

## INFLUÊNCIA DO NÍVEL PROTÉICO E/OU DA ACIDIFICAÇÃO DA DIETA SOBRE A DIARRÉIA PÓS-DESMAME EM LEITÕES CAUSADA POR *Escherichia coli*<sup>1</sup>

NELSON MORES<sup>2</sup>, JOSÉ LUIZ L. MARQUES<sup>2</sup>, JURIJ SOBESTIANSKY<sup>2</sup>, AIESCA OLIVEIRA<sup>2</sup> e LUIS SÉRGIO S. COELHO<sup>2</sup>

**ABSTRACT.**- Mores N., Marques, J.L.L., Sobestiansky, J., Oliveira, A., Coelho L.S.S. 1990. [Effect of pigs diet protein level and/or acidification in the *Escherichia coli* post-weaning diarrhea.] Influência do nível proteico e/ou da acidificação da dieta sobre a diarreia pós-desmama por *Escherichia coli*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 10(3/4):85-88. Embrapa-CNPSA, Caixa Postal D-3, Concórdia, SC 89700, Brazil.

An experimental study was conducted to evaluate the possibility of preventing *Escherichia coli* post-weaning diarrhea reducing the protein level and/or acidifying the diet. Sixteen SPF (Specific Pathogen Free) Landrace piglets, 36 days old (weaning day) were used in four treatments (T) as follow: TA) control ration with 20% crude protein (CP); TB) ration similar to TA with 2% citric acid; TC) ration with 16% CP plus lysine up to 0.9%; and TD) ration similar to TC plus 2% citric acid. Rations were formulated with corn, soybean meal, minerals and vitamins. The pigs received the experimental diets from D<sub>0</sub> (weaning day) to D<sub>10</sub> (slaughter day). All piglets were inoculated with 20 ml of *E. coli* culture 0141 K85 with 10<sup>9</sup> CFU/ml on the day D<sub>3</sub> and D<sub>4</sub>. The parameters analysed were, occurrence of diarrhea, faeces elimination and intestinal colonization with the *E. coli* sample inoculated, gastrointestinal content pH and small intestine histology. The addition of citric acid (TB) as well as CP reduction (TC) in the diet caused a benefic effect on the *E. coli* diarrhea. This effect was more evident with the CP reduction and addition of the acid simultaneously (TD). The diarrhea was prevented, probably, by the reduction of stomach and jejunum pH and by avoiding an exaggerated *E. coli* multiplication in the intestinal content.

**INDEX TERMS:** Pigs, post-weaning diarrhea, diet protein reduction, diet acidification.

**SINOPSE.** - Estudou-se experimentalmente a possibilidade de se prevenir a diarreia pós-desmama por *Escherichia coli* através da redução da proteína e/ou acidificação da dieta. Utilizaram-se 16 leitões Landrace SPF (Specific Pathogen Free) com 35 dias de idade (dia da desmama), distribuídos em quatro tratamentos (T): T<sub>A</sub> - ração controle com 20% de PB; T<sub>B</sub> - ração do T<sub>A</sub> com 2% de ácido cítrico; T<sub>C</sub> - ração com 16% PB mais lisina até nível de 0,9%; T<sub>D</sub> - ração do T<sub>C</sub> mais 2% do ácido cítrico. As rações foram formuladas com milho, farelo de soja, minerais e vitaminas. Os leitões receberam as dietas experimentais do D<sub>0</sub> (dia da desmama) até D<sub>10</sub> (dia do sacrifício). Todos os leitões foram inoculados com 20 ml de um cultivo de *E. coli* 0141 K85 contendo 10<sup>9</sup> UFC/ml, nos dias D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>. Os parâmetros analisados foram: ocorrência de diarreia, eliminação nas fezes e colonização intestinal da amostra de *E. coli* inoculada, pH do conteúdo gastrointestinal e histologia do intestino delgado. Tanto a adição do ácido cítrico (T<sub>B</sub>) como a redução da PB (T<sub>C</sub>) na dieta tiveram efeito benéfico na ocorrência da diarreia por *E. coli*. Este efeito mostrou-se mais evidente com a redução da PB e adição do ácido simultaneamente (T<sub>D</sub>). A diarreia foi prevenida, possivelmente

pela redução do pH do estômago e jejuno e por evitar a multiplicação exagerada de *E. coli* no conteúdo intestinal.

**TERMOS PARA INDEXAÇÃO.** Leitões, diarreia pós-desmama, redução de proteína, acidificação.

### INTRODUÇÃO

A diarreia pós-desmama em leitões, associada a *Escherichia coli*, é um problema freqüente nos sistemas de produção intensiva, especialmente quando a idade de desmama é reduzida. Esta diarreia pode ser favorecida pela imaturidade do sistema digestivo dos leitões e pelas condições ambientais, nutricionais e de manejo a que eles são submetidos. Leitões, nestas condições, facilmente são agredidos por patógenos entéricos, incluindo-se bactérias, vírus e protozoários (Tzipori et al. 1980, Madec & Josse 1983) que desencadeiam um quadro de diarreia.

Na enterotoxemia pós-desmama por *E. coli*, vários fatores relacionados com a alimentação dos leitões, podem influenciar a freqüência e severidade da diarreia (Prohászka & Baron 1980, Bertschinger et al. 1983, Miller et al. 1983, Byerne & Hall 1984). Rações com alto teor de proteína bruta (21%) desempenham papel preponderante

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 24 de fevereiro de 1989.

<sup>2</sup> Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPSA), Embrapa, Caixa Postal D-3, Concórdia, Santa Catarina 89700.

no estabelecimento do quadro de diarreia pós-desmama por *E. coli* (Proháská & Baron 1980). Neste trabalho, testou-se experimentalmente a acidificação da dieta e/ou a redução do nível de proteína bruta da ração, como alternativa para prevenir a diarreia pós-desmama causada por *E. coli*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Foram utilizados 16 leitões da raça Landrace com idade média de 35 dias (idade da desmama), oriundos de um rebanho SPF, alojados em uma instalação composta de uma sala contendo quatro baias. Os leitões foram examinados antes da experimentação, para verificação da população de coliformes nas fezes; eles encontravam-se em bom estado de saúde.

### Tratamentos

De acordo com peso, sexo e parentesco, os leitões foram distribuídos nos seguintes tratamentos:

A – ração controle com 20% de proteína bruta (PB);

B – ração A adicionada de 2% de ácido cítrico;

C – ração com 16% de PB, adicionada de L-lisina HCL, até o nível mínimo de 0,90%;

D – ração C adicionada de 2% de ácido cítrico.

As composições das dietas testadas são apresentadas no Quadro 1. Os leitões receberam as rações experimentais à vontade a partir do dia da desmama (D<sub>0</sub>), por dez dias após (D<sub>10</sub>), quando foram sacrificados para exames complementares.

Quadro 1. Composição percentual, proximal, de lisina, cálcio e fósforo e energética das rações experimentais

Ingredientes	Tratamentos			
	A	B	C	D
Milho	60,09	60,09	70,84	70,84
Farelo de soja	34,43	34,43	23,33	23,33
Fosfato bicálcico	1,15	1,15	1,41	1,41
Calcário	1,43	1,43	1,33	1,33
Sal comum	0,40	0,40	0,40	0,40
Mistura vitamínica	0,30	0,30	0,30	0,30
Mistura mineral	0,20	0,20	0,20	0,20
Amido	1,00	–	1,00	–
Sabugo de milho	1,00	–	1,00	–
L-lisina – HCl	–	–	0,19	0,19
Ácido cítrico	–	2,00	–	2,00
Total	100,00	100,00	100,00	100,00
<b>Composição</b>				
Proteína bruta (%)	20,07	20,07	16,01	16,01
Lisina (%)	1,09	1,09	0,96	0,96
Cálcio (%)	0,80	0,80	0,80	0,80
Fósforo (%)	0,60	0,60	0,60	0,60
Energia digestível (kcal/kg)	3.303	3.265	3.293	3.255

### Inoculação

Foi usada, como inóculo, uma amostra de *Escherichia coli* 0141 K85, isolada de casos clínicos de diarreia pós-desmama, hemolítica em agár-sangue de carneiro e resistente à tetraciclina. Esta amostra foi cultivada em Tryptic Soy Broth (TSB) por 18 horas a 37°C e o cultivo padronizado em espectrofotômetro para conter aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC/ml. Os leitões foram inoculados no 3º e 4º dias pós-desmame, por via oral, com 20ml do cultivo.

### Parâmetros analisados

a) pH das rações da seguinte maneira: 20 g da dieta foram suspensas em 30 ml de água, formando-se uma massa homogênea. Os sólidos insolúveis foram agitados, por barra magnética e agitador elétrico, no momento em que procedeu-se a leitura do pH em um potenciômetro. Para cada dieta fez-se três repetições tomando-se a média como pH final.

b) Capacidade de ligação ácida das rações: suspenderam-se 5 g da dieta em 50 ml de HCl 0,1N. A suspensão foi incubada a 37°C por 1 hora sob freqüente agitação. Após, 10 ml desta suspensão (contendo 1 g de alimento) foi titulada com NaOH, 0,1N até pH 3,0. A subtração da quantidade de ml de NaOH 0,1N usada para titulação dos 10 ml, correspondeu ao volume em mililitros de HCl requerido para ótima digestão gástrica (pH 3,0) de 1 g de alimento. A capacidade de ligação ácida das dietas foi taxada pela quantidade de HCl 1,0N ligada por quilograma de alimento, expressa em meq/kg.

c) Avaliação clínica diária dos leitões, quanto a consistência das fezes, seguindo-se à seguinte classificação: firmes, pastosas e líquidas.

d) pH do conteúdo do estômago, jejuno médio, fêo e ceco, verificado através de potenciômetro.

e) Colonização intestinal da amostra de *E. coli* inoculada. "Swabs" retais foram tomados dos animais no 5º, 7º e 9º dias pós-desmama, e dos conteúdos de duodeno, jejuno e fêo, por ocasião da necrópsia. Todos os "swabs" foram semeados diretamente em ágar sangue e ágar MacKonkey, contendo tetraciclina. As colônias hemolíticas foram submetidas a sorologia em lâmina com o antisoro da amostra inoculada 0141 K85.

f) Contagem do número aproximado de *E. coli* do conteúdo do fêo, considerando-se apenas a amostra 0141 K85. Do conteúdo fez-se diluições seriadas até 10<sup>-7</sup> e de cada diluição, 0,1ml foi semeado em ágar sangue com tetraciclina. A contagem das colônias foi feita após 24 horas de incubação a 37°C. As colônias hemolíticas foram submetidas a sorologia em lâmina com o antisoro da amostra inoculada 0141 K85.

g) Avaliação histológica de fragmentos do duodeno, jejuno e fêo conforme procedimento de rotina, mas usando-se o líquido de Bouin como fixador.

## RESULTADOS

A adição de 2% de ácido cítrico na dieta (TB) ou a redução do nível de PB de 20% para 16% (TC) provocaram uma redução do pH e da quantidade de HCl requerido para digestão "in vitro". Este efeito foi mais acentuado na dieta do TD com a redução da PB e da adição do ácido (Quadro 2).

Quadro 2. pH e capacidade de ligação ácida das dietas<sup>a</sup>

Tratamentos	pH das dietas	HCl requerido para digestão "in vitro" (Meq/kg de dieta)
A	5,94	644
B	4,41	550
C	5,73	575
D	3,99	464

<sup>a</sup> Resultados médios de três análises.

Quanto a ocorrência de diarreia nos leitões verificou-se que todos aqueles do tratamento A desenvolveram diarreia, com duração média de 2,5 dias. Destes, dois ti-

Quadro 3. Exames bacteriológicos<sup>a</sup> e clínicos dos leitões

Identificação dos animais - Tratamentos	"Swabs" retais				Necropsia				Nº de dias com diarreia
	Antes da inoculação	2 dias pi	4 dias pi	6 dias pi	Duodeno	Jejuno	Íleo	<i>E. coli</i> no conteúdo do fêo log <sub>10</sub> /ml	
1165-A	-	+	+	+	-	-	+	6,14	2
1186-A	-	+	+	+	-	-	+	6,07	1
1212-A	-	-	+	+	+	+	+	8,44	2
1182-A	-	-	-	+	+	+	-	8,34	3
1175-B	-	+	+	+	-	+	+	9,46	0
1193-B	-	+	-	+	-	-	+	6,86	0
1197-B	-	+	+	+	-	-	-	<3,00	1
1215-B	-	-	+	+	-	-	-	<3,00	0
1169-C	-	+	+	-	-	-	-	<3,00	0
1188-C	-	+	+	+	+	+	+	7,07	1
1195-C	-	+	+	-	+	-	+	7,83	0
1213-C	-	-	+	+	+	+	+	5,95	0
1167-D	-	+	+	+	-	-	+	<3,00	0
1194-D	-	+	+	+	-	-	-	4,47	0
1200-D	-	+	+	-	-	-	-	<3,00	0
1179-D	-	-	-	-	-	-	-	5,81	0

<sup>a</sup> Considerou-se apenas a amostra inoculada 0141 K85.

veram severa diarreia com desidratação, sendo que um morreu no 9º dia pós-inoculado (pi) e o outro encontrava-se em estado agônico, no dia do sacrifício. Nos outros tratamentos, apenas um leitão do grupo B e um do grupo C tiveram diarreia em apenas um dia, recuperando-se espontaneamente. Nenhum leitão do tratamento D desenvolveu diarreia.

No Quadro 3 são sumarizados os resultados obtidos com os exames bacteriológicos e clínicos. Todos os leitões, exceto um do tratamento D, eliminaram *Escherichia coli* 0141 K85 nas fezes, entre 2 a 6 dias pi. Após a necropsia, esta bactéria foi reisolada dos leitões dos tratamentos A e C, exceto em um, principalmente a nível de fêo. Porém, nos leitões dos tratamentos B e D houve pouca colonização intestinal, uma vez que apenas dois animais do TB e um do TD foram positivos no fêo, ou jejuno e nenhum no duodeno. Esta mesma tendência se repetiu na população de *E. coli* 0141 K85 no conteúdo do fêo, de maneira que os leitões do tratamento A tiveram uma quantidade maior de *E. coli*, seguidos dos leitões dos tratamentos C, B e D.

Com relação ao pH do conteúdo intestinal verificou-se uma acidez estomacal média maior nos leitões dos tratamentos C e D em relação aos dos tratamentos A e B, embora não tenha ocorrido diferença estatística entre eles a um nível de 5% de probabilidade.

O pH do conteúdo do jejuno foi significativamente ( $P < 0,05$ ) menor nos leitões dos TC e TD em relação aos controles (TA). O pH do fêo não mostrou diferenças significativas entre os tratamentos, embora tenha sido levemente mais ácido para os tratamentos T<sub>B</sub>, T<sub>C</sub> e T<sub>D</sub> em relação ao controle (TA). O pH do ceco comportou-se de maneira inversa, sendo mais baixo no tratamento A e mais elevado no tratamento D, entretanto sem mostrar diferenças estatísticas entre eles (Quadro 4). Estes resultados podem ser melhor visualizados na Fig. 1.

No exame histológico do intestino delgado, alterações

## VALORES DE pH

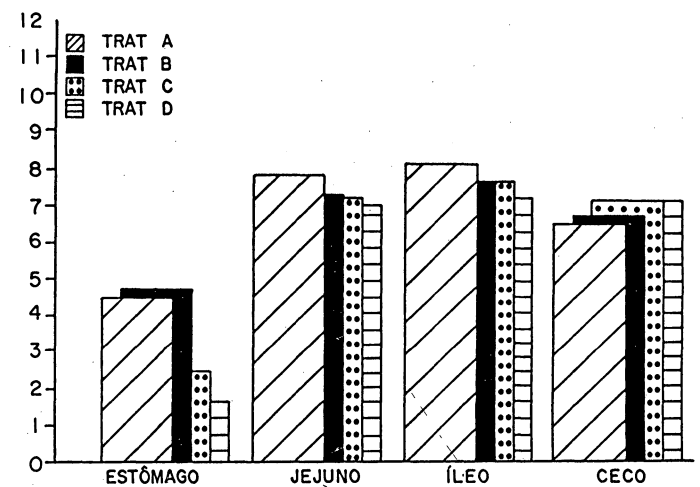


Fig. 1. Variação do pH do conteúdo gástrico-intestinal nos vários tratamentos.

Quadro 4. pH do conteúdo gastrointestinal

Tratamento	pH			
	Estômago	Jejuno	Íleo	Ceco
A	4,500 <sup>a</sup>	7,875 <sup>a</sup>	8,125 <sup>a</sup>	6,500 <sup>a</sup>
B	4,750 <sup>a</sup>	7,375 <sup>ab</sup>	7,625 <sup>a</sup>	6,750 <sup>a</sup>
C	2,500 <sup>a</sup>	7,250 <sup>b</sup>	7,625 <sup>a</sup>	7,125 <sup>a</sup>
D	1,625 <sup>a</sup>	7,000 <sup>b</sup>	7,250 <sup>a</sup>	7,125 <sup>a</sup>
C.V. (%)	52,46	4,15	7,36	6,12

<sup>ab</sup> Médias com mesma letra não são significativamente diferentes a um nível de probabilidade de 5%.

importantes foram observadas apenas nos leitões do tratamento A em nível de jejuno e fêo. Estas alterações foram de enterite catarral com hiperplasia das criptas e presença de bastonetes gram negativos aderidos às células epiteliais. Nos leitões dos tratamentos B, C e D não foram encontradas alterações histológicas intestinais.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A dieta fornecida aos leitões, no período logo após a desmama, influenciou a ocorrência e severidade da diarreia por *Escherichia coli*, fato também verificado em outros trabalhos (Tzipori et al. 1980, Bertschinger et al. 1983). Leitões desmamados com menos de 6 semanas de idade, possuem o sistema digestivo ainda imaturo para digerir rações sólidas com altos níveis de proteína de origem vegetal, como os do farelo de soja. Rações formuladas a base de milho e farelo de soja predispõem os leitões, nesta idade, a desenvolverem diarreia por *E. coli* (Armstrong & Cline 1977). Lindemann et al. (1986) e Omsley et al. (1986), observaram um aumento significativo de proteases gástricas e enzimas pancreáticas, como a tripsina e quimotripsina, no período de 5 a 6 semanas de idade. Além disso, Lindemann et al. (1986) relatam a existência de uma insuficiente capacidade enzimática para digestão de proteína, relacionada como a própria desmama dos leitões. Neste experimento foram utilizados leitões desmamados com 35 dias de idade, teoricamente com capacidade reduzida para digerir alimentos altamente protéicos. A ração controle com 20% de PB e sem ácido cítrico demonstrou ter uma alta capacidade de ligação ácida, em relação às outras dietas experimentais acidificadas ou com menor nível de PB (16%). Isto talvez possa explicar a elevação do pH do estômago e jejuno nos leitões controles do TA. Prohászka & Baron (1980) afirmaram que um excesso de proteína no estômago, associado à imaturidade do sistema digestivo do leitão jovem, induz uma elevação prolongada do pH gástrico acima de 3,0, o que, conseqüentemente, facilita a proliferação exagerada de *E. coli*. Isto parece ter ocorrido também neste experimento, pois há evidência de que o pH gástrico foi influenciado mais pelo teor de PB, do que pelo pH da dieta, uma vez que os leitões dos tratamentos A e B apresentam pH gástrico médio acima de 3,0, enquanto que os dos TC e TD tiveram o pH inferior a 3,0 acompanhado de uma quantidade menor de *E. coli* patogênica no conteúdo do íleo.

A ocorrência de diarreia foi influenciada, tanto pelo nível de PB, como pela adição do ácido cítrico na dieta, uma vez que tanto os leitões do TB, como os do TC e TD, foram menos afetados que aqueles testemunhas do TA. Outros autores têm demonstrado que dietas com baixos teores em nutrientes previnem a diarreia e a proliferação exagerada de *E. coli* enteropatogênica no intestino, mas também afetam significativamente o desenvolvimento dos leitões (Prohászka & Baron 1980, Bertschinger et al. 1980). Em testes à campo (Mores, dados não publicados) verificou-se que uma ração com 16% de PB, suplementada com lisina e fornecida aos leitões por um período de 14 dias após a desmama, realizada aos 35 dias de idade, não reduz o ganho de peso em comparação com dietas contendo 20% de PB.

Os melhores resultados, neste experimento, foram obtidos com a adição do ácido cítrico na dieta com 16% de

PB (TB). Esta dieta reduziu o pH do conteúdo do estômago e jejuno e evitou a proliferação exagerada de *E. coli* no intestino delgado, o que pode explicar a não ocorrência de diarreia nos leitões. Isto também foi observado por outros autores usando a acidificação da ração (Scipioni et al. 1978) ou da água de beber (Thomlinson & Lawrence 1981). Segundo eles, este efeito inibitório sobre a *E. coli* está relacionado com a redução do pH gástrico, fato também observado neste experimento. Além disso, o ácido cítrico pode melhorar a palatabilidade da dieta, aumentando o consumo de ração e o ganho de peso de leitões desmamados (Scipioni et al. 1978, Giesting & Easter 1985).

Conclui-se neste trabalho, que a dieta com 16% de PB, suplementada com lisina até um nível mínimo de 0,90% e adicionada com 2% de ácido cítrico, previniu a ocorrência da diarreia pós-desmama por *E. coli*, com desmama realizada aos 35 dias de idade. Porém, vale ressaltar que no campo a diarreia pós-desmame pode ser causada por outros agentes infecciosos, como o rotavírus (Lecce 1983), e pode ser influenciada por fatores ambientais e de manejo (Madec & Josse 1983).

## REFERÊNCIAS

- Armstrong W.D. & Cline T.R. 1977. Effects of various nutrient levels and environmental temperatures on the incidence of colibacillary diarrhea in pigs: intestinal fistulation and titration studies. *J. Anim. Sci.* 45(5): 1042-1050.
- Bertschinger H.V., Jucker H., Pflirter H.P., & Pohlenz J. 1983. Role of nutrition in the pathogenesis of porcine *Escherichia coli* enterotoxemia. *Ann. Rech. Vét.* 14(4): 469-472.
- Byerne T.F. & Hall G.A. 1984. The effect of age and diet on the histological structure of the small intestine in post-weaned germ-free piglets. *Proc. 8th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Bélgica*, p.238.
- Giesting D.W. & Easter R.A. 1985. Response of starter pigs to supplementation of corn-soybean meal diets with organic acids. *J. Anim. Sci.* 60(5): 1288-1294.
- Lecce J.G. 1983. Dietary regimen, rotavirus, and hemolytic enteropathogenic *Escherichia coli* in weaning diarrhea of pigs. *Ann. Rech. Vét.* 14(4): 463-468.
- Lindemann M.D., Cornelius S.G., El Kandelgy S.M., Moser R.L. & Pettigrew J.E. 1986. Effect of age, weaning and diet on digestive enzyme levels in the piglet. *J. Anim. Sci.* 62: 1298-1307.
- Madec F. & Josse J. 1983. Influence of environmental factors on the onset of digestive disorders of the weaned piglets. *Ann. Rech. Vét.* 14(4): 456-462.
- Miller B.M., Newby T.J., Stokes C.R., Hompson D. & Bourne F.J. 1983. The role of dietary antigen in the aetiology of post weaning diarrhea. *Ann. Rech. Vét.* 14(4): 487-492.
- Owsley W.F., Orr D.D. & Tribble L.F. 1986. Effect of age and diet on the development of the pancreas and the synthesis and secretion of pancreatic enzymes in the young pig. *J. Anim. Sci.* 63: 497-504.
- Prohászka L. & Baron F. 1980. The predisposing role of high dietary protein supplies in enteropathogenic *E. coli* infections of weaned pigs. *Zentralbl. Veterinaermed.* 27(3): 222-232.
- Scipioni R., Zaghini G. & Biavati B. 1978. Ricerce sull'impiego di-deite acidificate nello svezzamento precoce dei suinetti. *Zootec. Nut. Anim.* (4): 201-218.
- Thomlinson J.R. & Lawrence T.L.L. 1981. Dietary manipulation of gastric pH in the prophylaxis of enteric disease in weaned pigs: Some field observations. *Vet. Rec.* 109: 120-122.
- Tzipori S., Chandler D., Smith M., Making T. & Hensseser D. 1980. Factors contributing to post-weaning diarrhea in a large intensive pigery. *Aust. Vet. J.* 56(6):274-278.