



Effet d'un mélange microencapsulé de substances aromatiques chez le porcelet sevré, infecté artificiellement avec *Escherichia coli* F4

Benedetta TUGNOLI (1), Andrea BONETTI (2), Andrea PIVA (1,2), Ester GRILLI (2,3)

(1) Vetagro S.p.A., via Porro 2, 42124, Reggio Emilia, Italie

(2) Université de Bologne, DIMEVET, Via Tolara di Sopra 50, 40064, Ozzano Emilia (BO), Italie

(3) Vetagro Inc., 17 E. Monroe St., Suite #179, 60603, Chicago, IL, USA

benedetta.tugnoli@vetagro.com

A microencapsulated mixture of botanicals in piglets artificially infected with *Escherichia coli* F4 at weaning

The study evaluated effects of a microencapsulated blend of botanicals, fed to weaning piglets artificially challenged with *Escherichia coli* F4, the main determining agent of post-weaning diarrhoea. A total of 32 piglets weaned at 28 days of age were divided into four groups: negative control - basal diet, not challenged; infected control (INF) - basal diet, challenged; ZnO group (ZnO) - basal diet + 2500 ppm of ZnO, challenged; and treated group (TRT) - basal diet + microencapsulated blend of botanicals at 2 kg/t, 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 infected animals showed clinical signs induced by the challenge, with 25% mortality in groups INF and TRT and no mortality in group ZnO. At day 3 post-challenge, the INF group had lost a significant amount of weight compared to the control group, while the ZnO and TRT groups had intermediate values of weight gain ($P < 0.01$). The TRT partially, but not significantly, reduced the counts of total *E. coli* after the challenge (days 2 and 3) compared to the INF group and reduced the percentage of faecal samples positive for *E. coli* F4 (inoculated) to 83.3%, compared to 90.2% for the INF group and 86.0% for the ZnO group. In conclusion, the microencapsulated blend of botanicals used in this study can partially help piglets during a challenge with *E. coli* F4.

INTRODUCTION

La diarrhée en post-sevrage (DPS) est l'un des problèmes les plus critiques de l'industrie porcine dans le monde en raison de son fort impact sur les porcelets (Luppi, 2017). Les principaux agents pathogènes mis en cause sont les bactéries *Escherichia coli* entérotoxigènes, principalement la souche *E. coli* F4/K88 qui endommage la muqueuse intestinale, provoquant inflammation et diarrhée (Dubreuil *et al.*, 2016). Pendant des décennies, dans de nombreux pays, les symptômes des DPS ont été contrôlés avec succès à l'aide de doses pharmacologiques de ZnO (2000-3000 ppm). Mais le ZnO à usage vétérinaire n'est plus autorisé dans l'Union Européenne depuis 2022, certains pays l'ayant même interdit de façon anticipée. Des stratégies alternatives sont donc nécessaires pour prévenir les DPS (Bonetti *et al.*, 2021). Les plantes et leurs extraits peuvent être une alternative prometteuse au ZnO grâce à leurs propriétés antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anti-oxydantes (Rossi *et al.*, 2020), pouvant, être utiles au niveau intestinal pour contrôler *E. coli* F4. Le but de cette étude était d'évaluer l'intérêt d'un mélange microencapsulé de plantes par rapport au ZnO pharmacologique chez des porcelets artificiellement infectés par *E. coli* F4 au sevrage.

1. MATERIEL ET METHODES

Nous avons utilisé des porcelets indemnes d'*E. coli* F4, c'est-à-dire sans *E. coli* F4 à la naissance mais portant dans leur génome les variants géniques des mucines MUC4 et MUC13 qui sont considérés dans la littérature comme les principaux marqueurs de susceptibilité génétique à *E. coli* F4 (Rasschaert *et al.*, 2007 ; Ren *et al.*, 2012). Au total, 32 porcelets (Large White) sevrés à 28 jours d'âge (poids vif moyen $6,75 \pm 1,25$ kg) ont été répartis en quatre groupes (quatre porcs/enclos) : 1) contrôle négatif (CTR), régime de base (maïs-soja, de type commercial non médicamenteux, formulé pour satisfaire ou dépasser les exigences des porcs en croissance recommandées par le National Research Council (2012), avec Energie nette 2400 kcal/kg, MAT 16,5%), non infectés ; 2) témoin infecté (INF), régime de base, infectés ; 3) groupe ZnO (ZnO), régime de base + 2500 ppm de ZnO, infectés ; 4) groupe traité (TRT), régime de base + mélange microencapsulé de substances aromatiques (thymol de synthèse et polyphénols d'origine naturelle) à 2 kg/tonne d'aliment, infectés. Les régimes étaient distribués *ad libitum*. Après 18 jours d'étude, l'infection consistait en une inoculation orale avec *E. coli* F4 (souche sauvage, résistante à la colistine et à la rifampicine, $10,3 \text{ Log}_{10}$ Unités Formant Colonie (UFC)/porcelet). Durant 14 jours supplémentaires, l'état sanitaire des porcelets a été suivi (signes cliniques, température rectale, mortalité). Les animaux ont été pesés individuellement à J0, J3, J7 et J14 après infection ; des échantillons fécaux ont été prélevés pour les comptages totaux d'*E. coli* et d'*E. coli* F4

(inoculés) par dilutions en série et ensemencement sur des plaques de gélose MacConkey (*E. coli* totaux) ou de la gélose MacConkey + rifampicine (*E. coli* F4).

L'unité expérimentale était le porc et les données ont été analysées à l'aide d'une ANOVA unidirectionnelle, suivie d'un test post-hoc de Tukey (Graph Pad Prism 6). Les différences ont été jugées significatives à $P < 0,05$.

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Tous les animaux infectés ont montré des signes cliniques typiques d'une infection à *E. coli* F4, telles que diarrhée, dyspnée et température rectale plus élevée (Luppi, 2017) conformément à leur susceptibilité génétique. Les traitements n'ont pas empêché les signes cliniques, mais le ZnO a évité la mortalité tandis que deux animaux sont morts à J4 à la fois dans le groupe TRT et dans le groupe INF. Comme le montre le tableau 1, l'infection a eu un impact négatif rapide sur la croissance des animaux : à J3 après inoculation, le groupe INF a perdu du poids de manière significative par rapport au groupe témoin ($P < 0,01$), tandis que le groupe ZnO et le groupe TRT ont montré des valeurs intermédiaires de gain de poids. Puis, à J7, aucune différence statistique n'a été mise en évidence, mais la différence de gain de poids comparée au groupe INF était numériquement plus élevée dans le groupe TRT (+1,95 kg) que dans le groupe ZnO (+0,55 kg) ($P = 0,13$). Ce résultat s'écarte de l'action connue de promotion de la croissance par le ZnO (Bonetti *et al.*, 2021), mais est probablement lié au faible nombre d'animaux et à la forte variabilité.

Tableau 1 – Performances de croissance moyenne des porcelets après infection par *E. coli* F4

Mesures	CTR	INF	ZnO	TRT	P
PV jour 0, kg	14,48	15,29	15,28	15,65	0,78
PV jour 3, kg	16,50	14,98	15,83	15,93	0,84
PV jour 7, kg	19,35	19,32	18,88	21,50	0,63
PV jour 14, kg	25,33	27,32	24,83	28,03	0,44
GM jours 0-3, kg	2,03 ^a	-0,31 ^b	0,55 ^{ab}	0,28 ^{ab}	< 0,01
GM jours 0-7, kg	4,88	3,05	3,60	5,00	0,13
GM jours 0-14, kg	10,85	11,05	9,55	11,53	0,41

PV = poids vif ; GM = gain moyen. ^{ab} Au sein d'une ligne, des lettres différentes indiquent des différences significatives ($P < 0,05$).

L'infection a également influencé rapidement les analyses microbiologiques des porcelets du groupe INF, augmentant les quantités d'*E. coli* totaux et d'*E. coli* F4 excrétés, avec des pics aux jours 3 et 4, en accord avec la littérature (Luise *et al.*, 2019). Comme indiqué dans la figure 1, les traitements n'ont pas montré de différences significatives sur les quantités d'*E. coli* totaux et d'*E. coli* F4 excrétés par rapport au groupe INF. Mais dans le groupe TRT, le nombre d'*E. coli* totaux après inoculation

(jours 2 et 3) a été partiellement réduit par rapport au groupe INF. Dans l'ensemble, le pourcentage d'échantillons fécaux positifs pour *E. coli* F4 (inoculé) était de 83,3 % pour le groupe TRT contre 90,2 % pour le groupe INF et 86 % pour le groupe ZnO, suggérant un effet partiellement positif pour les deux traitements quant au contrôle de la souche *E. coli* F4 inoculée.

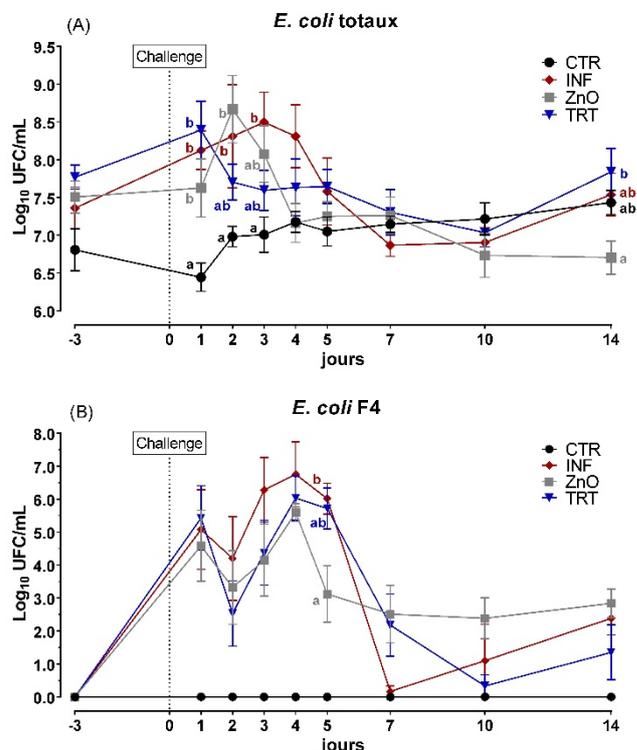


Figure 1 – Numérations d'*E. coli* totaux (A) et d'*E. coli* F4 (B) dans les échantillons fécaux

Les données sont présentées sous forme de moyennes ($n = 8$) et d'écart types représentés par des barres verticales. ^{ab} Pour chaque point de temps, des lettres différentes indiquent des différences significatives ($P < 0,05$). Pour *E. coli* F4, le groupe témoin CTR, non infecté, a été exclu de l'analyse statistique.

CONCLUSION

Même avec certaines limites liées au faible nombre d'échantillons et à la grande variabilité des paramètres analysés, cette étude préliminaire a montré que le mélange microencapsulé de substances aromatiques peut avoir un effet partiellement positif chez les porcelets infectés par *E. coli* F4. De nouvelles études semblent donc nécessaires afin de valider cette tendance positive.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 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.
- Dubreuil J.D., Isaacson R.E., Schifferli D.M., 2016. Animal Enterotoxigenic Escherichia coli. *EcoSal Plus*, 7(1), 1-47.
- 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.
- Luppi A., 2017. Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. *Porcine Health Manag.* 3(16), 1-18.
- National Research Council (NRC), 2012. Nutrient requirement of pigs. 11th ed. National Research Council, Academy Press, Washington, DC, USA.
- 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.
- 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.
- 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.