



Avaliação *in vitro* do papel do zinco no mecanismo de adesão de *Escherichia coli* em suínos

In vitro avaliation of zinc in the *Escherichia coli* adhesion

Álvaro Menin¹, Gisele Branco², Sandra Ferraz³ & Eliana Knackfuss Vaz⁴

RESUMO

Os distúrbios gastrintestinais e toxi-infeciosos causadas por *Escherichia coli* são uma importante causa de mortalidade, atrasos no crescimento e decréscimo na taxa de conversão alimentar em leitões no período pós-desmame, gerando perdas econômicas severas. Dentre as estratégias de combate a estas formas de apresentação estão à utilização de antimicrobianos, probióticos e aditivos na dieta, como o óxido de zinco. O zinco tem efeito promotor de crescimento, diminui a incidência de diarreia e mortalidade de leitões desmamados. O objetivo da realização desse trabalho foi verificar, *in vitro*, o papel de diferentes concentrações de zinco na adesão da *E. coli* aos enterócitos de suínos. O ensaio avaliou a eficácia de quatro suspensões: zero (controle negativo), 1200, 2400 e 3000 ppm de óxido de zinco. O teste de adesão fundamentou-se na exposição de enterócitos suínos, a uma cepa patogênica de *E. coli* e ao zinco, simulando o que ocorreria *in vivo*. Nas condições *in vitro* em que foi desenvolvido o experimento, o zinco não foi capaz de inibir a adesão de *E. coli* aos enterócitos em nenhuma das concentrações utilizadas.

Descritores: suínos, adesão, enterócitos, zinco.

ABSTRACT

The disturbances gastrointestinal caused by *Escherichia coli* are an important mortality cause, decrease the growth and the rate of alimentary conversion in pigs in the period post-weaning, causing severe economical losses. Among the strategies are antimicrobials use, probiotics and addictive in the diet, as the oxide of zinc. The zinc has effect as growth promoter, reduces the diarrhea incidence and mortality of weaned pigs. The aim of this study was to verify, *in vitro*, the role of different concentrations of zinc in the adhesion of the *E. coli* to the cells of intestinal wall of swine. This study evaluated the effectiveness of 4 suspensions: 0 (negative control), 1200, 2400 and 3000ppm of oxide of zinc. The adhesion test was based in the exhibition of the cells of intestinal wall to pathogenic strain of *E. coli* and to the zinc, simulating what happened in the intestine. In the conditions of that experiment, the zinc was not capable to inhibit the adhesion of *E. coli* to the cells of intestinal wall in none of the used concentrations.

Key words: swine, adhesion, enterocytes, zinc.

INTRODUÇÃO

Os distúrbios gastrintestinais são resultados da intensificação da produção e falhas no manejo dentro da suinocultura [3]. A fase mais crítica para os leitões é o período pós-desmame, pois uma série de eventos estressantes atinge estes animais tornando-os predispostos a problemas entéricos [2,15,19,23]. As diarreias são as mais importantes causas de mortalidade, atraso no crescimento e decréscimo na taxa de conversão alimentar em leitões no período pós-desmame, gerando perdas econômicas severas [13,18]. Cepas patogênicas de *Escherichia coli* (*E. coli*) são associadas com quadros de diarreia por volta da terceira semana de vida (Colibacilose da terceira semana) e toxi-infecção (Doença do Edema) entre 4 e 15 dias pos desmame [12,21]. Em ambos os casos, para que ocorra o estabelecimento da patogenia, a *E. coli* precisa se aderir a receptores específicos presentes nos enterócitos da mucosa do intestino delgado, através de apêndices fimbriais protéicos, possibilitando a produção das toxinas específicas [3,5-8,21,24]. As estratégias de controle e prevenção englobam uso de antimicrobianos, probióticos, restrição alimentar e utilização de aditivos na dieta, como o óxido de zinco, fonte mais comum de zinco utilizada na suinocultura [2,9,22]. O zinco reduz a incidência de diarreia e a mortalidade causada por *E. coli* em leitões no período pós-desmame [2,4,11,13,17].

O objetivo deste trabalho foi verificar, *in vitro*, o papel de diferentes níveis de zinco na adesão da *E. coli* enterócitos de leitões.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram testados, *in vitro*, diferentes níveis de zinco (a partir do Óxido de Zinco) na inibição da adesão da *E. coli* aos enterócitos. O teste de adesão foi realizado expondo os enterócitos com seus receptores às bactérias e ao óxido de zinco, simulando o que ocorreria *in vivo*. O ensaio avaliou a eficácia de quatro suspensões diferentes de óxido de zinco em uma mistura padrão, contendo enterócitos e *E. coli* em albumina sérica bovina a 1%. As suspensões utilizadas foram zero (controle negativo), 1200, 2400 e 3000ppm de óxido de zinco (puro para análise) em água destilada. Um leitão recém-nascido, antes da ingestão do colostro, para que não houvesse interferência da imunidade passiva, filhos de mãe com histórico de diarreia em leitegadas anteriores foi eutanasiado, e o intestino delgado foi coletado. Após ser congelado, uma porção de aproximadamente 20 cm, foi cortada longitudinalmente e submergido em solução hipotônica de EDTA. Uma

lâmina de vidro foi utilizada para remover as células intestinais que foram colocadas em 50 ML da solução de EDTA fria, onde foram incubados por 30 minutos a 4°C. A seguir, foi utilizado um gral para romper a estrutura do tecido e o homogeneizado foi filtrado em lâ de vidro. Esta solução foi centrifugada a 1.200 g/10 minutos/4°C. O pellet foi ressuscitado em 5 ml de PBS fria com pH igual a 7,4. Após foi feita nova centrifugação a 1.200 rpm/10 min/4°C e o pellet de enterócitos foi ressuscitado em 5 mL de PBS fria.

O teste de adesão foi realizado da seguinte maneira: 100 ml do soro teste foi misturado com 10 ml de cultura bacteriana de *E. coli* E68 (1,5 x 10⁸ CFU/ml). Após uma incubação de 45 min/37°C/50 rpm em agitado orbital, foi adicionado 20 ml da suspensão de enterócitos e novamente incubados a 15 min/37°C/140 rpm. Seguiram-se três centrifugações de 150 rpm/5 min e o pellet ressuscitado em igual volume de PBS pH 7,4. Foi feito um esfregaço e fixado pelo calor e corado com corante de Giemsa. A leitura foi feita com microscópio ótica e objetiva de imersão.

RESULTADOS

Os resultados foram obtidos pela avaliação microscópica das lâminas. Nestas, observou-se que a *E. coli* estava aderida na superfície das células intestinais, demonstrando que nenhuma das concentrações utilizadas (1200, 2400 e 3000 ppm de óxido de zinco) foi capaz de impedir esta adesão. O controle negativo, com albumina sérica bovina, mostrou o mesmo resultado, ou seja, a maioria das bactérias encontrava-se formando agregados na superfície dos enterócitos, evidenciando sua adesão.

Desta forma, fica demonstrado que, nas condições em que o teste foi realizado, o zinco nas concentrações utilizadas, não foi capaz de impedir a adesão da *E.coli* às células intestinais.

DISCUSSÃO

O fato das diferentes concentrações de zinco não impedirem a adesão da *E. coli* aos enterócitos pode estar relacionado à possibilidade do ambiente *in vitro* não estar simulando satisfatoriamente o que ocorre *in vivo* ou que o zinco interfira em outros mecanismos secretórios, por exemplo, da *E. coli* e não na adesão [2].

O modo de atuação do zinco na redução da incidência de diarreia e mortalidade por doença do edema ainda não é conhecida [2,20]. Pesquisas *in vivo* usando as quantidades de 2.400 a 3.000 ppm de zinco na dieta de leitões por 42 dias após o desmame indica-

ram que o zinco tem efeito promotor de crescimento, atua benéficamente sobre o consumo de ração e reduz eficientemente a incidência de diarreia e mortalidade por colibacilose no período após o desmame [2,10,13, 14,17]. A adição de 2400 ppm na dieta de leitões após o desmame promoveu o aumento do ganho de peso e reduziu a incidência de diarreia, no entanto sua eficiência variou de acordo com o grau de pureza da fonte de zinco [11,16].

A adição de diferentes níveis de zinco não foi eficiente para o controle da diarreia pós-desmame em leitões [1,18] e o uso na dieta de 3000 ppm de zinco no período de 21 a 42 dias após o desmame leva a sintomas de toxidez nos animais [2]. Além disso, questiona-se a inclusão de altas dosagens de zinco nas dietas, pois grande parte do zinco consumido na forma de óxido é excretada nas fezes, gerando poluição ambiental e consequências graves para saúde pública [18].

Alguns autores sugerem que o zinco atua aumentando a concentração intestinal de IgA e com isso reduz a translocação de bactérias do interior do intestino para sítios extra-intestinais e diminui a multiplicação bacteriana [4]. A constante excreção da *E. coli*, associada à alta concentração de zinco nas fezes e baixa ocorrência de diarreia, indica que esse mineral não inibe a multiplicação da bactéria no intestino e sugere a existência de outros mecanismos de ação do zinco na prevenção da diarreia [1,16].

CONCLUSÕES

Nas condições *in vitro* em que foi desenvolvido esse experimento, concentrações de óxido de zinco de 1200, 2400 e 3000 ppm, testadas, não inibiram a adesão de *Escherichia coli* aos enterócitos de suínos, sugerindo outros mecanismos de ação do zinco no desenvolvimento da patologia da colibacilose.

REFERÊNCIAS

- 1 Arantes V.M., Thomaz M.C., Kronka R.N., Malheiros E.B. & Ristow L.E. 2002. Níveis de zinco na dieta de leitões recém-desmamados sobre isolamento de *E. coli*. In: *Anais do I Congresso Latino Americano de Suinocultura*. (Foz do Iguaçu, Brasil). 1 CD-ROM.
- 2 Bertol T.M. & Brito B.G. 1998. Efeito de altos níveis de zinco suplementar no desempenho e na mortalidade de leitões. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 33: 451-459
- 3 Bertschinger H.U. & Fairbrother J.M. 1999. *Escherichia coli* Infections. In: Straw B. E. D'Allaire, S. Mengeling, W.L. Taylor D.J. (Eds). *Disease of Swine*. 8th edn. Ames: Iowa State University Press, pp. 431- 468.
- 4 Broom L.J., Miller H.M, Kerr K.G. & Knapp J.S. 2006. Effect of zinc supplemented as either an organic or an inorganic source and of microbial phytase on zinc and other minerals utilization by weanling pigs. *Veterinary Science*. 80: 45-54
- 5 Chae C., Cheon D.S., Min K., Kno, D. & Lee Y.S. 1998. Edema disease: seasonal prevalence and O serogroup. In: *Proceedings of the 15th Congress of the International Pig Veterinary Society*. (Birmingham, England). p.103.
- 6 Cho W.S., Park Y.C. & Chae C. 2000. Genotypic prevalence for fimbriae and enterotoxins in *Escherichia coli* isolated from diarrheic piglets in Korea. In: *Proceedings of the 16th Congress of the International Pig Veterinary Society*. (Melbourne, Australia). p.54.
- 7 Gyles C.L., Prescott J.F., Songer J.G. & Thoen C.O. 2004. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 3th edn. Iowa: Blackwell Publishing, 456p.
- 8 Hampson D.J. & Murdoch A.I. 2002. Chemeq polymeric antimicrobial for the control of experimental post weaning colibacillosis [paper 278]. In: *Proceedings of the 17th Congress of the International Pig Veterinary Society*. (Ames, Iowa). 1 CD-ROM.
- 9 Johansen M., Jorgensen L. & Hansen C.F. 2000. Restricted feeding for prevention of *E. coli* associated diarrhea in weaned pigs. In: *Proceedings of the 16th Congress of the International Pig Veterinary Society*. (Melbourne, Australia). p.20.
- 10 Lima G.J.M.M., Guidoni A.L., Mores N., Bertol T.M. & Gil L.G.V. 1996. Efeito do uso de diferentes fontes de óxido de zinco em dietas de leitões após o desmame. In: *Resumos da XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. (Fortaleza, Brasil). pp.177-181.
- 11 Lima G.J.M.M., Guidoni A.L., Mores N., Bertol T.M. & Gil L.G.V. 1996. Efeito do uso de altos níveis de zinco em dietas simples e semi complexas de leitões após o desmame. In: *Resumos da XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. (Fortaleza, Brasil). pp.185-187.
- 12 Mattsson S. & Wallgren P. 2000. Phenotyping of *E. coli* serotypes associated to oedema disease. In: *Proceedings of the 16th Congress of the International Pig Veterinary Society*. (Melbourne, Australia). p.51.

- 13 Melin L., Holmgren N., Wallgren P. & Franklin A. 1998. Sensitivity to quinolones and zinc oxide in coliform bacteria from weaned piglets. In: *Proceedings of the 15th Congress of the International Pig Veterinary Society*. (Birmingham, England). p.213.
- 14 Miyada V.S., Menten J.F.M., Botelho F.G.A. & Debuschi F. 1996. Efeitos de níveis de zinco dietético suplementar e períodos de fornecimento sobre o desempenho de leitões em recria. In: *Resumos da XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. (Fortaleza, Brasil). pp. 113-115.
- 15 Mores N. & Amaral A. L. 2001. Patologias associadas ao desmame. In: *Resumos do X Congresso Nacional da Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos*. (Porto Alegre, Brasil). pp. 215-224.
- 16 Mores N., Cristani J., Piffer I.A., Barioni W.J. & Lima G.M.M. 1998. Efeito do óxido de zinco em leitões infectados experimentalmente com *Escherichia coli*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 50: 513-523.
- 17 Paseka A., Smola J., Novotny L. & Drabek J. 2004. The effect of administration of protected zinc oxide on diarrhea occurrence in post-weaning piglets. In: *Proceedings of the 18th Congress of the International Pig Veterinary Society*. (Hamburg, Germany). p.761.
- 18 Pejsak Z., Markowska L.D., Mokizycka A. & Szkoda J. 1998. The effects of zinc supplementation on pig productivity and zinc concentration in tissues. In: *Proceedings of the 15th Congress of the International Pig Veterinary Society*. (Birmingham, England). p.17.
- 19 Rantzer D. & Svendsen E. 2002. *E. coli* associated post weaning diarrhea in pigs: Effects of frequent feeding [paper 383]. In: *Proceedings of the 17th Congress of the International Pig Veterinary Society*. (Ames, Iowa). 1 CD ROOM.
- 20 Revy P.S., Jondreville C., Dourmad J.Y. & Nys Y. 2004. Effect of zinc supplemented as either an organic or an inorganic source and of microbial phytase on zinc and other minerals utilization by weaning pigs. In: *Animal Feed and Technology*. (Davis, EUA). 116: 93-112.
- 21 Sobestiansky J., Barcellos D., Mores N., Carvalho L.F. & Oliveira S. 2001. *Clínica e Patologia Suína*. 2 ed. Goiânia: Art3, 464p.
- 22 Tsilyoyannis V.K., Kyriakis S.C., Vlemmas J. & Sarris K. 1998. The effect of organic acids on the control of post weaning diarrhea syndrome of piglets. In: *Proceedings of the 15th Congress of the International Pig Veterinary Society*. (Birmingham, England). p.151.
- 23 Tsilyoyannis V.K., Kyriakis S.C., Vlemmas J. & Sarris K. 1998. The effect of organic acids on the control of post weaning oedema disease of piglets. In: *Proceedings of the 15th Congress of the International Pig Veterinary Society*. (Birmingham, England). p.152.
- 24 Wittig W. 1999. Infecções por *Escherichia coli*. In: Beer J. (Ed). *Doenças infecciosas em animais domésticos*. São Paulo: Roca, pp. 93-111.