

**UNA MISCELA MICROINCAPSULATA DI SOSTANZE  
AROMATIZZANTI IN SUINETTI INFETTATI ARTIFICIALMENTE  
CON *ESCHERICHIA COLI* F4 ALLO SVEZZAMENTO**

***A MICROENCAPSULATED MIXTURE OF BOTANICALS IN  
PIGLETS ARTIFICIALLY INFECTED WITH *ESCHERICHIA COLI*  
F4 AT WEANING***

TUGNOLI B.<sup>1</sup>, BONETTI A.<sup>2</sup>, PIVA A.<sup>1,2</sup>, GRILLI E.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> *Vetagro S.p.A., via Porro 2, 42124, Reggio Emilia, Italia;*

<sup>2</sup> *DIMEVET, Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Via Tolara di  
Sopra, 50, 40064, Ozzano dell'Emilia (BO), Italia;*

<sup>3</sup> *Vetagro Inc., 17 E. Monroe St., Suite #179, 60603, Chicago, IL, USA*

**Parole chiave:** *Escherichia coli* K88, sostanze aromatizzanti, microincapsulazione

**Keywords:** *Escherichia coli* K88, botanicals, microencapsulation

**RIASSUNTO**

Lo studio ha valutato l'effetto di una miscela microincapsulata di sostanze aromatizzanti in suinetti infettati artificialmente con *Escherichia coli* F4, principale agente responsabile della diarrea post-svezzamento. Un totale di 32 suinetti svezzati a 28 giorni sono stati divisi in 4 gruppi: controllo negativo, dieta standard, non infettato; controllo infettato (INF), dieta standard, infettato; gruppo ZnO (ZnO), dieta standard + ZnO a 2500 ppm, infettato; gruppo trattato (TRT), dieta standard + miscela microincapsulata di sostanze aromatizzanti a 2 kg/ton, infettato. Dopo 18 giorni, è stato eseguito il challenge orale con *E. coli* F4 (ceppo di campo, resistente a colistina e rifampicina) e lo studio è proseguito per altri 14 giorni. Tutti gli animali infettati hanno mostrato segni clinici indotti dal challenge. Al giorno 3 post-challenge, il gruppo INF ha perso peso corporeo in modo significativo rispetto al controllo, mentre sia il gruppo ZnO che il gruppo TRT hanno mostrato valori intermedi di accrescimento ponderale ( $P < 0.01$ ). Il gruppo TRT ha ridotto parzialmente la conta dei batteri *E. coli* totali dopo il challenge (giorno 2 e 3) rispetto al controllo INF e ha ridotto la percentuale di positività ad *E. coli* F4 (inoculato) nei campioni fecali all'83.3% rispetto al 90.2% del gruppo INF e all'86% del gruppo ZnO. In conclusione, la miscela microincapsulata di sostanze aromatizzanti usata in questo studio può parzialmente aiutare i suinetti durante un challenge con *E. coli* F4.

**ABSTRACT**

The study evaluated the effect of a microencapsulated blend of botanicals, fed to weaning piglets artificially challenged with *Escherichia coli* F4, the main determining agent of post-weaning diarrhea. A total of 32 piglets weaned at 28 days of age were divided into 4 groups: negative control, basal diet, not challenged; infected control (INF), basal diet, challenged; ZnO group (ZnO), basal + 2500 ppm of ZnO, challenged; treated (TRT) group, basal diet + microencapsulated blend of botanicals at 2 kg/ton, challenged. After 18 days of study, the challenge consisted of an oral inoculation with *E. coli* F4 (field strain, colistin and rifampicin-resistant) and the study lasted 14 additional days. All the infected animals showed clinical signs induced by the challenge. At day 3 post-challenge, the INF group did lose weight significantly compared to control group, while both ZnO group and TRT group showed intermediate values of weight gain ( $P < 0.01$ ). The TRT group partially reduced the counts of total *E. coli* after the challenge (day 2 and 3) compared to INF group and reduced the percentage of positive fecal samples for *E. coli* F4 (inoculated) to 83.3% compared to 90.2% for INF group and 86% for ZnO group. In conclusion, the microencapsulated blend of botanicals used in this study can partially help piglets during a challenge with *E. coli* F4.

## INTRODUZIONE

La diarrea post-svezzamento è una delle problematiche più critiche dell'industria suina mondiale, a causa del suo ingente impatto sui suinetti (Luppi, 2017). I principali agenti eziologici della diarrea post-svezzamento sono batteri *E. coli* enterotossigenici, in particolare *E. coli* F4/K88. Il batterio colonizza l'intestino tenue dove produce tossine che minano l'integrità della mucosa intestinale, causano infiammazione e stimolano l'insorgenza della diarrea (Dubreuil et al., 2016).

Storicamente i sintomi della diarrea post-svezzamento sono controllati con dosi farmacologiche (2000-3000 ppm) di ossido di zinco (ZnO), che riducono l'incidenza della diarrea e migliorano le performance di crescita dei suinetti allo svezzamento. L'utilizzo di queste dosi medicinali di ZnO da giugno dell'anno corrente non sarà più consentito all'interno dell'Unione Europea, in virtù di problematiche di inquinamento ambientale e rischio di selezione di batteri antibiotico-resistenti (Bonetti et al., 2021). Le piante e i loro derivati fitogenici, quali oli essenziali e sostanze aromatizzanti, possono rappresentare un'alternativa promettente allo ZnO, grazie alle loro molteplici proprietà biologiche di tipo antimicrobico, anti-infiammatorio ed anti-ossidante (Rossi et al., 2020), azioni che, a livello intestinale, posso essere utili per il controllo di *E. coli* F4. I fitogenici introdotti oralmente con la dieta sono però soggetti ad un rapido assorbimento a livello gastrico che ne limita la disponibilità nell'intestino (Michiels et al., 2008). A questo proposito, la tecnologia della microincapsulazione è stata dimostrata essere uno strumento valido ed efficace per prevenire l'assorbimento e la degradazione gastrica di molecole bioattive, permettendone il rilascio lungo il tratto intestinale (Piva et al., 2007).

Scopo di questo studio è stato quello di valutare l'effetto di una miscela microincapsulata di sostanze aromatizzanti a confronto con ZnO farmacologico in suinetti infettati artificialmente con *E. coli* F4 allo svezzamento.

## MATERIALI E METODI

*Disegno sperimentale.* In questo studio sono stati utilizzati 32 suinetti Large White ottenuti da scrofe SPF (specific-pathogen-free) e verificati essere suscettibili geneticamente ad *E. coli* F4 mediante verifica dei geni MUC4 e MUC13 in PCR (Rasschaert et al., 2007, Ren et al., 2012). I suinetti sono stati svezzati a 28 giorni (peso medio  $6.75 \pm 1.25$  kg), sono stati allocati in box (4 animali/box) e assegnati a 4 gruppi sperimentali (8 animali/gruppo):

- 1) Gruppo controllo negativo (CTR), alimentato con una dieta standard, non sottoposto a challenge con *E. coli* F4;
- 2) Gruppo controllo infettato (INF), alimentato con una dieta standard, sottoposto a challenge con *E. coli* F4;
- 3) Gruppo ossido di zinco (ZnO), alimentato con una dieta standard addizionata con 2500 ppm di ZnO, sottoposto a challenge con *E. coli* F4;
- 4) Gruppo trattato (TRT) alimentato con una dieta standard supplementata con una miscela microincapsulata di sostanze aromatizzanti a 2 kg/ton, sottoposto a challenge con *E. coli* F4.

Le diete consistevano in mangimi commerciali, non medicati, formulati sulla base delle indicazioni NRC (2012) e sono state fornite *ad libitum*, come farina, per tutta la prova.

Dopo 18 giorni di studio, il challenge è consistito nella somministrazione orale di un inoculo di *E. coli* F4 (ceppo di campo, resistente a colistina e rifampicina), con una dose di  $10.3 \text{ Log}_{10}$  CFU per suinetto. Lo studio è proseguito per altri 14 giorni dopo l'infezione, durante i quali è stato monitorato lo stato di salute degli animali (segni clinici, temperatura rettale, mortalità). Le performance di crescita individuali sono state misurate settimanalmente e i campioni fecali raccolti con frequenza definita (giorno -3, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 14 post-challenge) per la conta batterica di *E. coli* totali e dell'inoculo *E. coli* F4. I campioni sono stati diluiti serialmente in soluzione fisiologica sterile e seminati su piastre MacConkey agar per la conta dei batteri *E. coli* totali o su piastre MacConkey

agar + rifampicina (250 mg/L) per la determinazione dei livelli di *E. coli* F4 inoculato. Le piastre sono state incubate a 37°C per 24 ore.

*Analisi statistica.* I dati sono stati analizzati utilizzando GraphPad Prism® con analisi ANOVA e le differenze considerate significative con  $P < 0.05$ .

## RISULTATI

*Segni clinici e mortalità.* A seguito del challenge, tutti gli animali infettati hanno mostrato segni clinici quali malessere, dispnea, diarrea e alterazioni della temperatura. In particolare, dal giorno del challenge molti degli animali infettati hanno mostrato ipotermia o ipertermia, mentre le temperature del gruppo di controllo sono rimaste normali. Considerando anormali temperature  $< 38.7^{\circ}\text{C}$  o  $> 40.2^{\circ}\text{C}$ , la frequenza di temperature anormali è stata di 0/96 per il gruppo CTR, 8/90 per il gruppo INF, 10/96 per il gruppo ZnO e 8/84 per il gruppo TRT cioè tutti i gruppi infettati sono risultati diversi dal controllo non infettato, ma non si sono osservate differenze tra i gruppi infettati. La mortalità è stata di 2 soggetti nel gruppo TRT (giorno 2 post-challenge) e di 2 soggetti nel gruppo INF (animali soppressi a causa di segni clinici molto severi al giorno 5 post-challenge).

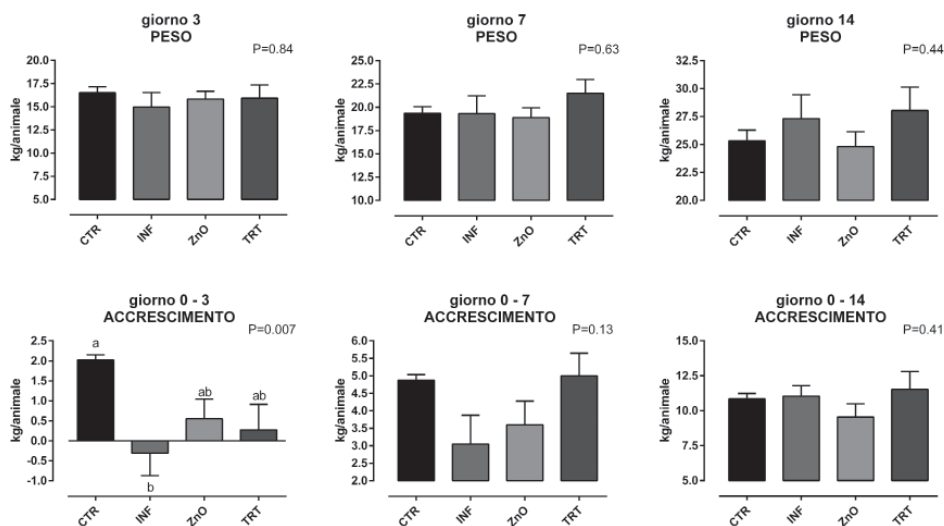
*Performance di crescita.* Nella Tabella 1 sono mostrate le performance di crescita nel periodo precedente al challenge con *E. coli* F4: nessuna differenza significativa tra i gruppi è stata osservata nei pesi individuali né nell'accrescimento ponderale prima del challenge. Come mostrato in Figura 1, il challenge ha avuto un rapido effetto negativo sulla crescita degli animali con il gruppo INF che ha perso peso nei primi 3 giorni post-challenge ed è risultato significativamente differente rispetto al controllo, mentre sia il gruppo ZnO che il gruppo TRT hanno mostrato valori intermedi di accrescimento ponderale ( $P < 0.01$ ). Nelle due settimane successive al challenge non si sono osservate differenze significative su pesi e accrescimenti degli animali, ma il gruppo TRT ha migliorato numericamente l'accrescimento ponderale del periodo 0-7 giorni post-challenge, rispetto al gruppo INF e al gruppo ZnO ( $P = 0.13$ ). Complessivamente, per tutta la durata dello studio (dal giorno -18 al giorno 14), non ci sono state differenze significative sulle performance di crescita.

	Controllo negativo (CTR)	Controllo infettato (INF)	Gruppo ZnO (ZnO)	Gruppo trattato (TRT)	P
Peso (kg)					
Giorno -18	6.66	6.76	6.75	6.84	0.99
Giorno -14	8.33	8.66	8.25	8.49	0.94
Giorno -7	10.81	11.33	11.21	11.01	0.95
Giorno 0	14.48	15.29	15.28	15.65	0.78
Accrescimento ponderale (kg)					
Giorno -18 – 0	7.81	8.53	8.53	8.81	0.33

**Tabella 1 – PERFORMANCE DI CRESCITA DEI SUINETTI PRIMA DEL CHALLENGE CON *E. COLI* F4.**

I dati sono presentati come medie ( $n = 8$ ). CTR = gruppo controllo non infettato; INF = gruppo controllo infettato; ZnO = gruppo ZnO a 2500 ppm, infettato; TRT = gruppo trattato con miscela microincapsulata di sostanze aromatizzanti a 2 kg/ton, infettato.

**Table 1 – GROWTH PERFORMANCE OF PIGLETS BEFORE *E. COLI* F4 CHALLENGE.** Data are presented as means ( $n = 8$ ). CTR = control group not infected; INF = control group infected; ZnO = group with ZnO at 2500 ppm, infected; TRT = group treated with a microencapsulated blend of botanicals at 2 kg/ton, infected.



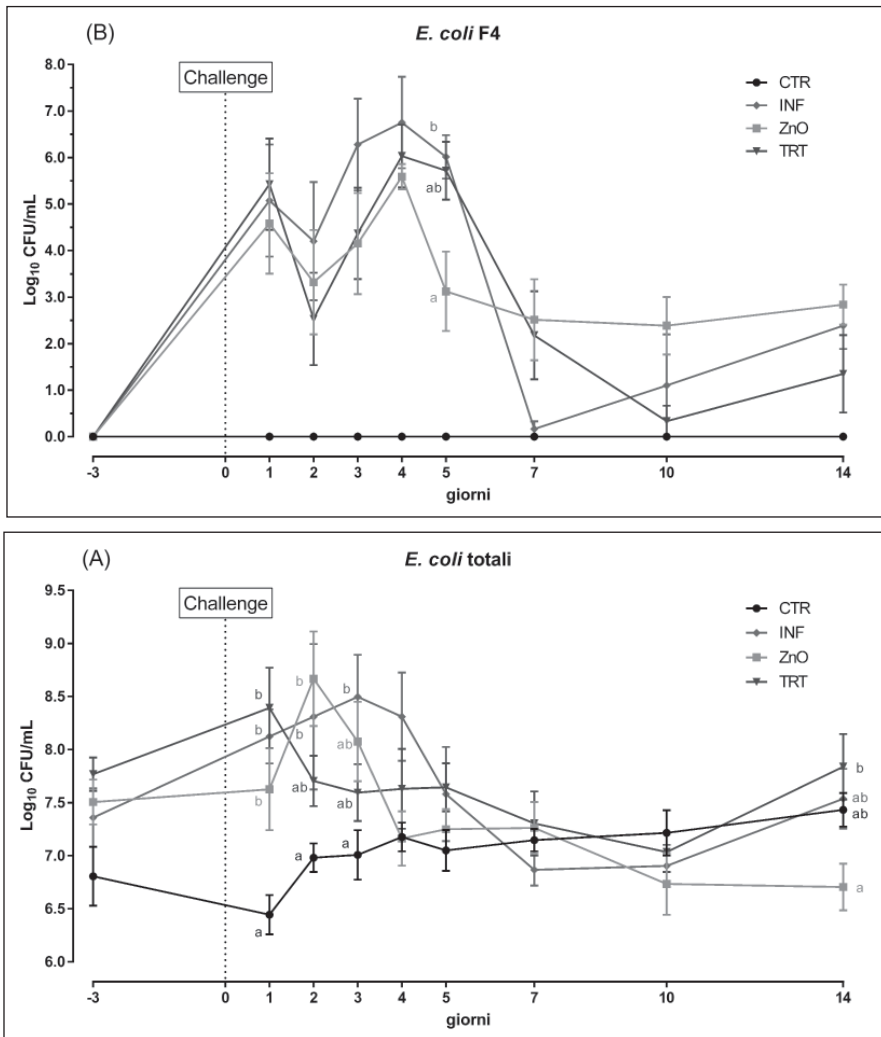
**Figura 1 – PERFORMANCE DI CRESCITA DEI SUINETTI DOPO IL CHALLENGE CON *E. COLI* F4.**

I dati sono presentati come medie (n = 8) e SEM rappresentate dalle barre verticali. <sup>ab</sup> Lettere differenti indicano differenze significative (P<0.05). CTR = gruppo controllo non infettato; INF = gruppo controllo infettato; ZnO = gruppo ZnO a 2500 ppm, infettato; TRT = gruppo trattato con miscela microincapsulata di sostanze aromatizzanti a 2 kg/ton, infettato.

**Figure 1 – GROWTH PERFORMANCE OF PIGLETS AFTER *E. COLI* F4 CHALLENGE.**

Data are presented as means (n = 8) and SEM represented by vertical bars. <sup>ab</sup> Unlike letters indicate significant differences (P<0.05). CTR = control group not infected; INF = control group infected; ZnO = group with ZnO at 2500 ppm, infected; TRT = group treated with a microencapsulated blend of botanicals at 2 kg/ton, infected.

*Conte di E. coli.* In Figura 2 sono presentati i risultati delle conte fecali dei batteri *E. coli* totali e del ceppo *E. coli* F4 inoculato durante il challenge. Subito dopo il challenge, i livelli di *E. coli* totali sono aumentati significativamente in tutti i gruppi infettati rispetto al gruppo CTR (giorno 1). Nei giorni successivi (giorno 2 e 3) il gruppo TRT ha parzialmente ridotto i titoli di *E. coli* totali mostrando valori intermedi tra il controllo non infettato ed il controllo infettato INF. A fine prova (giorno 14) il gruppo ZnO ha mostrato conte di *E. coli* totali più bassi rispetto al gruppo TRT. Le conte del ceppo *E. coli* F4 inoculato sono risultate sempre simili tra i gruppi infettati ad eccezione del giorno 5 post-challenge in cui il gruppo ZnO ha ridotto significativamente i titoli di *E. coli* F4 rispetto al gruppo INF, mentre il gruppo TRT ha mostrato livelli intermedi (P<0.05). In Tabella 2 è presentata la prevalenza di *E. coli* F4 nei campioni fecali: tutti i campioni raccolti prima dell'inoculo o da soggetti non inoculati sono risultati negativi. Complessivamente dopo il challenge, la percentuale di positività a *E. coli* F4 nei campioni fecali è risultata del 90.2% per il gruppo INF ed è stata ridotta a 86% nel gruppo ZnO e a 83.3% nel gruppo TRT.



**Figura 2 – CONTE DI *E. COLI* TOTALI (A) E DI *E. COLI* F4 (B) IN CAMPIONI FECALI ( $\text{Log}_{10}$  CFU/mL).**

I dati sono presentati come medie (n = 8) e SEM rappresentate dalle barre verticali. <sup>ab</sup> Lettere differenti indicano differenze significative (P < 0.05). Per *E. coli* F4 il gruppo CTR, non infettato, è stato escluso dall'analisi statistica. CTR = gruppo controllo non infettato; INF = gruppo controllo infettato; ZnO = gruppo ZnO a 2500 ppm, infettato; TRT = gruppo trattato con miscela microincapsulata di sostanze aromatizzanti a 2 kg/ton, infettato.

**Figure 2 – COUNTS OF TOTAL *E. COLI* (A) AND *E. COLI* F4 (B) IN FECAL SAMPLES ( $\text{Log}_{10}$  CFU/mL).**

Data are presented as means (n = 8) and SEM represented by vertical bars. <sup>ab</sup> Unlike letters indicate significant differences (P < 0.05). For *E. coli* F4 control group CTR, not infected, was excluded from the statistical analysis. CTR = control group not infected; INF = control group infected; ZnO = group with ZnO at 2500 ppm, infected; TRT = group treated with a microencapsulated blend of botanicals at 2 kg/ton, infected.

	giorno -3	giorno 1	giorno 2	giorno 3	giorno 4	giorno 5	giorno 7	giorno 10	giorno 14	Totale post- challenge
CTR	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/7	0/8	0/8	0/8	0/63 (0%)
INF	0/8	8/8	7/7	7/8	8/8	8/8	5/8	5/6	7/8	55/61 (90.2%)
ZnO	0/8	8/8	7/7	6/6	5/7	5/6	4/6	4/5	4/5	43/50 (86%)
TRT	0/7	8/8	8/8	8/8	8/8	6/6	1/6	1/4	5/6	45/54 (83.3%)

**Tabella 2 – PREVALENZA DI *E. COLI* F4 IN CAMPIONI FECALI (NUMERO DI CAMPIONI POSITIVI / NUMERO DI CAMPIONI TOTALI).**

CTR = gruppo controllo non infettato; INF = gruppo controllo infettato; ZnO = gruppo ZnO a 2500 ppm, infettato; TRT = gruppo trattato con miscela microincapsulata di sostanze aromatizzanti a 2 kg/ton, infettato.

**Table 2 – PREVALENCE OF *E. COLI* F4 IN FECAL SAMPLES (NUMBER OF POSITIVE SAMPLES / NUMBER OF TOTAL SAMPLES).**

CTR = control group not infected; INF = control group infected; ZnO = group with ZnO at 2500 ppm, infected; TRT = group treated with a microencapsulated blend of botanicals at 2 kg/ton, infected.

## DISCUSSIONE

In questo studio è stato utilizzato un modello di challenge con infezione da *E. coli* F4 in suinetti neo-svezzati, per valutare l'effetto di una miscela microincapsulata di sostanze aromatizzanti a confronto con ZnO farmacologico. Sono stati utilizzati suinetti, specific-pathogen free per *E. coli* F4, cioè privi di *E. coli* F4 dalla nascita, ma dotati nel genoma delle varianti dei geni delle mucine MUC4 e MUC13, considerati in letteratura i principali marker di suscettibilità genetica all'infezione da *E. coli* F4 (Rasschaert et al., 2007, Ren et al., 2012). L'infezione è stata indotta con un inoculo orale di *E. coli* F4 dopo 18 giorni di pre-trattamento alimentare con ZnO o con il prodotto incapsulato a base di sostanze aromatizzanti e gli animali sono stati monitorati per altri 14 giorni, in modo da considerare 4-5 settimane post-svezzamento, ossia il periodo più critico per il suinetto.

Il challenge ha causato in tutti gli animali infettati alterazioni cliniche quali malessere, diarrea, dispnea ed aumento della temperatura rettale, ossia segni clinici caratteristici dell'infezione da *E. coli* F4 (Luppi, 2017). Nessun particolare effetto protettivo sui segni clinici è stato osservato con i trattamenti alimentari di ZnO e del prodotto a base di sostanze aromatizzanti se non che lo ZnO ha evitato completamente la mortalità mentre 2 soggetti sono morti sia nel gruppo trattato sia nel gruppo controllo infettato.

Dal punto di vista delle performance di crescita, il challenge ha avuto un rapido impatto negativo andando, al giorno 3 post-infezione, a deprimere il peso degli animali infettati rispetto ai controlli non infettati, mentre sia lo ZnO farmacologico sia il prodotto incapsulato di sostanze aromatizzanti hanno migliorato l'accrescimento ponderale a parità di challenge. Un aumento numerico dell'accrescimento è stato osservato anche al giorno 7 nel gruppo trattato con il prodotto, ma non nel gruppo ZnO. Questo scarso effetto migliorativo sulle performance osservato con lo ZnO si discosta dalla nota e consolidata capacità dello ZnO farmacologico di supportare la crescita dei suinetti allo svezzamento, ma è probabilmente da ricondursi alla scarsa numerosità dei soggetti in prova e alla notevole variabilità tra gli animali.

Anche per quanto riguarda i rilievi microbiologici, l'infezione con *E. coli* F4 ha influito soprattutto durante i primi giorni post-challenge causando un aumento dei livelli sia dei batteri *E. coli* totali sia del ceppo *E. coli* F4 inoculato, con picco di eliminazione fecale al

giorno 3-4, in accordo con quanto riportato in letteratura (Luise et al., 2019). I trattamenti alimentari non hanno mostrato particolari effetti sulle conte batteriche, ad eccezione di una parziale riduzione dei titoli di *E. coli* totali nel gruppo con il prodotto incapsulato di sostanze aromatizzanti. Anche in questo caso la ragione è presumibilmente da attribuire alla variabilità e al numero scarso di campioni fecali raccolti durante la prova. La prevalenza di *E. coli* F4 nelle feci, cioè la percentuale di campioni positivi sul totale dei campioni fecali, ha però evidenziato - dal punto di vista numerico - una riduzione della positività di *E. coli* F4 sia con lo ZnO sia con il prodotto incapsulato, suggerendo comunque un parziale effetto positivo per entrambi i trattamenti nel controllo del ceppo *E. coli* F4 inoculato.

## CONCLUSIONI

Pur con alcune limitazioni legate alla numerosità dei campioni e alla variabilità dei parametri analizzati, questo studio preliminare ha mostrato che questa miscela microincapsulata di sostanze aromatizzanti può avere un effetto parzialmente positivo in suinetti sottoposti a challenge con *E. coli* F4. Prove future sono necessarie per un'ulteriore validazione più approfondita.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bonetti A., Tugnoli B., Piva A., Grilli E. (2021) "Towards zero zinc oxide: Feeding strategies to manage post-weaning diarrhea in piglets". *Animals*, 11(3), 1-24.
2. Dubreuil J.D., Isaacson R.E., Schifferli D.M. (2016) "Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*". *EcoSal Plus*, 7(1), 1-47.
3. Luise D., Lauridsen C., Bosi P., Trevisi P. (2019) "Methodology and application of *Escherichia coli* F4 and F18 encoding infection models in post-weaning pigs". *J Anim Sci Biotechnol*, 10, 53-72.
4. Luppi A. (2017) "Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance". *Porcine Health Manag.* 3(16), 1-18.
5. Michiels J., Missotten J., Dierick N., Fremaut D., Maene P., De Smet S. (2008) "In vitro degradation and in vivo passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets". *J Sci Food Agric* 88, 2371-2381.
6. National Research Council (NRC). (2012) "Nutrient requirement of pigs". 11a ed. National Research Council, Academy Press, Washington, DC, USA.
7. Piva A., Pizzamiglio V., Morlacchini M., Tedeschi M., Piva G. (2007) "Lipid microencapsulation allows slow release of organic acids and natural identical flavors along the swine intestine". *J. Anim. Sci.* 85, 486-493.
8. Rasschaert K., Verdonck F., Goddeeris B.M., Duchateau L., Cox E. (2007) "Screening of pigs resistant to F4 enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infection". *Vet Microbiol* 123, 249-253.
9. Ren J., Yan X., Ai H., Zhang Z., Huang X., Ouyang J., Yang M., Yang H., Han P., Zeng W., Chen Y., Guo Y., Xiao S., Ding N., Huang L. (2012) "Susceptibility towards enterotoxigenic *Escherichia coli* F4ac diarrhea is governed by the MUC13 gene in pigs". *PLoS One* 7, e44573.
10. Rossi B., Toschi A., Piva A., Grilli E. (2020) "Single components of botanicals and nature-identical compounds as a non-antibiotic strategy to ameliorate health status and improve performance in poultry and pigs". *Nutr Res Rev.* 10, 1-17.