporais como lágrima e saliva, possui diversas funções, sendo uma delas a antibacteriana (Sahoo *et al.*, 2012; Gong *et al.*, 2014). Seu mecanismo de ação é pela via não-enzimática, na presença de atividade de peptídeos catiônicos antimicrobianos e propriedades hidrofóbicas que induzem a morte celular por alteração na membrana (During *et al.*, 1999; Bao *et al.*, 2018).

Como estrutura primária da lisozima há uma única cadeia polipeptídica constituída de 129 aminoácidos, contendo 4 pares de cisteínas ligados por uma ponte dissulfídica ao longo dela (Medeiros *et al.*, 2017), e com massa molecular em torno de 14 kDa (Lima, 2017), podendo variar de 11 kDa a 25 kDa (Silva, 2019). Composto por 3 componentes estruturais: o primeiro é constituído por três extensões de α -hélice, o segundo componente é uma folha pregueada anti-paralela, já o terceiro é constituído de uma sequência dobrada de forma aleatória (Torreggiani *et al.*, 2005). Naturalmente encontrada em ovos, leite de vaca e colostro, além de verduras como couve-flor e repolho (Masschalck *et al.*, 2001). Presente no sistema defensivo de diversos organismos como fungos, protozoários, vertebrados e invertebrados (Callewaert *et al.*, 2008). Aparece em abundância na albumina dos ovos de galinha (Figura 1), e é extraída comercialmente e utilizada como preservativo natural de alimentos, na prevenção da colonização de patógenos e formação de biofilme de algumas bactérias (Brower *et al.*, 1998; Losso *et al.*, 2000).

Figura 1. Estrutura cristalográfica da lisozima do ovo de galinha - tipo c, através da difração de raio-x com resolução de 1,29Å.



Fonte: Carpentier *et al.* (2010).

Possui atividade bactericida e bacteriostática em bactérias gram positivas. Cepas de *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, por exemplo,

apresentam sensibilidade a lisozima devido a modificações na camada de peptidoglicano (Bao *et al.*, 2018), entretanto sua ação em bactérias gram negativas é limitada, devido a constituição da parede celular bacteriana, que previne o acesso da lisozima devido a barreira de membrana externa (Vanderkelen *et al.*, 2012).

Sua ação provoca a lise da parede, destruindo a ligação glicosídica entre o ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina no peptidoglicano da bactéria, um componente importante da parede celular (Pellegrini *et al.*; 2000; Sahoo *et al.*, 2012; Gong *et al.*, 2014). Como a constituição da parede celular das bactérias gram negativas possui somente uma camada de peptidoglicano e uma membrana interna com lipopolissacarídeo, normalmente não são suscetíveis a lisozima, apresentando alta especificidade e potentes inibidores contra ela (Callewaert *et al.*, 2012), entretanto algumas lisozimas têm sido alteradas por técnicas como fermentação para atuação em bactérias gram negativas (Ellison III; Giehi, 1991; Sahoo *et al.*, 2012; Bao *et al.*, 2018), e a utilização de EDTA para desestabilização da membrana externa de proteção dessas bactérias (Branen & Davidson, 2004; Callewaert *et al.*, 2011).

Além da ação antimicrobiana, a lisozima também pode agir como um anti-inflamatório, inibindo a quimiotaxia de leucócitos ativados e interagindo com o sistema complemento de maneira indireta (Ogundele, 1998). Entre outras funções, também possui propriedades antivirais, antissépticas, antineoplásicas e anti-histamínica (Wu *et al.*, 2016; Pereira, 2019).

As lisozimas descritas em literatura são divididas de acordo com a sequência de aminoácidos presentes e suas propriedades bioquímicas. A *c-type* (*chicken type* ou convencional), *g-type* (*goose eggs type*), *i-type* (*invertebrate type*). (Callewaert *et al.*, 2011), lisozima de fagos, semelhante a *c-type* estruturalmente, lisozima bacteriana ou de fungos e lisozima das plantas (Silva, 2019). Animais vertebrados apresentam genes tanto para o *c-type* quanto o *g-type* (Vanderkelen *et al.*, 2012). A expressão do gene *c-type* ocorre para controle de hormônios esteroidais dentro do oviduto das galinhas, que pode ser melhorada na presença de lipopolissacarídeos bacterianos (Myers *et al.*, 2006).

Trabalhos recentes mostram a utilização da lisozima como um promotor de crescimento. Liu e colaboradores (2010) realizaram um experimento em que frangos de corte apresentaram uma melhor taxa na conversão alimentar após o fornecimento

de lisozima via oral, devido à redução de *Clostridium perfringens* no trato gastrointestinal, inibindo também o crescimento de *Escherichia coli* e *Lactobacillus* no íleo desses animais. Em contrapartida, Amit-Romach e colaboradores (2004) relataram o uso de lisozima para redução da população de seis grupos de microrganismos, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* e *Clostridium* spp. também em frangos de corte, e como resultado do experimento, não obtiveram diminuição no número de bactérias com adição da lisozima na dieta das aves. Não há relatos do uso de lisozimas para redução da colonização de *Salmonella* Minnesota e *S. Heidelberg* em frangos de corte.

3. OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito bactericida da lisozima sobre estirpes de *Salmonella* spp. isoladas de aves comerciais.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Isolar e identificar os sorovares de *Salmonella* spp. em 4 integrações dos estados de São Paulo (SP) e Minas Gerais (MG);
- b) Determinar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana pelo método de Concentração Inibitória Mínima (CIM);
- c) Avaliar o efeito bactericida *in vitro* da lisozima, por meio da determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM);
- d) Estabelecer uma curva de morte bacteriana dos isolados de *Salmonella* spp. após a exposição à lisozima;
- e) Avaliar o efeito da lisozima *in vivo* sobre a colonização intestinal de frangos de corte experimentalmente desafiados com *Salmonella* Heidelberg.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram analisadas 400 amostras de fezes de frangos provenientes de quatro integrações da região sudeste do Brasil (estados de São Paulo e Minas Gerais). As integrações de tamanho médio (abate aproximado de 100.000 a 150.000 aves/dia) foram escolhidas por conveniência de acordo com a disponibilidade em compartilhamento de dados e localização. Destas integrações foram selecionados de forma aleatória 20 (vinte) galpões em cada uma delas e coletadas amostras de fezes de 5 (cinco) aves por galpão, totalizando 400 amostras. As amostras foram coletadas em suabes estéreis e encaminhadas refrigeradas para o Laboratório de Medicina Aviária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo (CEUA 8036250718).

4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

Os suabes de fezes foram incubados em água peptonada por 24h a 37°C e posteriormente, em caldo Tetrionato de sódio por 24h a 37°C. Todas as amostras foram semeadas em ágar XLT4 para identificação de colônias enegrecidas por 24-48 horas a 37°C. Uma segunda confirmação foi realizada em ágar seletivo, Chromagar *Salmonella*, selecionando as colônias de coloração rosa-púrpura, seguindo as recomendações do fabricante. Todas as colônias características foram estocadas e posteriormente submetidas a identificação pela técnica de espectrometria de massa – MALDI-TOF MS, uma técnica aprovada para identificação do gênero *Salmonella*, segundo Mor (2019).

Para a identificação, as colônias estocadas foram semeadas em ágar TSA (Difco Bacto Tryptic Soy Agar) e incubadas por 24 horas a 37°C. Foi selecionada uma colônia deste cultivo, adicionada em um microtubo de 1,5mL contendo 300 µL de H₂O MiliQ. Foram adicionados 900 µL de etanol absoluto para suspensão das bactérias e o microtubo foi agitado e centrifugado por 2 minutos à 12.800 xg, descartando o sobrenadante. Foi feita uma secagem completa do microtubo por 24 horas em temperatura ambiente, com posterior adição de 30 µL de ácido fórmico 70% e 30 µL

de acetonitrila (100%). A mistura foi novamente centrifugada a 13.000 xg por 2 minutos e o sobrenadante foi estocado a -20°C até o processamento final das amostras.

O teste foi realizado em um espectrofotômetro de massa *Microflex™* (*Burker Daltonik*). Para realização da leitura, 1 µL de suspensão proteica foi transferido para a placa de aço inox polido com 96 poços. Após a secagem em temperatura ambiente foi adicionado sobre a amostra 1 µL da matriz (10 mg de ácido a-ciano-4-hidroxi-cinâmico ml⁻¹ em acetonitrila a 50% / ácido trifluoroacético a 2,5%). Cada estirpe foi distribuída em duplicata, com duas leituras por placa, para a captura dos espectros proteicos foi utilizado o programa *FlexControl™* (*Burker Daltonik*) pelo método MTB_autoX.

A identificação bacteriana foi realizada com auxílio do programa *BioTyper™* (*MALDI Biotyper CA Systems 3.0 Burker Daltonik*), utilizando as configurações padrões, por meio da comparação dos espectros capturados com a biblioteca do fabricante. Foi adotado critérios de interpretação de picos específicos de cada gênero e espécie bacteriana: ≥ 2.0 para atribuição de espécie, ≥ 1.7 e < 2.0 para atribuição de gênero.

4.3 DETERMINAÇÃO DO SOROGRUPO

Os isolados foram enviados ao Laboratório do Instituto Adolfo Lutz (IAL) – São Paulo para realização do teste de soro aglutinação rápida, segundo o esquema de Kauffman-White. As estirpes que não puderam ser tipadas com esta metodologia foram submetidas à análise *in silico* após o sequenciamento de Genoma completo (WGS). Seis estirpes representativas dos sorogrupos identificados foram cultivadas a 37°C por 24 horas em ágar MacConkey. O DNA genômico foi extraído utilizando o kit DNeasy (Qiagen, CA). As concentrações de DNA foram quantificadas usando o espectrofotômetro NanoDrop. Bibliotecas genômicas foram preparadas utilizando o kit Nextera XT (Illumina, Ca). O sequenciamento de Nova Geração foi realizado na Plataforma Illumina MiSeq. Os genomas foram montados usando SPAdes 3.10.1. Os contigs < 200 bp e cobertura < 10 vezes foram excluídos das análises *downstream* (Gurevich *et al.*, 2013; Pornsukarom *et al.*, 2018). A análise *in silico* foi determinada pela ferramenta NASP (Sahl *et al.*, 2016).

4.4 DETECÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA – CIM PARA ANTIMICROBIANOS

O perfil de resistência antimicrobiana foi avaliado por meio da concentração inibitória mínima, utilizando a metodologia de microdiluição em placa de acordo com o protocolo descrito no documento M31-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013a; CLSI, 2013b; CLSI, 2020). O painel utilizado para determinação da CIM foi composto pelos seguintes antibióticos: amoxicilina com ácido clavulânico (0,5mg/L - 64mg/L), ácido nalidíxico (8mg/L - 128mg/L), ampicilina (1mg/mL-64mg/mL), azitromicina (4mg/L - 64mg/L), ceftiofur (0,25mg/L - 8mg/L), ciprofloxacina (0,06mg/L - 8mg/L), cloranfenicol (4mg/L - 64mg/L), colistina (1mg/L - 16mg/L), florfenicol (0,5mg/L - 8mg/L), fosfomicina (8mg/L - 512mg/L), gentamicina (0,5mg/L - 32mg/L), marbofloxacina (0,12mg/L - 8mg/L) meropenem (0,25mg/L - 8mg/L), neomicina (4mg/mL-16mg/mL), oxitetraciclina (2mg/L - 32mg/L), sulfametoxazol-trimetoprim (2mg/L - 76mg/L), sulfonamida (256mg/L - 1024mg/L). Todas as estirpes de *Salmonella* foram inoculadas em duplicata por 24h em 37°C. A figura 2 ilustra a disposição e as concentrações dos respectivos antibióticos utilizados na microplaca.

Para o preparo do inóculo, as estirpes de *Salmonella* spp. foram cultivadas em caldo BHI (Difco) e incubadas por 24h em 37°C. Para ajuste da turbidez do cultivo foi utilizado uma solução salina estéril (0,9%) a fim de obter uma turbidez óptica comparável a da solução padrão de 0,5 McFarland, confirmada, posteriormente, em espectrofotômetro (0,150 a 600nm). Após ajuste do cultivo, a suspensão bacteriana foi diluída na ordem de 1:1000 em caldo Muller Hinton II (Difco), de maneira a obter uma concentração final de, aproximadamente, 5×10^5 UFC/mL. Em cada poço da microplaca foi distribuído 50uL do inóculo. Após a distribuição na placa, a mesma foi selada com adesivo estéril e incubada em 37°C por 24h. Foram utilizados como controle do teste as estirpes de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Os resultados do teste foram interpretados de acordo com os padrões apresentados no Quadro 1.

Figura 2. Distribuição dos antimicrobianos no painel utilizado para realização da CIM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	+	+	-
A	TIO 4	TIO 8	AUG 64/32	AUG 32/16	AUG 16/8	AUG 8/4	AUG 4/2	AUG 2/1	AUG 1/0,5	AZI 64	CHL 64	NAL 128
B	TIO 2	AMP 64	AMP 32	AMP 16	AMP 8	AMP 4	AMP 2	AMP 1	SUL 1024	AZI 32	CHL 32	NAL 64
C	TIO 1	FOS 512	FOS 256	FOS 128	FOS 64	FOS 32	FOS 16	FOS 8	SUL 512	AZI 16	CHL 16	NAL 32
D	TIO 0,5	MERO 8	MERO 4	MERO 2	MERO 1	MERO 0,5	MERO 0,25	MAR 0,06	SUL 256	AZI 8	CHL 8	NAL 16
E	TIO 0,25	MAR 8	MAR 4	MAR 2	MAR 1	MAR 0,5	MAR 0,25	MAR 0,12	STX 4/76	AZI 4	CHL 4	NAL 8
F	CIP 8	CIP 4	CIP 2	CIP 1	CIP 0,5	CIP 0,25	CIP 0,12	CIP 0,06	STX 2/18	NEO 16	NEO 8	NEO 4
G	GEN 32	GEN 16	GEN 8	GEN 4	GEN 2	GEN 1	GEN 0,5	COL 16	COL 8	COL 4	COL 2	COL 1
H	FFN 8	FFN 4	FFN 2	FFN 1	FFN 0,5	OXI 32	OXI 16	OXI 8	OXI 4	OXI 2	POS	POS

Fonte: Franco (2023).

Legenda: TIO – ceftiofur, AUG – amoxicilina com clavulanato, AZI – azitromicina, CHL – cloranfenicol, NAL – ácido nalidíxico, AMP – ampicilina, SUL – sulfonamida, FOS – fosfomicina, MERO – meropenem, MAR – marbofloxacina, STX- sulfametoxazol-trimetoprim, CIP – ciprofloxacina, NEO – neomicina, GEN – gentamicina, COL – colistina, FFN – florfenicol, OXI – oxitetraciclina, POS – positivo.

Quadro 1. Padrões de interpretação da CIM

Antimicrobiano	Concentração Inibitória Mínima			Extensão CIM (mg/mL)
	S	I	R	
Amoxicilina com clavulanato	≤8/4	16/8	≥32	1/0,5-32/64
Oxitetraciclina	≤4	8	≥16	2-32
Ampicilina	≤8	16	≥32	1-64
Ceftiofur	≤2	4	≥8	0,25-8
Ácido nalidíxico	≤16	-	≥32	8-128
Ciprofloxacina	≤0,06	0,12-0,5	≥1	0,06-8
Meropenem	≤1	2	≥4	0,25-8
Marbofloxacina	≤1	2	≥4	0,12-8
Colistina	-	-	≥4	1-16
Gentamicina	≤4	8	>16	0,5-32
Neomicina	-	-	≥8	4-16
Fosfomicina	≤64	128	≥256	8-512
Azitromicina	≤16	-	≥32	4-64
Cloranfenicol	≤8	16	≥32	4-64
Florfenicol	≤4	8	≥16	0,5-8
Sulfonamida	≤256	-	≥512	2-76
Sulfametoxazol-trimetoprim	≤2/38	-	≥4/76	256-1024

Fonte: Franco (2023).

Legenda: S: susceptível; I: intermediário; R: resistente. (CLSI, 2013;2020)

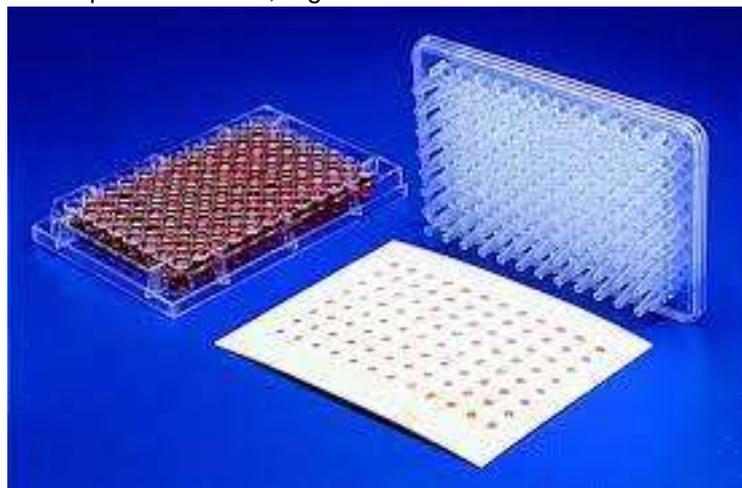
4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DA LISOZIMA

A CBM foi determinada pelo teste de micro diluição em caldo, em placas de 96 poços estéreis, com o fundo “U”, conforme a metodologia recomendada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). Os inóculos foram padronizados pela escala 0,5 de MacFarland.

Os testes foram realizados em duplicata, utilizando uma solução de lisozima em caldo LB (Lúria Bertani) sem sal (pH 4,31), distribuída em placas de 96 orifícios na concentração inicial de 2.000 ppm, seguida de diluição seriada nas concentrações 1.000, 500, 250, 125, 62, 31 e 15 ppm, respectivamente. *Micrococcus luteus* foi utilizado como controle negativo e *Escherichia coli* ATCC 25922 como controle positivo. As placas foram incubadas a 37°C por 24hr.

Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), as placas contendo meio LB foram plaqueados com 10µL de inóculo de cada um dos poços, utilizando um replicador de placas Scienceware® estéril (Figura 3). A leitura do teste foi realizada pela avaliação do crescimento de colônias após 24h de incubação, a 37°C.

Figura 3. Scienceware® replicator 96-well, Sigma



Fonte: Sigma Alderich (2023).

4.6 CURVA DE MORTE BACTERIANA PELO MÉTODO *Time Kill*

O método *Time Kill* ou ensaio de morte bacteriana foi realizado de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M26-A do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 1997). Esse ensaio avaliou o efeito de diferentes concentrações de lisozima, em diferentes tempos, em um intervalo de 24 horas (Klepser *et al.* 1998; Nogueira, 2012).

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços, acrescidos de caldo LB e lisozima, na concentração inicial de 2.000ppm, seguida, respectivamente de diluição seriada nas concentrações 1.000, 500, 250, 125, 62, 31 e 15 ppm. O inóculo foi padronizado seguindo a escala 0,5 de MacFarland, e foi utilizado uma estirpe de *Micrococcus luteus* como controle negativo e uma *Escherichia coli* ATCC 25922 como controle positivo, em todos os ensaios.

As placas foram incubadas a 37°C, e os poços foram plaqueados em tempos definidos, 3h, 6h, 12h e 24h, utilizando o replicador de placas Scienceware® estéril (Figura 3), com alíquotas de 10µL desse inóculo. A leitura do teste foi baseada no crescimento de colônias em placas de LB, após 24h de incubação a 37°C.

As curvas de crescimento foram construídas plotando a contagem média de colônias (log 10 UFC/mL) em função do tempo.

4.7 AVALIAÇÃO DA LISOZIMA NA COLONIZAÇÃO INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE EXPERIMENTALMENTE DESAFIADOS COM S. Heidelberg

O protocolo experimental de desafio de aves foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ-USP, sob o nº 7091130921. O experimento foi realizado no Centro de Patologia Aviária CEPA-VPT-FMVZ-USP, com duração de 3 semanas.

4.7.1 Amostra bacteriana

Foi utilizada uma cepa multirresistente de *Salmonella* Heidelberg (SH), selecionada pelos dados de sequenciamento do genoma total. A cepa foi cultivada em caldo BHI, incubado a 37°C por 18 horas. O inóculo foi padronizado na concentração

de 1×10^5 UFC/mL em tampão salina fosfato pH 7.2 e mantido em refrigeração até o momento da inoculação.

O número de UFC foi determinado através de diluições decimais em solução tampão de PBS com pH 7.2. Todas as determinações bacterianas foram realizadas pelo plaqueamento de 0,1mL das suspensões (BHI) e respectivas diluições decimais (PBS), em duplicata de ágar XLT4. A leitura das placas foi feita após incubação a 37°C por 24-48 horas.

4.7.2 Aves e instalações

Um total de 72 pintinhos de corte machos da linhagem Cobb foram adquiridos de um incubatório e alojados no primeiro dia de vida. Todas as aves foram analisadas no primeiro dia para a presença de *Salmonella* spp. no mecônio.

As aves foram alojadas, de modo randômico, em boxes com área de 1,2 m², forrados com cama de maravalha e equipados com bebedouro pendular, comedouro tubular e campânula de aquecimento. Antes do alojamento das aves, as instalações foram submetidas à lavagem, desinfecção e vazio sanitário de 15 dias.

As aves foram alimentadas com ração comercial e tiveram acesso à água potável *ad libitum*. Todas as medidas de biossegurança foram adotadas para impedir a transmissão horizontal entre os grupos.

4.7.3. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi casualizado com três tratamentos e três repetições de oito aves por grupo, conforme o seguinte protocolo.

T1 - Controle negativo: total de 24 aves divididas em 3 grupos de 8 aves, que não receberam a liozima e foram inoculadas com 0,5 mL de PBS no 2º dia de vida, via gavagem.

T2 - Controle positivo: total de 24 aves divididas em 3 grupos de 8 aves que foram inoculadas com 0,5 mL de inóculo de SH no 2º dia de vida, via gavagem.

T3- Grupo de tratamento: total de 24 aves divididas em 3 grupos de 8 aves que foram inoculadas com 0,5 mL de inóculo de SH no 2º dia de vida, via gavagem. Estas aves

foram tratadas a partir do 3º dia de vida com 0,5 mL de lisozima na dose de 1.000 ppm, via gavagem, durante 3 semanas.

4.7.4 Análise microbiológica de determinação de *Salmonella*

Nos dias 2, 5, 7, 14 e 18 foi realizada a colheita de suabes cloacais de quatro aves por repetição, de todos os tratamentos, para pesquisa de SH.

A análise de suabe cloacal foi realizada de acordo com a Instrução Normativa nº126, de 03 de novembro de 1995 e Instrução Normativa nº62, de 6 de agosto de 2003 do MAPA. As fezes foram coletadas com suabes estéreis, com incubação em solução salina peptonada tamponada 1% à 37°C por 24 horas. Após esse período a amostra foi enriquecida em caldo Tetracionato na proporção 1:20, com incubação a 37°C por 24 horas. As amostras foram cultivadas em ágar XLT4, incubados por 24 horas em estufa a 37°C. As amostras que apresentaram colônias com morfologia típica de *Salmonella* foram consideradas positivas.

No 21º dia de vida as aves foram eutanasiadas para a quantificação microbiológica de SH no ingluvío e nos cecos. O ingluvío e um dos cecos foram removidos com pinças e tesouras estéreis, pesados em sacos plásticos estéreis e macerados. Foi adicionado água peptonada na proporção 1:10, obtendo-se a diluição 10^{-1} . Após a homogeneização do conteúdo, foi retirado 1mL para realização de diluições seriadas até o tubo 10^{-8} , em tubos contendo 9mL de PBS.

O plaqueamento foi realizado com 100 µL de cada diluição, em duplicata, em placas de ágar XLT4, incubadas a 37°C por 24-48 horas.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística do desafio *in vivo*, foram construídos 2 bancos de dados, sendo um para a frequência de animais positivos ou negativos durante as avaliações microbiológicas nos dias 2, 5, 7, 14 e 18 dias (análise qualitativa nominal) e outro banco de dados referente à contagem bacteriana e frequência de positividade do 21º. dia (análise qualitativa nominal e qualitativa contínua).

Todos os testes realizados levaram em consideração um α bidirecional (p-valor) de 0,05 e intervalo de confiança (IC) de 95% e foram realizados com apoio computacional dos softwares R (R Core Team, 2020) ou IBM SPSS *Statistics* para Windows, versão 25 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA).

Os dados foram descritos com frequência e intervalo de confiança para variáveis qualitativas e com medidas de tendência central (média e mediana) e medidas de dispersão (desvio padrão, intervalo interquartil, mínimo e máximo) para dados quantitativos. A existência de associação entre as variáveis qualitativas foi testada com qui-quadrado com correção de Yates. A associação entre variáveis quantitativas e grupo de tratamento foi avaliada com teste de Kruskal-Wallis e o teste de *post-hoc*, quando associação significativa, com o Teste de Dunn.

A relação da variável grupo de tratamento com a tendência temporal da positividade dos animais foi avaliada pelo teste estatístico ANOVA não paramétrica (Brunner, Domhof, Langer, 2002), implementada no pacote nparLD (Kimihiro *et al.* 2012).

Os dados de resistência antimicrobiana (CIM) foram agrupados em um dendrograma, utilizando o software Bionumerics versão 8.0 (Applied Maths – Bélgica).

5. RESULTADOS

5.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES

Das 400 amostras de fezes processadas foram isoladas 44 estirpes com morfologia compatível com *Salmonella* spp em ágar XLT4 e no Chromagar *Salmonella*. Todas as estirpes foram submetidas à identificação de gênero/espécie pela metodologia do MALDI-TOF MS, apresentando resultados de escore entre 1.8 e 2.1 na espectrometria de massa. De acordo com os dados obtidos pela metodologia, os 44 isolados foram identificados como *Salmonella enterica*, e a frequência de ocorrência de *Salmonella* spp. nas granjas analisadas foi de 11,5%. A Tabela 1 apresenta o percentual de isolamento em cada integração, e os dados de sorotipagem. Dos 44 isolados, 28 (64%) foram identificadas como S. Heidelberg e 16 (36%) como S. Minnesota. S. Heidelberg estava presente em 3/4 integrações no estado de SP e S. Minnesota em 1/4 integração em Minas Gerais.

Tabela 1. Estirpes positivas para *Salmonella* spp. em amostras coletadas de granjas de São Paulo e Minas Gerais, 2020.

Integração	Localização	Positividade para <i>Salmonella</i> spp.	Sorovar
1	São Paulo	9/100 (9%)	S. Heidelberg
2	São Paulo	8/100 (8%)	S. Heidelberg
3	Minas Gerais	16/100 (16%)	S. Minnesota
4	São Paulo	11/100 (11%)	S. Heidelberg
Total		44/400 (11,5%)	

Fonte: Franco (2023)

As 44 estirpes de *Salmonella* spp. foram submetidas ao teste de microdiluição em caldo para determinação da sensibilidade antimicrobiana. Os resultados da CIM, CIM 50% e CIM 90% frente aos 17 antimicrobianos testados podem ser observados na Tabela 2. As estirpes resistentes estão destacadas em vermelho na tabela. Os maiores índices de resistência foram observados para sulfonamidas e oxitetraciclina, com 97,7% e 95,4%, respectivamente. Entretanto, a associação de sulfametoxazol com trimetoprim resultou em 100% de sensibilidade. Também não se observou resistência para fosfomicina, florfenicol e meropenem.

Para o grupo dos beta-lactâmicos foram testados os antibióticos: ampicilina, amoxicilina com clavulanato e ceftiofur. As estirpes apresentaram 75% de resistência para ampicilina e 56,8% para a amoxicilina com clavulanato, ambas com CIM90 de 64 µg/mL. Para o ceftiofur as estirpes apresentaram 36,6% de resistência, com CIM50 e CIM90 entre 2µg/mL e 8µg/mL, respectivamente.

Para a classe das quinolonas, um total de 63,6% das estirpes apresentou resistência ao ácido nalidíxico, sendo também 59% destes isolados resistentes à ciprofloxacina, com CIM50 e CIM90 entre 1 e 2 µg/mL, respectivamente. No entanto, a marbofloxacina demonstrou boa atividade antimicrobiana e apenas 2,2% dos isolados foram classificados como resistentes.

Os aminoglicosídeos testados foram a neomicina e a gentamicina, com taxas de resistência de 34% e 18,1% respectivamente. A CIM50 e CIM90 variou de 8 a 16 µg/mL, para neomicina e de 16 a 32 µg/mL para gentamicina.

Destaca-se ainda a taxa de resistência de 25% para o macrolídeo azitromicina, com CIM90 de 32 µg/mL. Menores taxas de resistência foram observadas para colistina e cloranfenicol, com índices de 4,5% para ambos.

A comparação entre as diferentes classes avaliadas revelou que 97,72% das estirpes analisadas apresentou resistência múltipla aos antibióticos (MDR), com resistência a três ou mais antibióticos de classes distintas. Apenas uma estirpe foi resistente a duas classes de antimicrobianos (sulfonamidas e quinolonas).

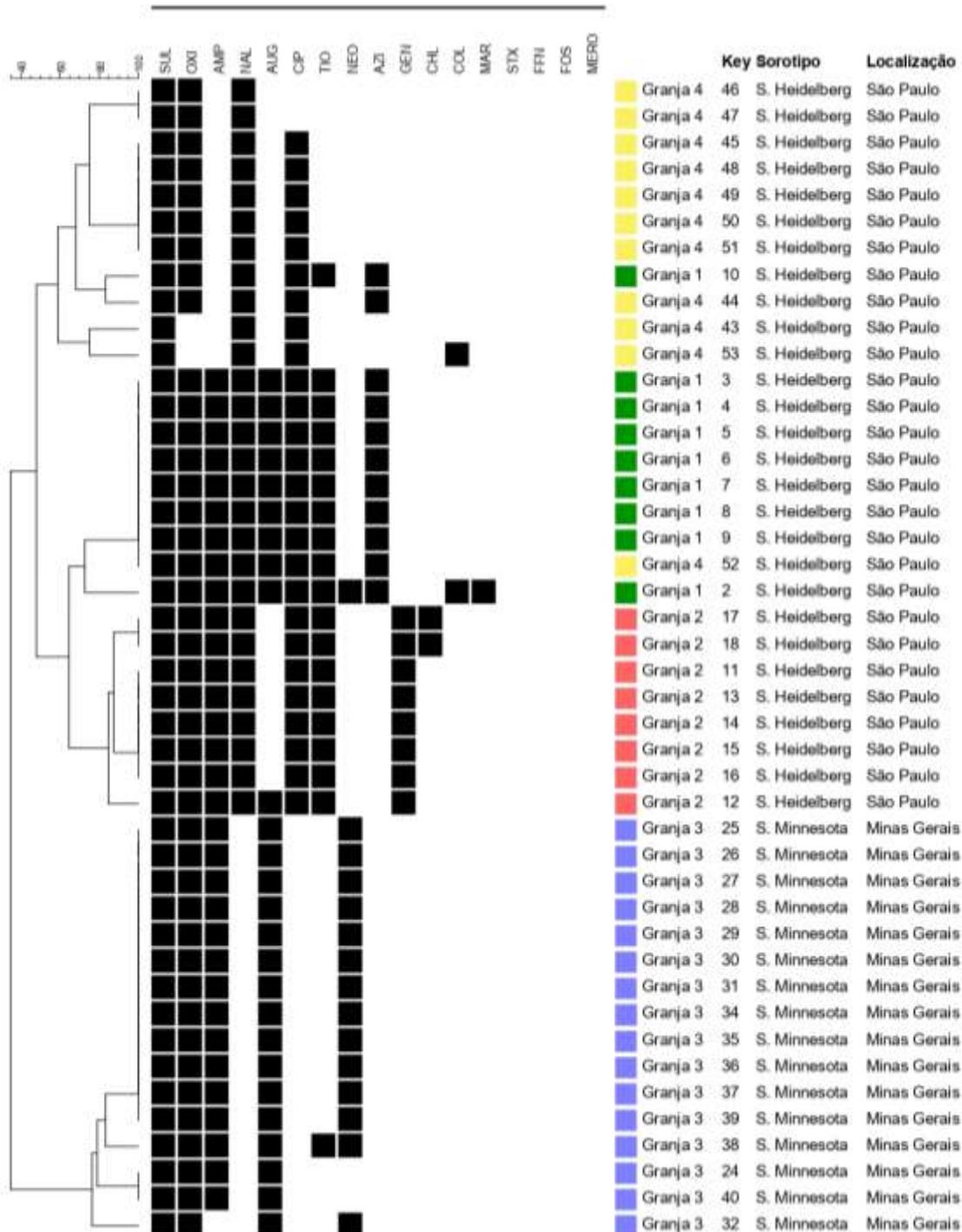
Tabela 2. Distribuição das 44 estirpes de Salmonella spp. segundo valores de CIM dos antimicrobianos testados, São Paulo, Brasil.

Antimicrobianos	Número de estirpes /CIM µg/mL															CIM 50% µg/mL	CIM 90% µg/mL	% Resistência
	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024			
Ácido Nalidíxico								16	0	0	27	1				64	64	63,6%
Amoxicilina com Clavulanato				11	0	0	6	1	1	0	25					64	64	56,8%
Ampicilina					9	2	0	0	0	0	33					64	64	75,0%
Azitromicina							6	12	15	10	1					16	32	25,0%
Ceftiofur			10	0	1	16	0	17								2	8	36,6%
Ciprofloxacina	16	0	0	2	20	3	2	1								1	2	59,0%
Cloranfenicol							12	26	4	0	2					8	16	4,5%
Colistina					36	6	1	1	0							1	2	4,5%
Fosfomicina								39	2	0	3	0	0	0		8	16	0%
Florfenicol				0	4	0	38	2	0							4	4	0%
Gentamicina				35	0	0	0	1	5	3	0					0,5	16	18,1%
Marbofloxacina	16	0	1	16	8	2	1	0								0,5	1	2,2%
Meropenem			44	0	0	0	0	0								0,25	0,25	0%
Neomicina			0	0	0	0	29	3	12							4	16	34,0%
Oxitetraciclina						1	1	0	0	42						32	32	95,4%
Sulfametoxazol trimetoprim						44	0	0	0	0	0					2	2	0%
Sulfonamida													1	0	43	1024	1024	97,7%

Fonte: Franco (2023).

Na Figura 4 estão representados os diferentes padrões de resistências das estirpes, nas 4 integrações analisadas.

Figura 4. Dendograma com os diferentes perfis de resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp. São Paulo, Brasil.



Fonte: Franco (2023)

Os 44 isolados se distribuíram em 15 perfis distintos de resistência antimicrobiana. Entre as *S. Heidelberg*, o perfil mais prevalente foi o de resistência à sulfonamida, oxitetraciclina, ampicilina, amoxicilina com clavulanato, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, ceftiofur e azitromicina, com um total de 8/28 isolados. Para *S. Minnesota*, o perfil mais prevalente foi o de resistência à sulfonamida, oxitetraciclina, ampicilina, amoxicilina com clavulanato e neomicina, com 12/16 isolados.

Na integração 1, todos os isolados foram considerados MDR. Foram identificados 3 perfis distintos de resistência, com predomínio do perfil sulfonamida, oxitetraciclina, ampicilina, amoxicilina com clavulanato, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, ceftiofur e azitromicina, em 7/9 isolados. Uma estirpe foi resistente à sulfonamida, oxitetraciclina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, ceftiofur e azitromicina e a outra apresentou resistência à 11 antimicrobianos, de sete classes distintas (sulfonamida, oxitetraciclina, ampicilina, amoxicilina com clavulanato, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, marbofloxacina, ceftiofur, neomicina, azitromicina e colistina).

Na integração 2, o percentual de isolados MDR também foi de 100%. O perfil de resistência predominante foi sulfonamida, oxitetraciclina, ampicilina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, ceftiofur, gentamicina e ampicilina, em 5/8 isolados. Dois isolados também apresentaram resistência ao cloranfenicol, enquanto outro apresentou resistência à amoxicilina com clavulanato, além dos antimicrobianos mencionados acima.

Na integração 3 foram identificados 4 perfis distintos, com predomínio de resistência à sulfonamida, oxitetraciclina, ampicilina, amoxicilina com clavulanato e neomicina, em 12/16. Um isolado apresentava as mesmas características de resistência, mas acrescido de resistência ao ceftiofur. Dois isolados foram sensíveis à neomicina e um isolado apresentou sensibilidade à ampicilina. Todas as estirpes desta granja foram consideradas MDR.

A integração 4 foi a que apresentou maior variabilidade nos perfis de resistência, com 11 isolados distribuídos em sete perfis distintos. Nesta granja houve um predomínio do perfil sulfonamida, oxitetraciclina, ácido nalidíxico e ciprofloxacina, em 5/11 estirpes. Enquanto um isolado apresentou resistência à

apenas duas classes distintas (sulfonamida e quinolonas), outro isolado foi resistente a mais de oito antibióticos distintos, de diferentes classes (sulfonamida, oxitetraciclina, ampicilina, amoxicilina com clavulanato, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, ceftiofur e azitromicina). Esta integração foi a que apresentou menor percentual de estirpes classificadas como MDR, com 90,9%. No entanto, foi identificada a presença de uma estirpe resistente à colistina (polimixina).

Em relação à similaridade de resistência entre estirpes de diferentes granjas, só foram observados perfis semelhantes entre as granjas 1 e 4 (Figura 4).

5.2 SENSIBILIDADE *in vitro* À AÇÃO DA LISOZIMA

A tabela 3 ilustra os valores de CBM. Um total de 86,36% (38/44) das estirpes tiveram crescimento inibido por concentrações ≤ 15 ppm (Tabela 3). Duas estirpes de *S. Heidelberg*, isoladas de aves das integrações 1 e 2, não foram inibidas após a exposição a doses de 2000 ppm. As demais estirpes apresentaram valores de CBM variando entre 1000 ppm (1/44), 250 (2/44) e 31 (1/44) (Gráfico 3).

A CBM90% foi ≤ 15 ppm para os isolados de *Salmonella Heidelberg* e *S. Minnesota*, em todas as integrações avaliadas (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição das 44 estirpes de *Salmonella* spp. segundo valores de CBM para lisozima em ppm, São Paulo, Brasil.

Integração	Número de estirpes /CBM ppm								CBM 50%	CBM 90%
	≤ 15	31	62	125	250	500	1000	> 2000		
1 - <i>S. Heidelberg</i>	7	1	0	0	0	0	0	1	15	15
2 - <i>S. Heidelberg</i>	6	0	0	0	1	0	0	1	15	15
3 - <i>S. Heidelberg</i>	11	0	0	0	0	0	0	0	15	15
4 - <i>S. Minnesota</i>	14	0	0	0	1	0	1	0	15	15
Total	38	1	0	0	2	0	1	2		
	(86,3%)	(2,2%)	(0%)	(0%)	(4,5%)	(0%)	(2,2%)	(2,2%)		

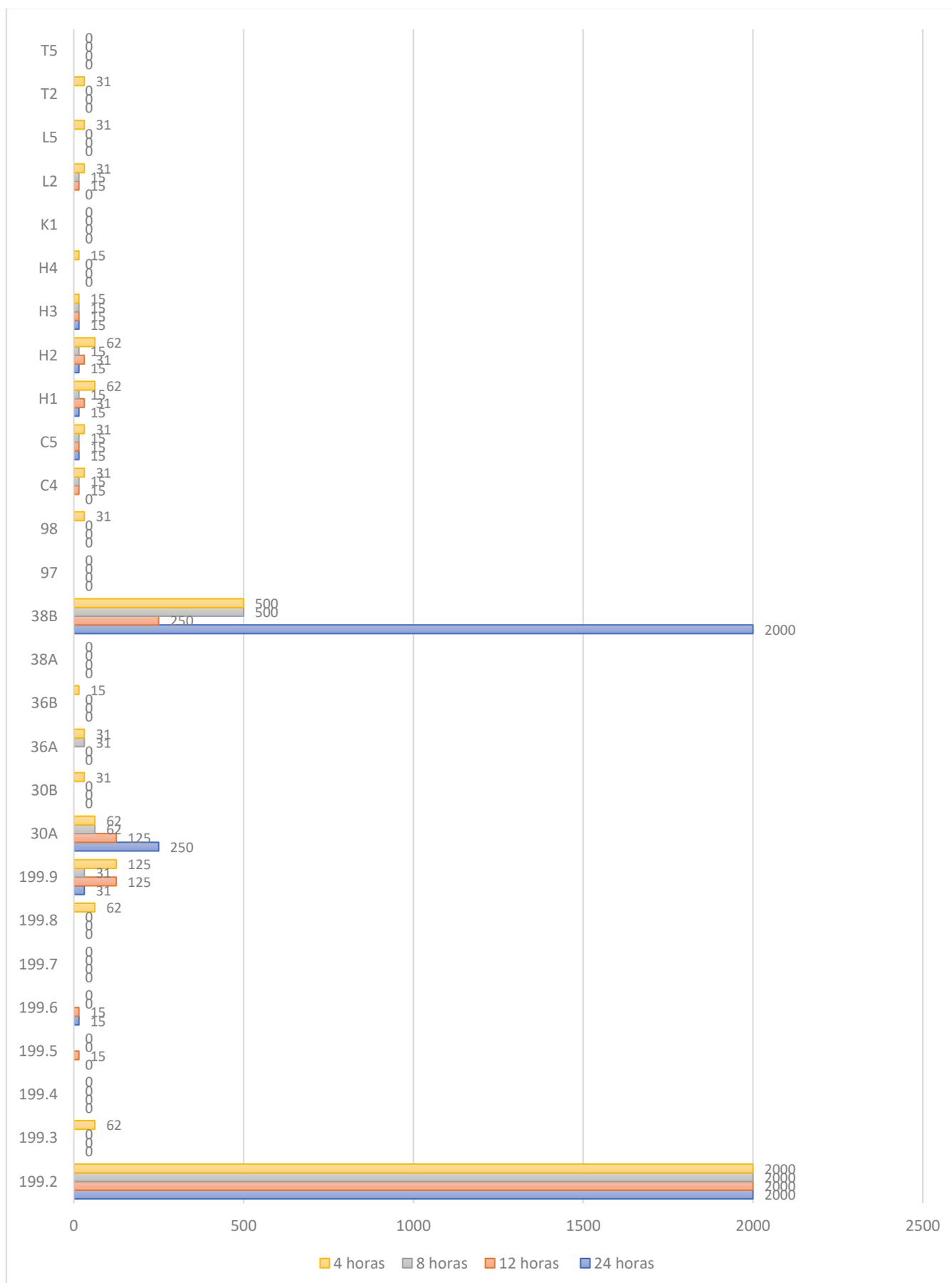
Fonte: Franco (2023)

5.3 Ensaio de morte bacteriana (*Time Kill*)

As curvas de morte bacteriana após a exposição das *Salmonellas* spp. a lisozima, em diferentes concentrações e intervalos de tempo, estão representadas nos gráficos 1 e 2. Nos isolados de *Salmonella* Heidelberg foi possível visualizar uma maior ação da lisozima na concentração de 31 ppm em 4 horas de exposição com 44,4% e 50% na concentração <15ppm, observando redução no crescimento bacteriano. Já no tempo de 8 horas, 12 horas e 24 horas de exposição à lisozima, 55,55% das estirpes apresentaram crescimento em concentrações <15ppm. Apenas um isolado de *Salmonella* Heidelberg foi capaz de crescer em concentrações de 2000 ppm em todos os tempos analisados.

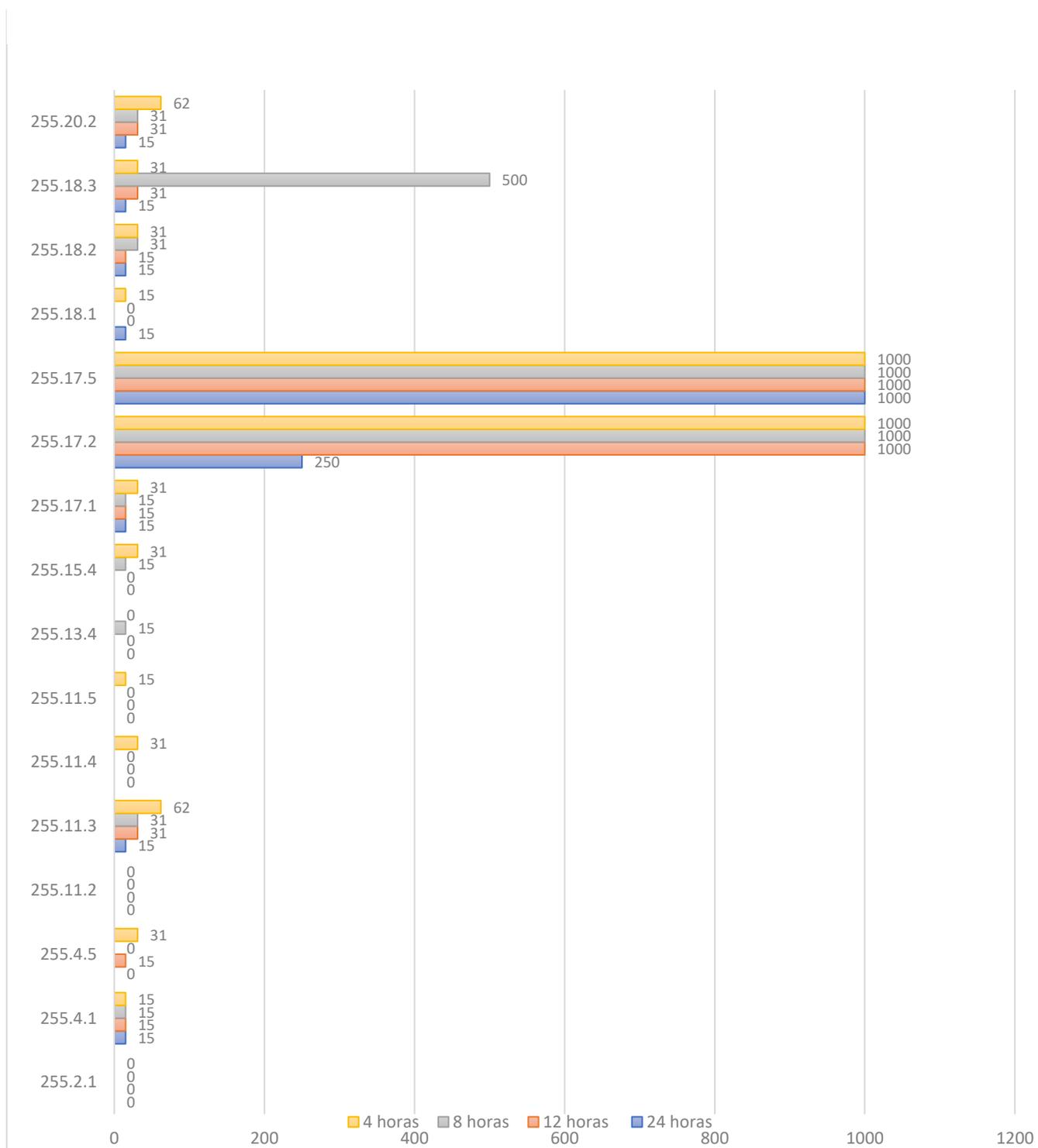
Já na curva de morte bacteriana dos isolados de *Salmonella* Minnesota, as estirpes apresentaram 37,5% de crescimento na concentração de 31 ppm em 4 horas de avaliação. Em 8 horas de análise, foi possível observar ausência de crescimento bacteriano em 18,75%, e a mesma porcentagem pôde ser encontrada nos isolados expostos a 15ppm da lisozima. No tempo de 12 horas, foi visualizado crescimento de 12,5% em 15ppm e em 24 horas, 43,75% dos isolados expostos a lisozima mantiveram-se negativos. Apenas um isolado cresceu e se manteve na concentração de 1000 ppm durante toda a avaliação, sendo possível observar também um segundo isolado que manteve o crescimento nos tempos 4, 8 e 12h em 1000 ppm, e ao final da avaliação, apresentou diminuição na carga microbiológica, com crescimento de um isolado apenas em 250 ppm.

Gráfico 1. Curva de morte bacteriana dos isolados de Salmonella Heidelberg.



Fonte: Franco (2023).

Gráfico 2. Curva de Morte Bacteriana dos isolados de Salmonella Minnesota



Fonte: Franco (2023)

5.4 DESAFIO DE FRANGOS COM *S. Heidelberg*

Todas as culturas realizadas antes da inoculação das aves resultaram negativas, evidenciando que as aves eram livres de *Salmonella* spp. no início do experimento. Os resultados das avaliações microbiológicas a partir das fezes das aves nos dias 2, 5, 7, 14, 18 e 21 estão apresentados na Tabela 4. As aves do grupo controle negativo permaneceram negativas durante todo o experimento. Na última semana de experimento houve mortalidade de 6 aves (três no controle negativo, duas no controle positivo e uma do grupo de tratamento). A causa morte das aves foi um quadro de ascite.

As aves do controle positivo apresentaram um percentual de positividade de 41,66% no dia da inoculação, atingindo o máximo de 66,66% nos dias 5 e 14. Na data do abate, o percentual de aves positivas foi de 63,63%.

O grupo tratado com liozima apresentou menor número de aves colonizadas durante todo o período de experimento, com percentual de 16,6% no dia da inoculação, atingindo o nível máximo em 14 dias (58,33%). No dia do abate, o percentual de aves positivas foi de 26,08%, o que representa uma redução de 37,55% no número de aves colonizadas.

A análise estatística descritiva da frequência de positividade para *S. Heidelberg* está apresentada na Tabela 5. O grupo controle negativo foi excluído da análise pois não há variabilidade nos dados.

A comparação da frequência de positividade entre os grupos de acordo com o tempo de avaliação (2, 5, 7, 14 e 18 dias) pode ser visualizada na

6 e Figura 6.

Tabela 4. Frequência de isolamento de Salmonella Heidelberg em fezes de frangos de corte dos grupos controle positivo, controle negativo e desafiados e tratados com lisozima na dose de 1000ppm. São Paulo, Brasil.

Idade das aves (dias)	T1 - Controle negativo Não desafiado	T2 - Controle positivo desafiado	T3 – grupo tratamento
2	0/12 - (0%)	5/12 - (41,66%)	2/12 - (16,6%)
5	0/12 - (0%)	8/12 - (66,66%)	4/12 - (33,33%)
7	0/12 - (0%)	7/12 - (58,33%)	4/12 - (33,33%)
14	0/12 - (0%)	8/12 - (66,66%)	7/12 - (58,33%)
18	0/12 - (0%)	7/12 - (58,33%)	3/12 - (25,00%)
21	0/21 - (0%)	14/22 - (63,63%)	6/23 - (26,08%)

Fonte: Franco (2023).

Tabela 5. Estatística descritiva dos resultados de isolamento de S. Heidelberg por grupo de tratamento com o número de animais por categoria (N) e a porcentagem com o intervalo de confiança (IC) de 95% e teste de associação qui-quadrado com correção de Yates.

Idade das aves (dias)	Isolamento	Controle Positivo		Tratamento		p-valor
		N	% (IC95%)	N	% (IC95%)	
2	Negativo	7	41,18 (20,68-64,41)	10	58,82 (35,59-79,32)	0,369
	Positivo	5	71,43 (35,23-93,53)	2	28,57 (6,47-64,77)	
5	Negativo	4	33,33 (12,45-61,24)	8	66,67 (38,76-87,55)	0,221
	Positivo	8	66,67 (38,76-87,55)	4	33,33 (12,45-61,24)	
7	Negativo	5	38,46 (16,47-65)	8	61,54 (35-83,53)	0,413
	Positivo	7	63,64 (34,8-86,27)	4	36,36 (13,73-65,2)	
14	Negativo	4	44,44 (17,3-74,59)	5	55,56 (25,41-82,7)	1,000
	Positivo	8	53,33 (29,39-76,12)	7	46,67 (23,88-70,61)	
18	Negativo	5	35,71 (15,15-61,55)	9	64,29 (38,45-84,85)	0,214
	Positivo	7	70 (39,42-90,73)	3	30 (9,27-60,58)	
21	Negativo	8	32 (16,44-51,46)	17	68 (48,54-83,56)	0,025
	Positivo	14	70 (48,28-86,39)	6	30 (13,61-51,72)	

Fonte: Franco (2023).

Os dados da Tabela 5 demonstram diferença significativa entre o grupo tratado com lisozima e o controle positivo, com valor de $p=0.025$. Para as demais

idades, foram observadas grandes variações na frequência de isolamento, mas não foi possível comprovar diferenças estatísticas pela análise utilizada.

Para aumentar o poder estatístico e realizar uma avaliação seriada, foi utilizado o teste ANOVA não paramétrica. Nesta análise foram identificadas diferenças estatísticas entre as frequências de isolamento nos grupos controles e no tratamento, e não houve diferença entre as datas de avaliação (Tabela 6). A frequência de aves positivas se manteve constante durante todo o período avaliado, como demonstra a Figura 6.

Tabela 6. Resultados da análise semelhante a ANOVA (ANOVA não paramétrica) referente à frequência de positividade por grupo de tratamento e dia de análise.

	p-valor
Grupo	<0,001
Controle Positivo:Controle Negativo	0,000
Controle Positivo:Tratamento	0,008
Controle Negativo:Tratamento	0,000
Tempo	0,196
Controle Positivo:Controle Negativo	0,743
Controle Positivo:Tratamento	0,196
Controle Negativo:Tratamento	0,203
Grupo:Tempo	0,728
Controle Positivo:Controle Negativo	0,743
Controle Positivo:Tratamento	0,878
Controle Negativo:Tratamento	0,203

Fonte: Franco (2023).

A comparação da contagem bacteriana no ingluvío e nos cecos das aves dos três grupos, no 21^o. dia de idade, pode ser visualizada nas tabelas 6 e 7.

Após o tratamento, nenhuma ave apresentou colonização no ingluvío. No grupo controle positivo foram detectados valores variando de 1×10^2 a 1×10^5 UFC/g, com média de $1,4 \times 10^3$ UFC/g. O percentual de aves positivas na cultura de ingluvío, no grupo controle positivo, foi de 50% (11/22).

Tabela 7. Contagem de Unidades Formadoras de Colônias no ingluvío de frangos nos grupos controle positivo e tratado com lisozima 1000 ppm, no abate aos 21 dias. São Paulo, Brasil.

Ave	Controle positivo			Tratamento		
1	1 x10 ³	1x10 ³	1x10 ²	-	-	-
2	1 x10 ³	1x10 ²	1x10 ²	-	-	-
3	3 x10 ²	1x10 ³	-	-	-	-
4	1 x10 ⁵	1x10 ²	-	-	-	-
5	4 x10 ²	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	*	-	*	*	-	-

(*) ave morta; (-) ave negativa

Fonte: Franco (2023).

Na análise do material proveniente dos cecos, observamos um total de 13/22 aves positivas na cultura do grupo controle positivo, com contagens variando de 1,1 x 10³ UFC/g até 3x10⁶ UFC/g de fezes. No grupo tratado com lisozima foram identificadas 6/23 aves positivas, com contagens variando de 2 x 10⁴ UFC/g até 1x10⁶ UFC/g de fezes.

Tabela 8. Contagem de Unidades Formadoras de Colônias nos cecos de frangos dos grupos controle positivo e tratado com lisozima 1000 ppm, no abate aos 21 dias. São Paulo, Brasil.

Ave	Controle positivo			Tratamento		
1	3 x10 ⁶	2 x10 ⁻⁵	1 x 10 ⁶	-	2 x10 ⁴	-
2	1,5 x10 ⁵	1,4 x10 ⁵	1 x10 ⁵	-	1 x10 ⁶	-
3	1,6 x10 ⁵	9X10 ⁴	-	2 x10 ⁴	-	-
4	2 x10 ⁵	3 x10 ⁴	-	-	-	-
5	3,6 x10 ⁵	1 x10 ⁵	-	-	3 x10 ⁵	-
6	1,1x 10 ³	1 x10 ⁵	-	-	-	-
7	-	-	-	1 x10 ⁵	1 x10 ⁵	-
8	*	-	*	*	-	-

(*) ave morta; (-) ave negativa

Fonte: Franco (2023).

A tabela 9 apresenta a estatística descritiva dos valores de contagem bacteriana dos frangos dos grupos controle positivo, negativo e tratado com lisozima.

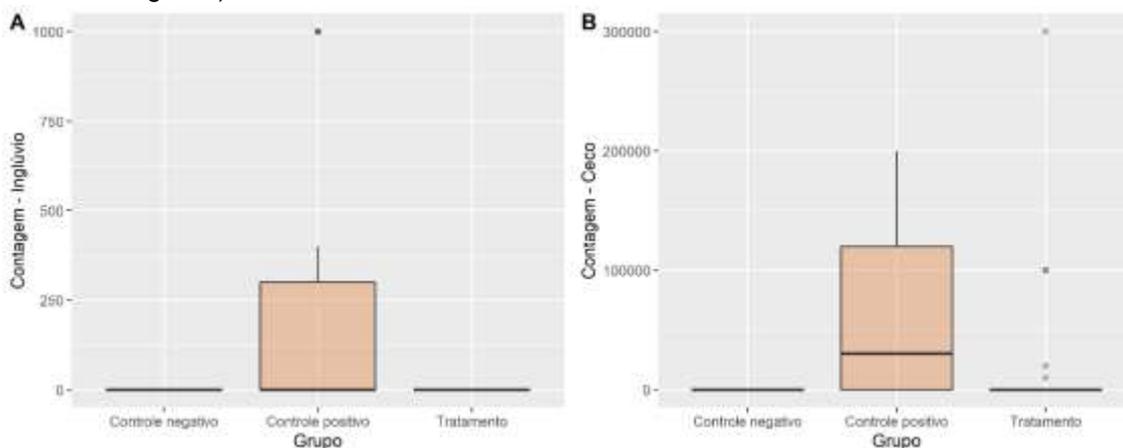
Tabela 9. Número de animais (N), média com desvio padrão (DP), mediana com intervalo interquartil (IIQ) e valores mínimo e máximo da variável com teste de associação Kruskal-Wallis e teste de Dunn (post-hoc) dos valores da contagem bacteriana do ceco de frangos.

	N	Ausentes	Média (\pm DP)	Mediana (IIQ)	Mín-Máx	p-valor
Contagem Inglúvio						
Controle negativo	21	0	0 (\pm 0)	0 (0-0)	0-0	
Controle positivo	22	2	$4,8 \times 10^3$ ($\pm 2,1 \times 10^4$)	5×10^1 (0- 4×10^2)	0- 1×10^5	<0,001
Tratamento	23	1	0 (\pm 0)	0 (0-0)	0-0	
Post-hoc: CN x CP $p < 0,001$; TT x CP $p < 0,001$; TT x CN não significativo.						
Contagem Ceco						
Controle negativo	21	0	0 (\pm 0)	0 (0-0)	0-0	
Controle positivo	22	2	$2,6 \times 10^5$ ($\pm 6,5 \times 10^5$)	$9,5 \times 10^4$ (0- $1,6 \times 10^5$)	0- 3×10^6	<0,001
Tratamento	23	1	$6,7 \times 10^4$ ($\pm 2,1 \times 10^5$)	0 (0- 1×10^4)	0- 1×10^6	
Post-hoc: CN x CP $p < 0,001$; TT x CP $p = 0,01$; TT x CN não significativo.						

Fonte: Franco (2023).

A Figura 5 ilustra as diferenças quantitativas na contagem de *S. Heidelberg* no Inglúvio e nos cecos de frangos de corte tratados e não tratados com lisozima. Segundo o teste de associação Kruskal-Wallis e teste de Dunn (post-hoc) existem diferenças quantitativas significativas entre o tratamento e o grupo controle positivo.

Figura 5. Comparação da contagem de *S. Heidelberg* no grupo de tratamento, em comparação com grupo desafiado e não tratado (controle positivo) e não desafiado (controle negativo).



Fonte: Franco (2023).

6. DISCUSSÃO

Diante do grande aumento na produção de carne de frango para abastecimento do consumo do mercado interno e externo, a cadeia produtiva necessita de uma maior atenção para os patógenos emergentes. *Salmonella* está entre um dos maiores causadores de infecções alimentares no mundo (Alikhan *et al.*, 2022). A facilidade de disseminação do agente dentro das granjas tem sido responsável pela condenação de lotes e o descarte de aves.

Um estudo sobre a dinâmica dos sorovares de *Salmonella* spp. na cadeia de aves do Brasil demonstrou que o uso de vacina para controle de *Salmonella* Enteritidis reduziu de forma significativa a prevalência desse sorovar nas duas últimas décadas, mas a pressão de seleção exercida pela utilização de antibióticos favoreceu a emergência de outros sorovares, principalmente *S. Heidelberg* e *S. Minnesota* (Alikhan *et al.*, 2022).

Os dados obtidos nesse estudo apontaram uma frequência de ocorrência de *Salmonella* spp. nas granjas de 11,5%, com predomínio do sorovar *S. Heidelberg* (64%) em São Paulo, seguido de *S. Minnesota* (36%) em Minas Gerais. O perfil de resistência antimicrobiana classificou 97,7% destes isolados como multirresistentes. A presença de estirpes bacterianas multirresistentes – MDR na produção animal têm aumentado nos últimos anos, e vêm se tornando uma grande preocupação associada ao consumo de carne de frango (Souza *et al.*, 2020; Saidenberg *et al.*, 2022). Um estudo recente relacionados a resistência aos antibióticos mostrou que *S. Heidelberg* e *S. Minnesota* isoladas de aves no Brasil são portadoras dos genes de resistência *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CTX-M-2} e *qnrB19* (Saidenberg *et al.*, 2022).

Perin e colaboradores (2020) relataram alta prevalência de *Salmonella* MDR em carnes de frangos no Paraná, apresentando elevados índices de resistência a ácido nalidíxico, tetraciclina, doxaciclina, ampicilina, amoxicilina com ácido clavulânico, ceftriaxona e ciprofloxacina. Nesse mesmo estudo os autores destacaram a presença de estirpes de *Salmonella* com genes de beta-lactamase de espectro estendido – ESBL. Nossos resultados se assemelham aos encontrados por Perin e colaboradores (2020), e demonstram que os dois sorovares apresentam CIM elevada para antimicrobianos de classes

compartilhadas com humanos (Tabela 2). As estirpes de *Salmonella* Heidelberg apresentaram um perfil de resistência mais amplo, incluindo classes de medicamentos críticos e de elevada prioridade, como cefalosporinas de terceira geração e fluorquinolonas (Figura 4). Também foram identificadas cepas resistentes à colistina, considerado uma das últimas opções terapêutica para tratamento de infecções humanas por bactérias produtoras de carbapenemases (Fernandes *et al.*, 2016).

Nas últimas décadas, a busca por alternativas que substituíssem o uso de antimicrobianos tem aumentado devido à resistência adquirida pelos microrganismos. O uso de prebióticos, probióticos, óleos essenciais, enzimas e ácidos orgânicos têm sido introduzido com uma maior aceitação diante da situação de redução de uso de antibióticos (Sabo *et al.*, 2020).

A literatura reporta que a atividade antimicrobiana da lisozima é bastante efetiva contra *Micrococcus luteus*, *Bacillus stearothermophilus* e *Clostridium tyrobutyricum* (Silva, 2019). No entanto, o efeito sobre bactérias gram negativas é limitado devido a composição da parede. Davidson e colaboradores (2005) relatam a ação de inibição de diversos microrganismos, mas destacaram que *Salmonella* Typhimurium é um organismo frequentemente não lisado ou inibido pelas lisozimas.

Diferentes biotecnologias como fragmentação, fusão de peptídeos e proteínas, plegação e conjugação são capazes de ampliar o espectro de ação para bactérias gram negativas (Park *et al.*, 2004; Ibrahim *et al.*, 2011; Appaiah *et al.*, 2012; Lukacik *et al.*, 2012; Carillo *et al.*, 2018), e podem resultar em novos produtos para uso veterinário. A hipótese deste trabalho foi verificar se a lisozima Zhejiang Aegis Biotech Co. Ltd. (Aegis group) pode atuar na redução ou inativação de sorovares de *S. Heidelberg* e *S. Minnesota*. Os resultados obtidos nos testes “*in vitro*” revelaram que a 86,3% das estirpes de *Salmonella* dos sorovares Heidelberg e Minnesota tiveram o crescimento inibido em concentrações de 15 ppm.

Algumas cepas de *S. Heidelberg* e *S. Minnesota* resistiram a concentrações de 250 a 2000 ppm. A resistência a lisozima já foi descrita em *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Proteus mirabilis*. Os

mecanismos de resistência à ação da lisozima ainda não foram completamente elucidados, mas a alteração da acetilação do Carbono 6 do ácido N-acetilmurâmico está implicada na redução ou inativação da atividade da enzima muramidase (Herbert et al., 2007). Em *Enterococcus faecalis* a resistência à lisozima também está associada com a presença de genes que codificam metaloproteases (Rouchon et al., 2022). Um terceiro mecanismo de resistência inclui alterações de permeabilidade celular, induzidas por mudanças de carga catiônicas da parede celular, conferindo resistência cruzada entre a polimixina e lisozima. Nesse mecanismo, a fosfoetanolamina transferase adiciona a fosfoetanolamina carregada positivamente ao lipídio A do LPS. A alteração da carga da parede bacteriana passa a repelir as moléculas catiônicas, reduzindo a susceptibilidade para lisozima em estirpes de *Escherichia coli* portadoras do gene *mcr-1* (que codifica resistência à colistina) em cerca de 5 a 20 vezes (Sherman et al., 2016). Neste estudo foram identificadas duas estirpes de *S. Heidelberg* com fenótipo de resistência à colistina, elas apresentaram resistência a exposição de 2000ppm da lisozima, corroborando com os resultados encontrado por Gogry e colaboradores (2022).

A análise das diferentes curvas de morte bacteriana revelou que a maioria dos isolados de *Salmonella Heidelberg* teve o crescimento inibido entre 4 e 8 horas de exposição à lisozima, com mais de 44,4% de morte bacteriana nas primeiras 24 horas de exposição, observando apenas um isolado com resistência a todas as concentrações ao fim do tempo, relacionando a interação da resistência a colistina, como observado por Gogry e colaboradores (2022). A resistência a colistina contribui para mudanças na superfície de membrana externa das bactérias gram-negativas, diminuindo o efeito bactericida da lisozima.

Para os isolados de *Salmonella Minnesota*, a curva de morte bacteriana apresentou 37,5% de crescimento na concentração de 31 ppm nas primeiras 4 horas de avaliação, observando a diminuição dessa porcentagem conforme os isolados foram expostos por mais tempo à lisozima. 18,75% dos isolados apresentaram crescimento na menor concentração no intervalo de 8-12 horas. Para *Salmonella Minnesota*, 43,75% dos isolados expostos a lisozima mantiveram-se negativos ao final da avaliação. Apenas um isolado (6,25%)

creceu e se manteve na concentração de 1000 ppm durante toda a avaliação, sendo possível observar também um segundo isolado que manteve o crescimento nos tempos 4, 8 e 12h em 1000 ppm, e ao final da avaliação, apresentou diminuição na carga microbiológica, com crescimento apenas em 250 ppm.

Os testes *in vitro* sugeriram que a liozima tem potencial para ser utilizada como uma alternativa no controle de *Salmonella* Heidelberg e *S. Minnesota* em granjas, diminuindo o uso de antibióticos convencionais. Essa forma de substituição poderia reduzir os índices de resistência e ampliar o mercado de produção e exportação de carne de frango. No entanto, a possibilidade de pressão seletiva sobre estirpes resistentes à colistina deve ser considerada, mesmo se tratando de um produto natural.

Até o presente momento, esse é o primeiro relato que demonstra a atividade bactericida da liozima, *in vitro*, para estirpes de *S. Heidelberg* e *S. Minnesota*. No entanto, a viabilidade comercial do produto depende da sua ação *in vivo*, considerando que o intestino é um ambiente complexo, com uma microbiota diversa (Nair *et al.*, 2018; El-Saadony *et al.*, 2022).

Para a avaliação *in vivo* selecionamos uma estirpe de *S. Heidelberg*. A escolha por este sorovar se deve ao fato de ter sido o sorovar isolado com maior frequência em nosso estudo (Tabela 1) e por apresentar maiores índices de resistência antimicrobiana (Figura 4). A disseminação de *S. Heidelberg* é sustentada pela elevada habilidade de colonizar o intestino de frangos, de se adaptar no ambiente das granjas e abatedouros, com formação de biofilmes, que favorecem a resistência a longos períodos fora do hospedeiro (Hofer *et al.*, 1997; RASFF, 2022).

No experimento realizado foi possível observar a infecção por *Salmonella* a partir do segundo dia de inoculação (Tabela 4), exceto no grupo controle negativo, que permaneceu não infectado durante todo período de estudo. A administração de liozima na dose de 1000 ppm. demonstrou redução significativa no número de animais infectados a partir do 21^o dia de vida das aves (Tabela 5). A análise estatística pelo teste de associação qui-quadrado com correção de Yates não foi capaz de demonstrar diferenças estatísticas nos

demais tempos de avaliação, embora se observe diferenças entre as frequências de isolamento. Essa dificuldade em estabelecer diferenças matemáticas pode ter sido provocada pelo tamanho amostral. Por essa razão, os dados foram submetidos ao teste de ANOVA não paramétrica, e essa análise demonstrou que existem diferenças significativas entre os grupos tratamento, controle negativo e controle positivo (Figura 6), e essas diferenças não foram influenciadas pelas datas de coletas (Tabela 6).

Uma limitação deste ensaio foi não ter como impedir o efeito da recolonização da ave por bactérias presentes na cama. Esse desafio também está presente nas granjas, com o reaproveitamento do substrato em vários lotes. Apesar desta limitação, o controle de salmonelas pode ser potencializado pela combinação de mais de uma estratégia, como o uso da lisozima associada com outras substâncias como probióticos e ácidos orgânicos. Sabo e colaboradores (2020) demonstraram que algumas bacteriocinas podem ter um efeito inibitório *in vitro* sobre *S. Heidelberg*, mas os autores não comprovaram o efeito *in vivo*.

A dinâmica de infecção da *Salmonella* ocorre, normalmente, pela via digestória, sendo o Inglúvio a primeira barreira encontrada pelo agente. No órgão, a presença de bactérias do gênero *Lactobacillus* spp. permitem uma diminuição no pH, ocorrendo uma mudança na microbiota desses animais conforme o aumento da idade (Fonseca *et al.*, 2010; Danzeisen *et al.*, 2011; Mohd Shaufi *et al.*, 2015).

Dentro do sistema digestório das aves domésticas, os cecos são os locais onde é possível encontrar a maior concentração de bactérias (Apajalahti, 2005) e pode ser considerado um dos principais reservatórios para *Salmonella* spp. (Fanelli *et al.*, 1971). São diversos os fatores que podem potencializar ou reduzir a infecção das aves por *Salmonella* spp., como a idade da ave, maturação do sistema imunológico, diversidade da microbiota intestinal, tipo de alimentação, tamanho e forma das partículas da dieta, tipo de material utilizado como cama no aviário, entre outros (Ribeiro *et al.*, 2008; Pan & Yu, 2014; Vellano, 2019).

Neste estudo, a análise quantitativa da contagem de bactérias presentes no Inglúvio e no intestino demonstrou redução significativa do grupo tratado em comparação com os grupos controles (Tabela 8). Esse efeito pode representar um grande benefício, por diminuir a contaminação cruzada no abate das aves,

que ocorre principalmente no momento da evisceração e do resfriamento das carcaças no *chiller*. As aves tratadas com lisozima eliminaram a bactéria do inglúvio. A contagem de bactérias nos cecos se aproximou dos valores observados no controle negativo, com algumas exceções (Figura 6).

É provável que a associação da lisozima seguida da administração de bactérias ácido-láticas possa atuar de modo sinérgico e possibilitar a obtenção de resultados melhores. Higgins e colaboradores (2010) demonstraram que a administração de estirpes bacterianas ácido-láticas em 24 horas após o desafio por *Salmonella* Enteritidis promoveu uma redução significativa na colonização do patógeno. *Lactobacillus* também são capazes de modular a resposta imunológica, aumentando as secreções de citocinas e alterando as células linfóides do intestino de frangos de corte (Haghighi *et al.*, 2005).

A lisozima já teve os seus benefícios comprovados para a redução de enterite necrótica (Liu *et al.*, 2010). Neste trabalho sugerimos que ela poderá contribuir para o controle de *S. Heidelberg* e *S. Minnesota* em frangos de corte. Novos estudos devem explorar a melhor posologia e modo de administração para aves, bem como a possibilidade de incorporação de novas tecnologias, como o encapsulamento (Zhang *et al.*, 2020).

7. CONCLUSÕES

- Estirpes MDR de *S. Heidelberg* e *S. Minnesota* estão dispersas em granjas de frangos de corte na região sudeste, e necessitam de estratégias de controle;
- A lisozima possui ação bactericida *in vitro* com possibilidade de morte bacteriana;
- A maioria das cepas apresenta morte bacteriana entre 4 e 8 horas de exposição à lisozima;
- Algumas estirpes apresentam resistência à lisozima em concentrações que ultrapassam 2000 ppm;
- A administração diária de lisozima na dose de 1000 ppm em frangos de corte desafiados reduziu significativamente o número de animais infectados, a contagem de *Salmonella Heidelberg* no ingúvio e nos cecos, demonstrando a eficácia do produto *in vivo*;
- Novos ensaios clínicos são necessários para avaliar os efeitos de dose resposta, bem como a segurança do produto para as aves.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HAMID, I.; IVNISTKI, D.; ATANASOV, P.; WILKINS, E. Highly sensitive flow-injection immunoassay system for rapid detection of bacteria. **Anal. Chim. Acta.**, v.399, p.99-108, 1999.

ALIKHAN, N.F.; MORENO, L.Z.; CASTELLANOS, L.R.; CHATTAWAY, M.A.; MCLAUCHLIN, J.; LODGE, M.; O'GRADY, J.; ZAMUDIO, R.; DOUGHTY, E.; PETROVSKA, L.; CUNHA, M.P.V.; KNÖBL, T.; MORENO, A.M.; MATHER, A.E. Dynamics of *Salmonella enterica* and antimicrobial resistance in the Brazilian poultry industry and global impacts on public health. **Plos Genetics**, v.18, n.6., 2022.

ALLGAYER, M.C. OLIVEIRA, S.J.; MOTTIN, V.D.; LOIKO, M.R.; ABILLEIRA, F; GUEDES, N.M.R.; PASSOS, D.T.; WEIMER, T. a. Isolamento de *Salmonella* Braenderup em arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*). **Cienc Rural**, v.39, p.2542-2545, 2009.

ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; FERNANDEZ A.; BERNARDO, A.; LÓPEZ, M. Acid tolerance in *Salmonella* Typhimurium induced by culturing in the presence of organic acids at different growth temperatures. **Food Microbiology**, v.27, p.44-49, 2010.

ALZWGHAI, A.B.; YAHYARAEYAT, R.; FASAEI, B.N.; LANGEROUDI, A.G.; Salehi, T.Z. Rapid molecular identification and differentiation of common *Salmonella* serovars isolated from poultry, domestic animals and foodstuff using multiplex PCR assay. **Archives of Microbiology**, p.1009-1016, 2018

AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNI, Z. Microbiota ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. **Poult Sci**, v.83, p.1093-1098, 2004.

ANDINO, A., & HANNING, I. *Salmonella enterica*: Survival, colonization, and virulence differences among serovars. In **Scientific World Journal**. Hindawi Publishing Corporation, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/520179>

APAJALAHTI, J. Comparative Gut microflora, metabolic challenges, and potential opportunities, p.444-453, 2005.

APPAIAH, C.B.; SARAVANAN, R.S.; SRIRAM, B. Chimeric Antibacterial Polypeptides Constructed from Muralytic Domains and Membrane-Traversing Domains. **Patent No. WO2012140676**, 2012.

Associação de Proteína ANIMAL – ABPA. Disponível em <<https://abpa-br.org/>>. Acesso em Setembro de 2020.

AYRAPETYAN, M.; OLIVER, J.D. The viable but non-culturable state and its relevance in food safety. **Curr. Opin. Food Sci**, v.8, p.127-133, 2016.

BAILEY, J.S. Integration colonization control of *Salmonella* in poultry. **Poult Sci**, v.67, p.928-932, 1988.

BAO, Y.; ZHANG, H.; HUANG, X.; MA, J.; LOGUE, C.M.; NOLAN, L.K.; LI, G. O-specific polysaccharide confers lysozyme resistance to extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Virulence**, v.9, p.666-680, 2018.

BARLAG, B., & HENSEL, M. Molecules the Giant Adhesin SiiE of *Salmonella enterica*. **Molecules**, v.20, p.1134–1150, 2015.
<https://doi.org/10.3390/molecules20011134>

BARROW, P. a. *Salmonella* control-past, present and future. **Avian Pathol**, v.22, p.651-669, 1993.

BAUMLER, A.J.; GILDE, A.J.; TSOLIS, R.M.; VAN DER VELDEN, A.W. AHMER, B.M.; HEFFRON, F. Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operons during evolution of *Salmonella* serotypes. **J. Bacteriol**, v.179, p.317-322, 1997.

BEARSON, B.L.; BEARSON, S.M.; LOOFT, T.; CAI, G.; SHIPPY, D.C. Characterization of a Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg Outbreak Strain in Commercial Turkeys: Colonization, Transmission, and Host Transcription Response. **Frontiers in Veterinary Science**, v.4, a.166, 2017.

BELL, R.L.; JARVIS, K.G.; OTTESEN, A.R.; MCFARLAND, M. A.; BROWN, E.W. Recent and emerging innovations in *Salmonella* detection: A food and environmental perspective. **Microb. Biotechnol**, v.9, p.279-292, 2016.

BERCHIERI, A. J.; SILVA, E. N., DI FABIO, J. SESTI, L.; ZUANASE, M. A. F. **Doenças das aves**, 2 Ed. Campinas: FACTA, 2009.

BESHIRU, A.; IGBNOSA, I.; IGBOSA, E. Biofilm formation and potential virulence factors of *Salmonella* strains isolated from ready-to-eat shrimps. **PLOS ONE**, v.13, 2018.

BOER, E.; BEUMER, R.R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, p.119-130, 1999.

BRANDÃO, D.; LIÉBANA, S.; PIVIDORI, M.O. Multiplex detection of foodborne pathogens based on magnetic particles. **New Biotechnol**, v.32, p.511-520, 2015.

BRANEN, J.K.; DAVIDSON, P.M. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p.63-74, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº08.

Disponível em http://www.imprensanacional.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/20472445/do1-2017-03-03-instrucao-normativa-n-8-de-17-de-fevereiro-de-2017-20472317 acesso em setembro de 2020.

BROWER, C.K. DAESCHEL, M.A., MCGUIRE, J. Protein antimicrobial barriers to bacterial adhesion. **J. Dairy Sci.**, v.81, p. 2771-2778, 1998.

BROWN, N. F., VALLANCE, B. A., COOMBES, B. K., VALDEZ, Y., COBURN, B. A., & FINLAY, B. B. *Salmonella* Pathogenicity Island 2 Is Expressed Prior to Penetrating the Intestine. **Plos Pathogens**, v.1(3), 2005. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010032>

BRUNNER, E., DOMHOF, S., AND LANGER, F. Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments, Wiley, New York, 2002.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. In **International Journal of Food Microbiology**, v.94, ed3, p. 223–253, 2004. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>

BUTAYE, P.; MICHAEL, G.B.; SCHWARZ, S.; BARRETT, T.J.; BRISABOIS, A.; WHITE, D.G. The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi *Salmonella* serotypes. **Microbes and Infection**, v.8, n.7, p.1-7, 2006.

CALLEWAERT, L.; AERTSEN, A.; DECKERS, D.; VANOIRBEEK, K.G. A.; VANDERKELEN, L.; VAN HERREWEGHE, J.M.; MASSCHALCK, B.; NAKIMBUGWE, D.; ROBBEN, J. A new Family of Lysozyme Inhibitors Contributing to Lysozyme Tolerance in Gram-Negative Bacteria. **PLOS Pathogens**, v.4, 2008.

CALLEWAERT, L.; VAN, HERREWEGHE, J.M.; VANDERKELEN, L.; et al. Guards of the great wall: bacterial lysozyme inhibitors. **Trends Microbiol.**, v.20, p.501-510, 2012.

CALLEWAERT, L.; WALMAGH, M.; MICHIELS, C.W.; LAVIGNE, R. Food applications of bacterial cell wall hydrolases. **Current Opinion in Biotechnology**, v.22, p.164-171, 2011.

CAMPOS, L.C. *Salmonella*. In: **Microbiologia**. Atheneu: ed.6, p.351-360, 2015.

CARPENTIER, P.; ROYANT, A.; WEIK, M.; BOURGEOIS, D. Raman Assisted Crystallography Reveals a Mechanism of X-Ray Induced Reversible Disulfide Radical Formation. **Structure**, v.18, p.1410-1419, 2010.

CARRAMIÑANA, J.J.; ROTA, C.; AGUSTÍN, I.; HERRERA, A. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. **Veterinary Microbiology**, v.104, p.133-139, 2004.

CARRILLO, W.; LUCIO, A.; GAIBOR, J.; MORALES, D.; VÁSQUEZ, G. Isolation of Antibacterial Hydrolysates from Hen Egg White Lysozyme and Identification of Antibacterial Peptides. **J. Med. Food**, v.21, p.808–818, 2018.

CASTRO-VARGAS, R.E.; HERRERA-SANCHEZ, M.P.; RODRÍGUEZ-HERNANDEZ, R.; RONDÓN-BARRAGAN, I.S. Antibiotic resistance in *Salmonella* spp. isolated from poultry: a global overview. **Veterinary World**, v.13, p.2070-2084, 2020.

Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada da Esalq – CEPEA. Disponível em: < <https://www.cepea.esalq.usp.br> > Acesso em Agosto de 2020.

CHAPPELL, L., KAISER, P., BARROW, P., JONES, M. A., JOHNSTON, C., & WIGLEY, P. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.128(1–3), p. 53–59, 2009.

CHEN, C. H., RAVISHANKAR, S., MARCHELLO, J., & FRIEDMAN, M. Antimicrobial Activity of Plant Compounds against *Salmonella* Typhimurium DT104 in Ground Pork and the Influence of Heat and Storage on the Antimicrobial Activity. **Journal of Food Protection**, v.76, n.7, 2013. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-493>

CHERRY, J.R.; FINDANTSEF, A.L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current opinion in biotechnology**, n.14, p.438-443, 2003.

CHIA T.; GOULTER R.; MCMEEKIN, T.; DYKES, G.; FEGAN, N. Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. **Food Microbiology**, v.26, p.853-859, 2009.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From animals. VET01S. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 5th ed. USA, 2020.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, Approved Standard. VET01-A4. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 4th ed. Wayne, PA, USA, 2013a.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, document M100-S23. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Twenty-thi ed. Wayne, PA, USA, 2013b.

COGLIANI, C.; GOSENS, H.; GREKO, C. Restricting antimicrobial use in food animals: Lessons from Europe. **Microbes**, v.6, p.271-279, 2011.

CORREA, I. A.M; FLORES, F.; SCHNEIDERS, G.H.; Pereira, L.Q.; BRITO, B.G.; LOVATO, M. Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* e análise de *Salmonella* spp. em psitacídeos. **Pesq Vet Bras**, v.33, p.241-246, 2013.

CRUMP, J. A.; KARLSSON, M.S.; GORDON, M. A.; PARRY, C.M. Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial Management of Invasive *Salmonella* Infections. **Clinical Microbiology Review**, v.28, n.4, 2015.

DANZEISEN, J.L.; KIM, H.B.; ISAACSON, R.E.; TU, Z.J.; JOHNSON, T.J. Modulations of the chicken cecal microbiome and metagenome in response to anticoccidial and growth promoter treatment. **PLoS One**, v.6, p.1-14, 2011

DARBY, J.; SHEOREY, H. Searching for *Salmonella*. **Australian Family Physician**, v.37, n.10, 2008.

DAVIDSON, P.M.; SOFOS, J.N.; BRANEN, A.L. Antimicrobials in Food 3rd ed. **Food Science and Technology**, v.143, 2005.

DE JONG, H. K., PARRY, C. M., VAN DER POLL, T., & WIERSINGA, W. J. Host-Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis. **PLOS Pathogens**, v.8(10), 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002933>

DIBNER, J. Early feeding and development of the immune system in neonatal poultry. **J. Appl. Poultry Res**, v.7, p.425-436, 1998.

DOUMITH, M., GODBOLE, G., ASHTON, P., LARKIN, L., DALLMAN, T., DAY, M., DAY, M., MULLER-PEBODY, B., ELLINGTON, M. J., DE PINNA, E., JOHNSON, A. P., HOPKINS, K. L., & WOODFORD, N. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 71(8), 2300–2305, 2016. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw093>

DUCHET-SUCHAUX, M.; MOMPART, F.; BERTHELOT, F.; BEAUMONT, C.; LÉCHOPIER, P.; PARDON, P. Differences in frequently level, and duration of cecal carriage between four outbred chicken lines infected orally with *Salmonella enteritidis*. **Avian Dis**, v.41, p.559-567, 1997.

DUNKLEY, K.; CALLAWAY, T.; CHALOVA, V.; McREYNOLDS, J.; HUME, M.; DUNKLEY, C.; KUBENA, L.; NISBET, D.; RICKE, S. Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. **Anaerobe**, v.15, p.26-35, 2009.

DURING, K.; PORSCH, P.; MAHN, A.; et al. The non-enzymatic microbicidal activity of lysozymes. **FEBS Left**, 1999.

ELLISON III, R.T.; GIEHI, T.J. 1991. Killing of Gram-negative Bacteria by Lactoferrin and Lysozyme. **J. Clin. Invest.** v. 88, October 1991, 1080-1091 p.

EL-SAADONY, M.T.; SALEM, H.M.; EL-TAHAN, A.M.; EL-MAGEED, T.A.A.; SOLIMAN, S.M.; KHAFAGA, A.F.; SWELUM, A.A.; AHMED, A.E.; ALSHAMMARI, F.A.; EL-HACK, M.E.A. The control of poultry salmonellosis using organic agents: an updated overview. **The Poultry Science**, v.101(4), 2022.

EL-SHALL, N. A.; AWAD, A.M.; EL-HACK, M.E. A.; NAIEL, M. A.E.; OTHMAN, S.I.; ALLAM, A. A.; SEDEIK, M.E. The Simultaneous administration of a probiotic or prebiotic with live *Salmonella* vaccine improves growth performance and reduces fecal shedding of the bacterium in *Salmonella*-Challenged broilers. **Animals (Basel)**. v.10(1), 2020.

ENG, S.K; PUSPARAJAH, P.; MUTALIB, N.S. a; SER, H.L.; CHAN, K.G; LEE, L.H. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. **Frontiers in Life Science**, v.8, n.3, p.284-293, 2015.

FAKRUDDIN, M.; MANNAN, K.S.B.; ANDREWS, S. Viable but nonculturable Bacteria: Food Safety and Public Health Perspective. **ISRN Microbiol**, v.3, 2013.
FERNANDES, M.R.; MOURA, Q.; SARTORI, L.; SILVA, K.C.; CUNHA, M.P.V.; SPOSITO, F.; LOPES, R.; OTUTUTMI, L.K.; GONÇALVES, D.D.; DROPA, M.; MATTE, M.H.; MONTE, D.F.; LANDGRAF, M.; FRANCISCO, G.R.; BUENO, M.F.; GARCIA, D.O.; KNÖBL, T.; MORENO, A.M.; LINCOPAN, N. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the mcr-1 gene. **Euro Surveillance**, v.21, p.1-6, 2016.

FANELLI, M.J.; SADLER, W.W.; FRANTI, C.E.; BROWNELL, J.R. Localization of Salmonellae within the intestinal tract of chickens. **Avian Dis.**, v.15, p.366-375, 1971.

FERRATI, R.; MANNUZZU, I.; COCOLIN, L.; COMI, G.; CLEMENTI, F. Twelve-hour PCR-Based Method for Detection of *Salmonella* spp. in Food. **Appl. Environ. Microbiol**, v.67, p.977-978, 2001.

FOLEY, S.L; JOHNSON, T.J.; RICKE, S.C.; NAYAK, R.; DANZEISEN, J. *Salmonella* Pathogenicity and Host adaptation in Chicken-associated serovars. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v.77, n.4, p.582-607, 2013.

FONSECA, B.B.; BELETTI, M.E.; SILVA, M.S.; SILVA, P.L, DUARTE, I.N., ROOSI, D.A. Microbiota of the cecum, ileum morphometry, pH of the crop and performance of broiler chickens supplemented with probiotics. **Rev. Bras. Zootec.**, v.19, p.1756-1760, 2010.

FREITAS NETO, O.C.; PRENHA FILHO, R. A.C; BERCHIERI JR, A. Salmoneloses aviarias. **In: Doenças das Aves**, 3ed., p.491-518, 2020.

GAST, R.K. Serotype-specific and serotype-independent strategies for preharvest control of food-borne *Salmonella* in poultry. **Avian Dis**, v.51, p.817-828, 2007.

GAST, R.K.; PORTER JR, R.E. *Salmonella* Infections. **In: Diseases of Poultry**. 14.ed. p.719-753, 2020.

GAST, R.K.; GUARD-BOULDIN, J.; HOLT, P.S. Colonization of reproductive organs and internal contamination of eggs after experimental infection of laying hens with *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Enteritidis. **Avian Dis**, v.48, p.863-869, 2004.

GAST, R.K.; GURAYA, R.; GUARD-BOULDIN, J.; HOLT, P.S. In vitro penetration of eggs yolks by *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg strains during thirty-six-hour ambient temperature storage. **Poultry Sci**, v.86, p.1431-1435, 2007a.

GAST, R.K. GURAYA, R. GUARD-BOULDIN, J.; HOLT, P.S. Colonization of specific regions of the reproductive tract and deposition at different locations inside eggs laid by hens infected with *Salmonella* Enteritidis or *Salmonella* Heidelberg. **Avian Dis**, v.51, p.40-44, 2007b.

GLENN, L.; LINDSEY, R.L.; FRANK, J.F.; MEINERSMANN, R.J.; ENGLER, M.D.; FEDORKA-CRAY, P.J.; FRYE, J.G. Analysis of Antimicrobial resistance genes detected in multidrug-resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium isolated from food animals. **Microbial Drug Resistance**, v.17., n.3., 2011.

GOGRY, F.A.; SIDDIQUI, M.T.; SULTAN, I.; HUSAIN, F.M.; AL-KHERAIF, A.A.; ALI, A.; HAQ, Q.M.R. Colistin interaction and surface changes associated with *mcr-1* conferred plasmid mediated resistance in *E. coli* and *A. veronii* strains. **Pharmaceutics**, v.14, n.2., 2022.

GONG, M. Efficacy of Lysozyme as an Alternative to Antibiotics for Broiler Chickens. Submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Science. Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia. 1-114 p., 2014.

GONG, J.; ZHANG, J.; XU M.; ZHU, C.; YU, Y.; LIU, X.; KELLY, P.; XU, B.; WANG, C. Prevalence and fimbrial genotype distribution of poultry *Salmonella* isolates in China (2006 to 2012). **Appl. Environ. Microbiol.**, v.80, p.687-693, 2014.

GUERRA, B.; SOTO, S.; MENDONZA, M.C. Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. **Antimicrob Agents Chemother.** 46:2977-2981, 2002.

GUERRA, B.; SOTO, S.; HELMUTH, R.; MENDONZA, M.C. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergence *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i-]. **Antimicrob Agents Chemother**, 45:1305-1308, 2001.

GUNAL, M.; YAYLI, G.; KAYA, O.; KARAHAN, N.; SULAK, O. The effect of antibiotic growth promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance, intestinal microbiota and tissue of broilers. **Int. J. Poult. Sci**, v.5, p.149-155, 2006.

GUREVICH, A.; SAVELIEV, V.; VYAHHI, N.; TESLER, G. QUAST: Quality Assessment Tool for Genome Assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, p. 1072–1075, 2013. doi: 10.1093/bioinformatics/btt086.

HAGHIGHI, H.R.; GONG, J.; GYLES, C.L.; HAYES, M.A.; ZHOU, H.; SANEI, B.; CHAMBERS, J.R.; SHARIF, S. Probiotics stimulate production of natural antibodies in chickens. **Clinical and vaccine immunology**, v.13, n.9, p.975-980, 2006.

HENDERSON, S.C.; BOUNOUS, D.I. LEE, M.D. Early events in the pathogenesis of avian salmonellosis. **Infect Immun**, v.67, p.3580-3586, 1999.

HERBERT, S.; BERA, A.; NERZ, C.; KRAUS, D.; PESCHEL, A.; GOERKE, C.; MEEHL, M.; CHEUNG, A.; GÖTZ, F. Molecular basis of resistance to muramidase and cationic antimicrobial peptide activity of lysozyme in staphylococci. **PLoS pathogens**, v. 3, n. 7, p. e102, 2007

HIGGINS, J.P.; HIGGINS, S.E.; WOLFENDEN, A.D.; HENDERSON, S.N.; TORRES-RODRIGUES, A.; VICENTE, J.L.; HARGIS, B.M.; TELLEZ, G. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture treatment timing on *Salmonella* Enteritidis in neonatal broilers. **Poultry Science**, v.89, p.243-247, 2010.

HOFER, E.; da SILVA FILHO, S.J.; dos REIS, E.M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesqui. Vet. Bras.**, v.17, p.55-62, 1997.

HUFF, G. R.; HUFF, W. E.; RATH, N. C.; EL-GOHARY, F. A.; ZHOU, Z. Y.; SHINI, S. Efficacy of a novel prebiotic and a commercial probiotic in reducing mortality and production losses due to cold stress and *Escherichia coli* challenge of broiler chicks. **Poultry Science**, 94 (5): 918-926, 2015.

IBRAHIM, H.R.; IMAZATO, K.; ONO, H. Human lysozyme possesses novel antimicrobial peptides within its N-terminal domain that target bacterial respiration. **J. Agric. Food Chem.**, v.59, p.10336–10345, 2011.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S. et al. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Res Microbiol**, v. 165, n. 7, p. 526-30, 2014.

JAJERE, S.M. a review of *Salmonella* enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. **Veterinary Worlds**, 2019.

KAMYSZ, W.; TURECKA, K. Antimicrobial preservative effectiveness of natural peptide antibiotics. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 62, f.5, p. 341-344, 2005.

KANASHIRO, A.M.I.; CASTRO, A.G.M.; CARDOSO, A.L.S.P. TESSARI, E.N.C; TAVECHIO, A.T. Persistência de *Salmonella* sp. após antibioticoterapia em psitacídeos pertencentes a um criadouro comercial. **Arq Inst Biol**, v.69, p.99-101, 2002.

KIMUHIRO NOGUCHI, YULIA R. GEL, EDGAR BRUNNER, FRANK KONIETSCHKE. nparLD: An R Software Package for the Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments. **Journal of Statistical Software**, 50(12), 1-23, 2012. URL <http://www.jstatsoft.org/v50/i12/>

KINGSLEY, R. A; VAN AMSTERDAM, K.; KRAMER, N.; BAUMLER, A.J. The *shdA* gene is restricted to serotypes of *Salmonella enterica* subspecies I and contributes to efficient and prolonged fecal shedding. **Infec. Immun**, v.68, p.2720-2727, 2000.

KLEPSEK, M.E.; ERNST, E.J.; LEWIS, R.E.; ERNST, M.E.; PFALLER, M.A. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, p.1207-1212, 1998.

KURTZ, J. R., GOGGINS, J. A., & MCLACHLAN, J. B. *Salmonella* infection: Interplay between the bacteria and host immune system. In **Immunology Letters**, v. 190, p. 42–50, 2017. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.006>

LABUZA, T.P.; TANNEMBAUM, S.R.; KAREL, M. Water content and stability of low moisture and intermediate-moisture foods. **Food Technology**. p.543-550, 1970.

LEON-VELARDE, C.G.; ZOSHERAFATEIN, L.; ODUMERU, J. A. Application of an automated immunomagnetic separation-enzyme immunoassay for the detection of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* from poultry environmental swabs. **J. Microbiol. Methods**, v.79, p.13-17, 2009.

LI, W., LI, H., ZHENG, S., WANG, Z., SHENG, H., SHI, C., SHI, X., NIU, Q., & YANG, B. Prevalence, Serotype, Antibiotic Susceptibility, and Genotype of *Salmonella* in Eggs from Poultry Farms and Marketplaces in Yangling, Shaanxi Province, China. **Frontiers in Microbiology**, 11, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01482>

LIMA, P.R. Avaliação da atividade e estabilidade da lisozima da clara de ovo submetida ao tratamento com campo magnético. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

LIU, D.; GUO, Y.; WANG, Z.; YUAN, J. Exogenous lysozyme influences *Clostridium perfringens* colonization and intestinal barrier function in broiler chickens. **Avian Pathology**, v.39, p.17-24, 2010.

LISTON, S. D., OVCHINNIKOVA, O. G., & WHITFIELD, C. Unique lipid anchor attaches Vi antigen capsule to the surface of *Salmonella enterica* serovar Typhi. **PNAS**, v.113(24), p. 6719–6724, 2016. <https://doi.org/10.1073/pnas.1524665113>

LOSSO, J.N., NAKAI, S., CHARTER, E.A. Lysozyme. In: **Natural Food Antimicrobial Systems**. c.6, p.26, 2000.

LOSTROH, C. P., & LEE, C. A. The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. In **Microbes and Infection**, v. 3, Issues 14–15, p. 1281–1291. Elsevier Masson, 2001. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01488-5](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01488-5)

LUKACIK, P.; BARNARD, T.J.; KELLER, P.W.; CHATURVEDI, K.S.; SEDDIKI, N.; FAIRMAN, J.W.; NOINAJ, N.; KIRBY, T.L.; HENDERSON, J.P.; STEVEN, A.C.; et al. Structural engineering of a phage lysin that targets gram-negative pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.109, p.9857–9862, 2012.

LUTFUL KABIR, S.M. avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v.7, p.89-114.

MA, K.; DENG, Y.; BAI, Y.; XU, D.; CHEN, E.; WU, H.; LI, B.; GAO, L. Rapid and simultaneous detection of *Salmonella*, *Shigella*, and *Staphylococcus aureus* in fresh pork using a multiplex real-time PCR assay based on immunomagnetic separation. **Food Control**, v.42, p.87-93, 2014.

MARANA, S.R., CANÇADO, F.C., VALÉRIO, A.A., FERREIRA, C., TERRA, W.R., BARBORA, J.A.R.G. Crystallization, data collection and phasing of two digestive lysozymes from *Musca domestica*. **Acta Cryst.** V,62, p.750-752, 2006.

MASSCHALCK, B; HOUDT, R.V.; HAVER, E.G.R.V; MICHIELS, C.W. Inactivation of Gram-Negative Bacteria by Lysozyme, Denatured Lysozyme, and Lysozyme-Derived Peptides under high Hydrostatic Pressure. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.1, p. 339-344, 2001.

MCQUISTON, J.R.; HERRERA-LEON, S.; WERTHEIM, B.C.; DOYLE, J.; FIELDS, P.I.; TAUXE, R.V.; LOGSDON JR, J.M. Molecular Phylogeny of the Salmonellae: Relationships among *Salmonella* species and Subspecies Determined from Four Housekeeping genes and Evidence of Lateral Gene Transfer Events. **Journal of Bacteriology**, p.7060-7067, 2008.

MEDEIROS, B.G.S.; LUCENA, V.S.; CONFESSOR, M.V. A.; PEIXOTO, M.S.R.M.; OLIVEIRA, S.S.S.; RAMOS, S.R. Análise Molecular da atividade antimicrobiana da Lisozima. **Bio Farm**, v.13, 2017.

MENÃO, M.C.; KNÖBL, T. Microbiologia Veterinária. **In: Fundamentos da Microbiologia**, p.49-80, 2016.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Governo Federal. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/salmonelas>> Acesso em setembro de 2020.

Ministério da Saúde – SVS. Disponível em <<https://www.gov.br/saude/pt-br>> Acesso em setembro de 2020.

MOHAMMADAGHERI, N.; NAJAFI, R.; NAJAFI, G. Effects of dietary supplementation of organic acids and phytase on performance and intestinal histomorphology of broilers. **Vet Res Forum**, 7(3):189-195, 2016.

MOHD SHAUFI, M.A.; SIEO, A.C.C.; CHONG, C.W.; GAN, H.M.; HO, Y.W. Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. **Gut Pathogens**, v.7, p.1-12, 2015.

MOR, O.G. Persistent Infection and Long-Term Carriage of Typhoidal and Nontyphoidal Salmonellae. **Clinical Microbiology Reviews**, v.32, 2019.

MYERS, F. A.; LEFEVRE, P.; MANTOUVALOU, E.; BRUCE, K.; LACROIX, C.; et al. Developmental activation of the lysozyme gene in chicken macrophage cells is linked to core histone acetylation at its enhancer elements. **Nucleic Acid Res**, v.34, p.3025-3035, 2006.

NAIR, D. V. T., VENKITANARAYANAN, K., & JOHNY, A. K. Antibiotic-resistant *Salmonella* in the food supply and the potential role of antibiotic alternatives for control. **In: Foods** (Vol. 7, Issue 10) MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2018. <https://doi.org/10.3390/foods7100167>

NAKPHAICHIT, M.; THANOMWONGWATTANA, S.; PHRAEPHAISARN, C.; SAKAMOTO, N.; KEAWSOMPONG, S.; NAKAYAMA, J.; NITISINPRASERT, S. The effect of including *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 during post-hatch feeding on the growth and ileum microbiota of broiler chickens. **Poultry Science**, v.90, p.2753-2765, 2011. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01637>

National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. M-27A. Villanova, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1997.

NATTRESS, F.M.; YOST, C.K.; BAKER, L.P. Evaluation of the ability of lysozyme and nisin to control meat spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, p.111-119, 2001.

NISSON, R.E.; ROSS, T.; BOWMAN, J.P. Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. **Int. J Food Microbiol**, v.150, p.14-24, 2011.

NOGUEIRA, L.B. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Pouteria* spp. e de triterpenos quinonametídeos com enfoque no *Helicobacter pylori*. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual Paulista, p.160, 2012.

OGUNDELE, M.O. A novel anti-inflammatory activity of lysozyme: modulation of serum complement activation. **Short Communication. Mediators of Inflammation**, v.7, p.363-365, 1998.

OLIVEIRA, S.D.; FLORES, F.S.; SANTOS, L.R.; BRANDELLI, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human ad poultry-related samples. **International Journal of Food Microbiology**, v.97, n.3, p.297-305, 2005.

OLIVEIRA, S.D.; SANTOS, L.R.; SCHUCH, D.M.T.; SILVA, A.B.; SALLE, C.T.P.; CANAL, C.W. Detection, and Identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. **Vet. Microbiol**, v.87, p.25-35, 2002.

OLIVER, J.D.; Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.34, p.415-425, 2010.

O'NEILL, J. **Antimicrobial Resistance**: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. The Review on Antimicrobial Resistance. 2014.

Organização Mundial da Saúde Animal – OIE. Disponível em <<http://www.oie.int/>> Acesso em Agosto de 2020.

Organização Mundial de Saúde – OMS. Disponível em: <<http://www.who.int/eportuguese/countries/bra/pt/>> Acesso em Agosto de 2020.

PAINTER, J. A. HOEKSTRA, R.M., AYERS, T; TAUXE, R.V.; BRADEN, C.R.; ANGULO, F.J.; et al.; Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, Unites States, 1998-2008. **Emerg Infect Dis**, 2013.

PAN, D.; YU, Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. **Gut Microbes**, v.5, p.108-119, 2014.

PANIEL N.; NOGUER, T. Detection of *Salmonella* in food matrices, from conventional methods to recent aptamer-sensing technologies. **Foods**, 2019.

PARK, S.-I.; DAESCHEL, M.A.; ZHAO, Y. Functional Properties of Antimicrobial Lysozyme-Chitosan Composite Films. **J. Food Sci.**, v.69, p.M215–M221, 2004.

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

PAUL, S.K.; HALDER, G.; MONDAL, M.K.; SAMANTA, G. Effect of organic acid salt on the performance and gut health of broiler chicken. **J. Poult. Sci**, v.44, p.389-395, 2007.

PELLEGRINI, A., THOMAS, U., WILD, P., SCHRANER, E., FELLEBERG, R.V. Effect of lysozyme or modified lysozyme fragments on DNA and RNA synthesis and membrane permeability of *Escherichia coli*. **Microbiological Research**, v.155, p.69-77, 2000.

PENHA FILHO, R. A.C. FERREIRA, J.C.; KANASHIRO, A.M.I.; BERCHIERI, A.Jr.; DARINI, A.L.C. Emergent multidrug-resistant nontyphoidal *Salmonella* serovars isolated from poultry in Brazil coharboring *bla*CTX-M-2 and *qnr*B or *bla*CMY-2 in large plasmids. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**, v.95, p.93-98, 2019.

PEREIRA, O.F.G. **Concentrações Inibitória e Bactericida Mínimas na atividade antimicrobiana da Lisozima**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2019

PERIN, A.P.; MARTINS, B.T.F.; BARREIROS, M. A.B.; YAMATOGLI, R.S.; NERO, L. A.; BERSOT, L.S. Occurrence, quantification, pulse types, and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* sp. isolated from chicken meat in the state of Parana, Brazil. **Braz. J. Microbiol**, v.51, p.335-345, 2020.

PORNSUKAROM, S., VAN VLIET, A. H. M., & THAKUR, S. Whole genome sequencing analysis of multiple *Salmonella* serovars provides insights into phylogenetic relatedness, antimicrobial resistance, and virulence markers across humans, food animals and agriculture environmental sources. **BMC Genomics**, 19(1), 2018. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5137-4>

POTARD, A. B., & GROISMAN, E. A. The *Salmonella* *sefC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. **The EMBO Journal**, v.16(17), p.5376–5385, 1997.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020. URL <https://www.R-project.org/>.

RABELLO, R. F., BONELLI, R. R., PENNA, B. A., ALBUQUERQUE, J. P., SOUZA, R. M., & CERQUEIRA, A. M. F. Antimicrobial Resistance in Farm Animals in Brazil: An Update Overview. **Animals**, v.10, p.552, 2020. <https://doi.org/10.3390/ani10040552>

RASFF – The Rapid Alert System for Food and Feed. **Food and Feed Safety Alerts**, 2020. Disponível em <<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/>> Acesso em Dezembro de 2022.

RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from clinical and environmental broiler chickens and breeder's broiler, **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, n.60, v.5, 2008.

ROUCHON, C. N., WEINSTEIN, A. J., HUTCHISON, C. A., ZUBAIR-NIZAMI, Z. B., KOHLER, P. L., & FRANK, K. L. Disruption of the *tagF* Orthologue in the *epa* Locus Variable Region of *Enterococcus faecalis* Causes Cell Surface Changes and Suppresses an eep-Dependent Lysozyme Resistance Phenotype. **Journal of Bacteriology**, 204(10), e00247-22, 2022.

RUBIO, M.S. Tese de Doutorado intitulada Utilização de PCR em tempo real quantitativo para diagnóstico diferencial entre *Salmonella enterica* subesp *enterica* sorovares Enteritidis, Typhimurium e Gallinarum (Biovares Gallinarum e Pullorum) em aves domésticas (*Gallus*). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp Jaboticabal, 2017.

SABO, S.S.; MENDES, A.M.; ARAÚJO, E.D.; MURADIAN, L.B.A.; MAKIYAMA, E.N.; LEBLANC, J.G.; BORELLI, P.; FOCK, R.A.; KNÖBL, 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.1-14, 2020.

SAHOO, N.R.; KUMAR, P.; BHUSAN, B.; BHATTACHARYA, T.K.; DAYAL, S.; SAHOO M. 2012. Lysozyme in Livestock: A Guide to Selection for Disease Resistance: A Review. **J. Anim. Sci. Adv.**, 2012, 2(4):347-360 p.

SAN MARTIN, B.; LAPIERRE, L.; TORO, C.; BRAVO, V.; CORNEJO, J.; HORMAZABAL, J.C.; BORIE, C. Isolation, and molecular characterization of quinolone resistant *Salmonella* spp. From poultry farms. **Veterinary Microbiology**, v.110, n.3/4, p.239-244, 2005.

SAIDENBERG, A.B.S.; FRANCO, L.S.; REPLE, J.N.; HOUNMANOU, Y.M.G.; CASAS, M.R.T.; CARDOSO, B.; ESPOSITO, F., LINCOPAN, N.; DALSGAARD, A.; STEGGER, M.; KNÖBL, T. *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Minnesota in Brazilian broilers: Genomic characterization of third-generation cephalosporin and fluoroquinolone-resistant strains. **Applied Microbiology International**, p.1-10, 2022.

SAHL, J.W.; LEMMER, D.; TRAVIS, J.; SCHUPP, J.M.; GILLECE, J.D; AZIZ, M. *et al.* NASP: an accurate, rapid method for the identification of SNPs in WGS datasets that supports flexible input and output formats. *Microbial Genome*, 2, e000074, 2016

SCHNEID, A.D. S.; RODRIGUES, K.L.; CHEMELLO, D.; TONDO, E.C.; AYUB, M. A.Z.; ALEIXO, J. A.G. Evaluation of an indirect ELISA for the detection of *Salmonella* in chicken meat. **Braz. J. Microbiol.**, v.37, p.350-355, 2006.

SHERMAN, E. X., HUFNAGEL, D. A., & WEISS, D. S. MCR-1 confers cross-resistance to lysozyme. **The Lancet Infectious Diseases**, 16(11), 1226-1227, 2016.

SILVA, S.G.S. Clonagem, expressão e caracterização de lisozima de *Anopheles darlingi* em *Pichia pastoris*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas, 2019.

SILVA, K.C., FONTES, L.C., MORENO, A.M., ASTOLFI-FERREIRA, C.S., FERREIRA, A.J.P., LINCOPAN, N. Emergence of Extended-Spectrum- β -Lactamase CTX-M-2 Producing *Salmonella* enterica Serovars Schwarzengrund and Agona in Poultry Farms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.57, n.7, p.3458-3459, 2013.

SHI, Z., ROTHROCK, M. J., & RICKE, S. C. Applications of microbiome analyses in alternative poultry broiler production systems. **In: Frontiers in Veterinary Science** (Vol. 6, Issue MAY). Frontiers Media S.A, 2019. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00157>

SHINOHARA, N.K.S.; BARROS, V.B.; JIMENEZ, S.M.C; MACHADO, E.C.L.; DUTRA, R.A.F.; LIMA FILHO, J.L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Cien Saude Colet**, v.13, p.1675-1683, 2008.

SOUZA, A.I.S.; SARAIVA, M.M.; CASAS, M.R.T.; OLIVEIRA, G.M.; CARDOZO, M.V.; BENEVIDES, V.P.; BARBOSA, F.O.; FREITAS NETO, O.C.; ALMEIDA, A.M.; BERCHIERI Jr. A. High occurrence of β -lactamase-producing *Salmonella* Heidelberg from poultry origin. **PLOS One**, v.15, 2020.

SOUZA, R.B.; MAGNANI, M.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Mecanismos de Resistência as quinolonas em *Salmonella* spp. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, n.2, p.413-428, 2010.

SONCINI, R. A., 2002. Controle de *Salmonella* Enteritidis na avicultura. Disponível em

<http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/anais0204_bsa_soncini.pdf> Acesso em: setembro 2020

SPECTOR, M. P., & KENYON, W. J. Resistance, and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. In: **Food Research International** (Vol. 45, Issue 2, pp. 455–481), 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.056>

SUN, Q.; ZHAO, G.; DOU, W. a nonenzymatic optical immunoassay strategy for detection of *Salmonella* infection based on blue silica nanoparticles. **Anal. Chim. Acta**, 2015.

TELLEZ, G., PIXLEY, C., WOLFENDEN, R. E., LAYTON, S. L., & HARGIS, B. M. Probiotics/direct fed microbials for *Salmonella* control in poultry. **Food Research International**, 45(2), p. 628–633, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.047>

THOMSON, N. R., CLAYTON, D. J., WINDHORST, D., VERNIKOS, G., DAVIDSON, S., CHURCHER, C., QUAIL, M. A., STEVENS, M., JONES, M. A., WATSON, M., BARRON, A., LAYTON, A., PICKARD, D., KINGSLEY, R. A., BIGNELL, A., CLARK, L., HARRIS, B., ORMOND, D., ABDELLAH, Z., ... PARKHILL, J. Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. **Genome Research**, 18(10), p.1624–1637, 2018. <https://doi.org/10.1101/gr.077404.108>

TORREGGIANI, A.; TAMBA, M.; MANCO, I.; FARAONE-MENNELLA, M.R.; FERRERI, C.; CHATGILIALOGLU, C. Radiation damage of lysozyme in a biomimetic model: some insights by Raman spectroscopy. **Journal Molecular Structure**, v.744-747, p.767-773, 2005.

TRAN, T. H. T., EVERAERT, N., & BINDELLE, J. Review on the effects of potential prebiotics on controlling intestinal enteropathogens *Salmonella* and *Escherichia coli* in pig production. In **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.102, ed.1, p.17–32, 2018. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jpn.12666>

VANDERKELEN, L.; ONS, E.; VAN HERREWEGHE, J.; CALLEWART, L.; GODDEERIS, B.; MICHIELS, C. Role of lysozyme inhibitors in the virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. **PLOS One**, v.7, 2012.

VELLANO, I.H.B. Comparação de aspectos microbiológicos, patológicos e zootécnicos entre frangos e perus de corte desafiados com *Salmonella* Heidelberg. **Dissertação de Mestrado**. Botucatu, 2019.

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 serotype. **Vet. Res.**, v.36, p.267-288, 2005.

VINUENZA-BURGOS, C.; CEVALLOS, M.; RON-GARRIDO, L.; BERTRAND, S.; DE ZUTTER, L. Prevalence and Diversity of *Salmonella* Serotypes in Ecuadorian Broilers at Slaughter age. **Plos One** 11(7): e0159567.

XIA, S.; YU, Z.; LIU, D.; XU, C.; LAI, W. Developing a novel immunochromatographic test strip with gold magnetic bifunctional nanobeads (GMBN) for efficient detection of *Salmonella choleraesuis* in milk. **Food Control**, v.59, p.507-512, 2016.

WALTMAN, W.D.; GAST, R.K.; MALLINSON, E.T. Salmonellosis. In: **Isolation and Identification of Avian Pathogens**, v.5, p.3-9, 2008.

WANG, X.; FARNELL, Y. Z.; PEEBLES, E. D.; KIESS, A. S.; WAMSLEY, K. G.; ZHAI, W. Effects of prebiotics, probiotics, and their combination on growth performance, small intestine morphology, and resident *Lactobacillus* of male broilers. **Poultry Science**, 95 (6): 1332-1340, 2016.

WANG, M., QAZI, I. H., WANG, L., ZHOU, G., & HAN, H. *Salmonella* Virulence and Immune Escape. **MDPI**, v.8, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030407>

WATTIAU, P.; BOLAND, C.; BERTRAND, S. Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives. **Appl Environ. Microbiol.** v.77, p.7877-7885, 2016

WASSERFALL, F.; TEUBER, M. action of egg white lysozyme on *Clostridium tyrobutyricum*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.38, p.197-199, 1979.

WEBBER, B.; BORGES, K. A.; FURIAN, T. Q.; RIZZO, N. N.; TONDO, E.C.; SANTOS, L.R.; RODRIGUES, L.B.; Nascimento, V.P. Detection of virulence genes in *Salmonella* Heidelberg isolated from chicken carcasses. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 61, e.36, 2019.

WHO. The evolving threat of antimicrobial resistance. Options for World Health Organization, 2012. Disponível em <http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241503181_eng.pdf> Acesso em Outubro de 2020.

WIEDEMANN, A.; VIRLOGEUX-PAYANT, I.; CHAUSSÉ, A.; SCHIKORA, A.; VELGE, P. Interactions of *Salmonella* with animals and plants. **Frontiers in Microbiology**, v.5, 2015.

WU, T.; WU, C.; FU, S.; WANG, L.; YUAN, C.; SHIGUO, C.; YAQIN, HU. Integration of lysozyme into chitosan nanoparticles for improving antibacterial activity. **Carbohydrate Polymers**, p.192-2000, 2016.

YOSHIDA, C.; GURNIK, S.; AHMAD, A.; BLIMKIE, T.; MURPHY, S. A.; KROPINSKI, A. M. Evaluation of Molecular Methods for Identification of *Salmonella* Serovars. **Journal of Clinical Microbiology**, v.54, n.8, 2016.

ZHANG, K., RIBA, A., NIETSCHKE, M., TOROW, N., REPNIK, U., PÜTZ, A., FULDE, M., DUPONT, A., HENSEL, M., & HORNEF, M. Minimal SPI1-T3SS effector requirement for *Salmonella* enterocyte invasion and intracellular proliferation in vivo. **PLoS Pathogens**, 14(3), 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006925>

ZHANG, H.; FENG, M.; CHEN, S.; SHI, W.; WANG, X. Incorporation of lysozyme into cellulose nanocrystals stabilized β -chitosan nanoparticles with enhanced antibacterial activity. **Carbohydr. Polym.**, v.236, 115974, 2020.

ZISHIRI, O. T., MKHIZE, N., MUKARATIRWA, S., & ZISHIRI, O. Prevalence of Virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* spp. isolated from commercial chickens and human clinical isolates from South Africa and Brazil. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, 2016. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v83i1.1067>.