Rua Krebsfer, 736, Macuco, Valinhos/SP – Brazil - Cep: 13279-450 - tel: +55 19 3881-5700 - www.kemin.com

A era pós-antibiótico está chegando. Que opções temos agora para gerenciar o *Enterococcus cecorum*?

Autores: Krithika Venkatasubramanian & Natasja Smeets, Scientists, Kemin Industries
Apichaya Taechavasonyoo, Product Manager, Kemin Animal Nutrition and Health, Asia Pacific
Susanne Kirwan, Technical Service Manager IH, Kemin Industries

INTRODUÇÃO

Reportado em todo o mundo nas últimas duas décadas, o *Enterococcus cecorum* deixou de ser descrito como uma zoonose inofensiva (Jung, et al. 2018) para se tornar um patógeno grave para a maioria das espécies de aves. De acordo com a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) (2022), *E. cecorum* tornou-se um dos agentes patogênicos mais relevantes a abrigar genes AMR (Resistência Antimicrobiana) na Europa. Nos últimos 10 anos, *E. cecorum* emergiu como um importante patógeno avícola e foram relatados surtos na Europa, EUA, Tailândia, Austrália, Nova Zelândia e, mais recentemente, também na África do Sul e Malásia.

A bactéria Gram-positiva, que é anaeróbica facultativa, pode ser isolada de aves afetadas, mas caracteristicamente é identificada pela primeira vez por distúrbios esquelético e articular em frangos adultos. Além disso, também está associada a pintinhos fracos, o que resulta em um aumento no número de pintos que não conseguem romper a casca ao nascer.

A rápida transmissão de *E. cecorum* nas unidades avícolas parece ocorrer principalmente por via oral, bem como por transmissão por aerossóis e lesões de pele. A infecção inicial pode resultar em septicemia; caso contrário, a doença frequentemente transita para um estágio subagudo. Os estágios mais tardios, a partir das duas semanas em diante, são caracterizados por claudicação e pela síndrome de "Kinky Back" (espondilolistese) em casos extremos. Embora a via de transmissão não tenha sido totalmente elucidada, foram propostas vias orais e/ou aerossóis que corresponderiam à transmissão descrita para outras *Enterococcu*s spp.

As estratégias de controle atuais geralmente dependem de antibióticos, especialmente eritromicina e clortetraciclina. Este tratamento beneficia principalmente as aves em risco de serem infectadas, mas traz menos benefícios às aves que já estão clinicamente doentes. Um desafio adicional é que o nível de resistência aos antibióticos está aumentando rapidamente, reduzindo, assim, seu efeito terapêutico (Laurentie, et al. 2023).

O aumento da pressão global para a utilização prudente de antibióticos torna urgente o uso de ferramentas adicionais para manter a produção e o bem-estar de aves sob o desafio por *E. cecorum*. O presente estudo *in vitro* propõe explorar cepas probióticas específicas para apoiar o manejo de *E. cecorum* em granjas avícolas.

Postulou-se que as soluções que modulam a microbiota intestinal reduzem o crescimento excessivo de cepas patogênicas de *E. cecorum* e promovem a integridade intestinal, evitando a translocação intestinal e contribuindo para a redução da gravidade do problema. *Bacillus sp*. PB6, que é conhecido por modular a microbiota intestinal e promover a integridade intestinal, pode ser um candidato potencial para isso. No entanto, com o desenvolvimento de cepas

© Kemin Industries, Inc. e seu grupo de empresas 2024. All rights reserved. ®™ Trademarks of Kemin Industries, Inc., U.S.A.

adicionais contendo potenciais modos de ação aditivos para modular o crescimento de *E. cecorum*; uma combinação de *Bacillus* spp. (*Bacillus* sp. PB6, FXA e G3 (ENTEROSURE™) foram incluídos no ensaio *in vitro*).

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação de cultura probiótica: 1 g de cada cepa de *Bacillus spp*. do ENTEROSURE™ foi adicionada em 9 ml de solução salina estéril e incubada em banho-maria a 80°C por 10 min para eliminar quaisquer outras células vegetativas/ contaminantes na amostra. Após a incubação, 2 ml da cultura de esporos foram inoculados em 100 ml de caldo Tryptic Soy (TSB) contendo 0,6% de extrato de levedura e incubados a 37°C durante a noite a 120 rpm em uma incubadora com agitação. As culturas foram repassadas mais uma vez antes do uso. Para o repasse, novamente, 2 ml de cada cultura foram inoculados em 100 ml de TSB com 0,6% de extrato de levedura e incubados durante 24 horas a 37°C numa incubadora com agitação a 120 rpm.

Preparação de sobrenadante livre de células (CFS): 10 ml de cada cepa de *Bacillus spp.* foram recolhidas em tubos de centrífuga estéreis de 15 ml e centrifugadas a 20°C a 10.000 rpm durante 10 min. Os sobrenadantes foram esterilizados por filtração utilizando filtros de seringa estéreis de 0,22 µm.

Preparação de cultura de patógenos: A cepa de *E. cecorum* ATCC 43198 foi preparada como estoque de glicerol usando 50% de glicerol e 50% de TSB e armazenada a -80°C. Uma fração de 1 ml de estoque de glicerol foi inoculada em 100 ml de Brain Heart Infusion e incubada a 37°C durante a noite a 120 rpm em uma incubadora com agitação. As culturas durante a noite foram diluídas até uma densidade óptica (DO) de 0,4 para o ensaio de inibição.

Ensaio de microtitulação: O efeito inibitório do crescimento do ENTEROSURE™ foi testado contra *E. cecorum* em um ensaio de placa de microtitulação. O crescimento foi monitorado medindo automaticamente a DO a 600 nm a cada 20 minutos durante 20 horas. As placas foram incubadas a 37°C. A placa foi pré-ajustada para agitar durante 10 segundos para cada leitura de densidade óptica. Os poços de teste consistiam em 100 µl do patógeno (100 vezes diluído da cultura 0,1 DO) em TSB e 100 µl de CFS (mistura das três culturas probióticas de Bacillus spp.). Os poços de controle de cultura consistiram em 100 µl do patógeno E. cecorum + 100 µl de meio TSB. Um controle de meio consistiu em 100 µl de meio TSB e 100 µl de água deionizada estéril.

RESULTADOS

Os resultados do experimento podem ser encontrados no gráfico abaixo. O controle de *E. cecorum* indica que a cepa foi capaz de crescer bem nas condições experimentais. O controle do meio não mostrou contaminações nos poços. Mais importante ainda, o experimento mostrou que o ENTEROSURE™ foi capaz de inibir completamente o crescimento de E. cecorum durante o experimento.

© Kemin Industries, Inc. e seu grupo de empresas 2024. All rights reserved. ®™ Trademarks of Kemin Industries, Inc., U.S.A.

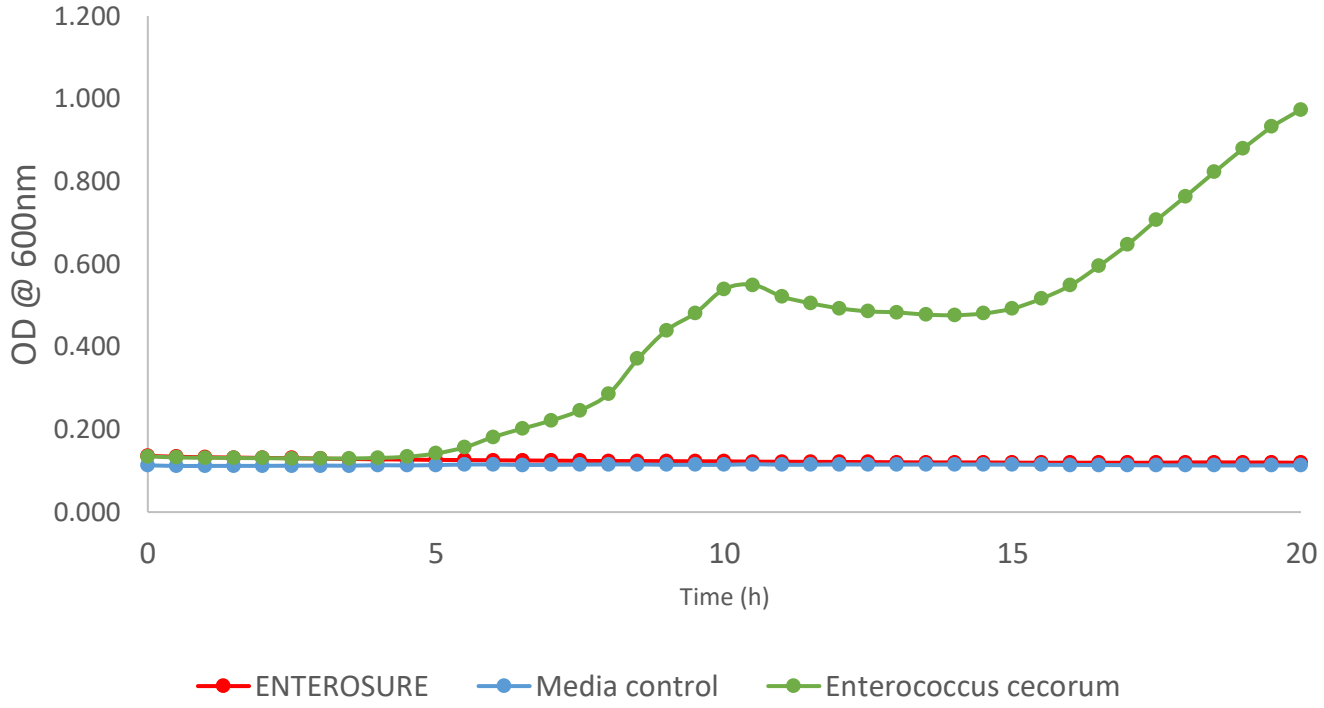

Figura 1 - Curva de crescimento de *E. cecorum* em 20 horas 1) Controle Negativo (azul) 2) Controle Positivo (Verde) e 3) no sobrenadante de ENTEROSURE™

DISCUSSÃO

Os antibióticos não são uma solução completa para o *E. cecorum*, nem um probiótico resolverá completamente o problema. Contudo, o trabalho in vitro indica que uma combinação das três cepas encontradas no ENTEROSURE™ inibiu o *Enterococcus*. Isto dá ao probiótico o potencial de também agir sobre o patógeno em populações de frangos de corte.

É bem definido que *E. cecorum* precisa ser translocado para fora do intestino para que ocorram doenças clínicas. Existem evidências científicas de que *Bacillus sp*. PB6, uma das cepas do ENTEROSURE™, melhora a estrutura intestinal, oferecendo assim um suporte potencial adicional para frangos de corte e matrizes versus *Enterococcus*.

Finalmente, como qualquer patógeno, a doença clínica ocorre quando um patógeno cresce demais. Com a capacidade do ENTEROSURE™ de manter a diversidade do microbioma, ele pode impedir o crescimento excessivo dos *E. cecorum* presentes.

Com estes três modos de ação propostos, dois dos quais já foram comprovados in vivo, o ENTEROSURE™ tem o potencial de gerenciar os desafios do *E. cecorum* na produção comercial de frangos de corte.

© Kemin Industries, Inc. e seu grupo de empresas 2024. All rights reserved. ®™ Trademarks of Kemin Industries, Inc., U.S.A.

Referências

1. Arne Jung, Laura R. Chen, M. Mitsu Suyemoto, H. John Barnes, Luke B. Borst (2018). A Review of *Enterococcus cecorum* Infection in Poultry. Avian Diseases, 62(3):261-271. https://doi.org/10.1637/11825-030618-review.1
2. Jeanne Laurentie, Gwenaelle Mourand, Eric Jouy, Stéphanie Bougeard, Alassane Keita, Michel Amelot, Pascale Serror, Isabelle Kempf (2023). Study of the effect of administration of narasin or antibiotics on in vivo selection of a narasin- and multidrug-resistant *Enterococcus cecorum* strain. Veterinary Microbiology, 282: 109757. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2023.109757.
3. EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), Nielsen SS, Bicout DJ, et al. (2022). Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): antimicrobial-resistant *Enterococcus cecorum* in poultry. EFSA journal, 20(2):e07126. DOI: 10.2903/j.efsa.2022.7126.
4. Sathishkumar Jayaraman, Partha Pratim Das, Prakash Chandra Saini, Barun Roy, Paresh Nath Chatterjee, (2017) Use of Bacillus Subtilis PB6 as a potential antibiotic growth promoter replacement in improving performance of broiler birds; Poultry Science, Volume 96, Issue 8,https://doi.org/10.3382/ps/pex079.

© Kemin Industries, Inc. e seu grupo de empresas 2024. All rights reserved. ®™ Trademarks of Kemin Industries, Inc., U.S.A.