EDISON DE ALMEIDA

**UTILIZAÇÃO DO PROBIÓTICO *PROTEXIN*[®] EM LEITÕES
NA FASE DE CRECHE, SUBMETIDOS AO DESAFIO COM
*Escherichia coli***

Pirassununga

2006

EDISON DE ALMEIDA

**Utilização do probiótico Protexin[®] em leitões na fase de
creche, submetidos ao desafio com *Escherichia coli***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Nutrição Animal da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Medicina Veterinária

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição Animal

Orientador:

Prof. Dr. Aníbal de Sant'Anna Moretti

Pirassununga

2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1643
FMVZ

Almeida, Edison de

Utilização do probiótico Protexin® em leitões na fase de creche, submetidos ao desafio com *Escherichia coli* / Edison de Almeida. – Pirassununga: E. Almeida, 2006.
46 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, 2006.

Programa de Pós-graduação: Nutrição Animal.
Área de concentração: Nutrição Animal.

Orientador: Prof. Dr. Aníbal de Sant'Anna Moretti.

1. Probiótico. 2. Leitões desmamados. 3. Desafio. 4. Microflora intestinal. 5. Integridade intestinal. I. Título.

BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão de Bioética

PARECER

Interessado: Edison de Almeida

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 785/2005, intitulado: "Avaliação do uso de um probiótico (Protexintm) em leitões na fase de creche submetidos a desafio com *Escherichia coli*", no qual foram utilizados 72 (setenta e dois) leitões, sob responsabilidade do Prof. Dr. Aníbal de Sant'Anna Moretti, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 02 de dezembro de 2005

Prof. Dra. Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ALMEIDA, Edison de

Título: Utilização do probiótico *Protexin*[®] em leitões na fase de creche, submetidos ao desafio com *Escherichia coli*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Apoio:

Novartis Saúde Animal Ltda

AGRADECIMENTOS

Ao Grande Arquiteto do Universo pelo dom da vida;

Ao Prof. Dr. Anibal de Sant'Anna Moretti, orientador abnegado e amigo, pela confiança e paciência;

Aos professores do departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP, alguns inclusive contemporâneos do curso de Graduação, pela oportunidade, apoio e contribuição;

Ao Prof. Dr. Felix Ribeiro de Lima (*in memorian*), ex-colega do segmento da Indústria Farmacêutica Veterinária, pelo incentivo;

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, Wagner Vianna, Simone Martins, Francine Falleiros e Sidney Santos, envolvidos diretamente comigo no experimento e, particularmente, ao Abrão Abrahão, companheiro de todas as horas;

Aos funcionários do departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP, particularmente ao Fabio Zanquetin, do Laboratório de Pesquisa em Suínos;

Ao Eduardo Scheffer, pela sua colaboração no experimento e, principalmente, pelo seu exemplo de força de vontade;

Ao Senhor Ermete Antonio Wegher, pelo apoio inicial;

Aos colegas da Novartis Saúde Animal, particularmente o Dr. Richard Burt, pela oportunidade;

À minha esposa, minhas filhas e aos meus pais, pela ajuda e compreensão;

Aos futuros colegas, alunos do curso de Graduação, particularmente ao Daniel Bruno, que tiveram algum tipo de participação no experimento ou na elaboração da dissertação;

Às colegas do Laboratório de Sanidade Suína da FMVZ-USP em São Paulo, onde foi analisado o material coletado no experimento;

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

Pirassununga, Outubro de 2005

RESUMO

ALMEIDA, E. de. **Utilização do probiótico Protexin® em leitões na fase de creche, submetidos ao desafio com *Escherichia coli*.** [Use of the probiotic *PROTEXIN*® in nursery piglets facing a challenge with *Escherichia coli*]. 2006. 46 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

O experimento foi realizado na unidade de creche do Laboratório de Pesquisa em Suínos (LPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), *campus* de Pirassununga (SP), sendo utilizados setenta e dois leitões recém desmamados (21 dias), com peso médio de 6,5 kg. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, num arranjo fatorial 2 x 2, sendo os fatores: probiótico e desafio, os quais definiram os tratamentos: T 1 - emprego do probiótico, com desafio (CPCD); T 2 - emprego do probiótico, sem o desafio (CPSD); T 3 - ausência do probiótico, com desafio (SPCD); T 4 - ausência do probiótico e sem o desafio (SPSD). As faixas de ganho médio de peso diário consideradas foram: dos 21 aos 35 dias (GMPD 35); dos 35 aos 49 dias (GMPD 49); dos 49 aos 63 dias (GMPD 63) e dos 21 aos 63 dias (GMPD Total). Os leitões foram submetidos ao desafio em sala separada, 14 dias após a distribuição nos tratamentos. O desafio foi realizado com uma amostra de *E. coli* positiva para as toxinas LT e ST b e para as fímbrias K 88 e F 18. A colheita das fezes foi feita após o desafio, em três períodos (35, 42 e 49 dias de idade dos leitões), para contagem de coliformes fecais, sendo analisadas pelo Laboratório de Sanidade Suína da FMVZ-USP, em São Paulo. A ração oferecida aos leitões foi semelhante à empregada comercialmente nas criações, havendo somente suplementação ou não do probiótico. O experimento avaliou o desempenho dos leitões através do ganho de peso diário (GMPD) e peso (P), acrescido da verificação da consistência das fezes e

da contagem de coliformes fecais. Os resultados mostraram interação significativa entre probiótico e desafio quanto ao GMPD 49, indicando nesse período, o ponto de inflexão que caracterizou o início da mudança no comportamento desta variável. Com relação à consistência das fezes, o probiótico agiu reduzindo o percentual de fezes cremosas, confirmando sua ação protetora da mucosa intestinal, reduzindo a perda de líquido e, conseqüentemente, a diarreia. Além de atuar melhorando os parâmetros relativos ao desempenho e à consistência das fezes, a utilização do probiótico promoveu uma alteração na contagem de *E. coli*, reduzindo-a para um valor inferior, 14 dias após o desafio, reforçando assim a sua ação benéfica junto à manutenção da integridade intestinal.

Palavras-chave: Probiótico. Leitões desmamados. Desafio. Microflora intestinal. Integridade intestinal.

ABSTRACT

ALMEIDA, E. de. **Use of the probiotic *Protexin*[®] in nursery piglets facing a challenge with *Escherichia coli*.** [Utilização do probiótico Protexin[®] em leitões na fase de creche, submetidos ao desafio com *Escherichia coli*.]. 2006. 46 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

The experiment was conducted in the nursery unit at the Swine Research Laboratory from the FMVZ, University of São Paulo, Pirassununga *campus*, where we used 72 piglets recently weaned (about 21 days) with the average weight of 6,5 kg. The experiment was outlined in random blocks system, 2 x 2 factorial arrangements, being the factors: probiotic and challenge. The treatment was: T1 – use of the probiotic, with challenge (CPCD); T2 – use of the probiotic, without the challenge (CPSD); T3 – no probiotic, with challenge (SPCD); T4 – no probiotic and no challenge (SPSD). The intervals of weight daily gain considered were 21 to 35 days (GMPD 35); 35 to 49 days (GMPD 49); 49 to 63 days (GMPD 63) and 21 to 63 days (GMPD Total). The piglets were kept in two different rooms. One of the groups was challenged 14 days after the distribution in the treatments, in a separated room and for the challenge we used a sample of *E.coli* positive for the toxins LT and ST b and also for the *pilli* K88 and F18. The samples of feces were collected after the challenge in three periods (35, 42 and 49 days of age of the piglets) and sent to the Swine Health Laboratory at the FMVZ-USP, São Paulo *campus*, where the count of some species of intestinal bacteria was performed. The feed offered to the piglets was the same used in commercial swine herds. The only difference was the use or not of the probiotic. The experiment evaluated the development of the piglets through the amount of weight (AW) they gained and the average daily gain (ADG) of weight, plus the verification of the consistency of the feces and the count of some intestinal

bacteria. The results showed a significant interaction between the probiotic and the challenge, as related to GMPD 49, indicating in this period the point of inflexion that characterized the beginning of the change in behavior of this variable. Analyzing the consistency of the feces we have notice that the probiotic has reduced the percentage of creamy feces, confirming its protective action in the intestinal mucus, reducing the loss of liquid and consequently the diarrhea. Together with the positive effect on the performance, the probiotic reduced the abnormal consistency of the feces, specially the creamy ones, as well as decreased the counting of *E.coli* 14 days after the challenge, keeping the intestinal integrity.

Key words: Probiotic. Weaned piglets. Challenge. Intestinal micro flora. Intestinal integrity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Histograma dos ganhos de peso nos tratamentos e faixas etárias estudadas	31
------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das rações utilizadas no experimento.....	25
Tabela 2 - Valores médios, desvios-padrão, mínimo e máximo no peso aos 21 dias de idade, nos tratamentos.....	30
Tabela 3 - Médias e desvios-padrão dos ganhos médios de peso diários: GMPD 49 (35 a 49 dias), GMPD 63 (49 a 63 dias), GMPD Total (21 a 63 dias), nos tratamentos	31
Tabela 4 - Médias e desvios-padrão dos pesos aos 35 dias de idade, peso aos 48 dias e peso aos 63 dias, nos tratamentos.....	32
Tabela 5 - Valores percentuais dos tipos de consistência das fezes, nos tratamentos.....	32
Tabela 6 - Valores percentuais dos tipos de consistência das fezes, nos tratamentos.....	33
Tabela 7 - Valores médios e desvios-padrão da contagem de coliformes fecais, com base na cepa <i>E. coli</i> positiva para toxinas LT e STb e para fímbrias K88 e F18 (contagem na potência de 10^8)	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVO	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	ANIMAIS	24
4.2	LOCAL E INSTALAÇÕES	24
4.3	ALIMENTAÇÃO	24
4.4	TRATAMENTOS	26
4.5	DESAFIO E COLHEITA DE FEZES	26
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
5	RESULTADOS	29
5.1	HOMOGENEIDADE DA AMOSTRA	30
5.2	GANHO DE PESO E PESO DOS ANIMAIS	30
5.3	CONSISTÊNCIA FECAL E CONTAGEM DE COLIFORMES	32
6	DISCUSSÃO	34
7	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	40

Nos dias de hoje os suinocultores vêm procurando, cada vez com maior frequência, alternativas naturais para o controle das diarreias, as quais são comuns após a transferência de leitões para a creche, sendo também responsáveis por grandes prejuízos econômicos (CHOCT, 2001; REID; FRIENDSHIP, 2002; VERSTEGEN; WILLIAMS, 2002). A indústria farmacêutica e de produtos biológicos para uso veterinário, por sua vez procura acompanhar essa demanda crescente, desenvolvendo e comercializando novos produtos que atuem nesse segmento (HUAYNATE et al., 2003; ZANI et al., 1998).

O fato de tratar-se de uma tecnologia com tendência de utilização cada vez mais ampla na suinocultura chamou a atenção para o assunto, motivando a avaliação do uso de um probiótico comercial composto de várias cepas e indicado para ser aplicado como auxiliar na manutenção da integridade da microflora intestinal.

Os probióticos, considerados por Fuller (1989,1992) como alimentos funcionais, são empregados também em determinadas fases da criação de suínos como produtos alternativos à utilização de agentes antimicrobianos.

A utilização desses produtos, particularmente na fase inicial da vida dos leitões e anteriormente a períodos de estresse, como o desmame, contribui para a manutenção da flora nativa do intestino delgado (ALNO et al., 2004). Por ser um suplemento alimentar composto de microrganismos vivos, que beneficia o hospedeiro animal através do equilíbrio da sua flora intestinal nativa, os probióticos agem assegurando a integridade do epitélio intestinal, garantindo uma maior absorção de nutrientes e melhor aproveitamento dos diversos componentes da ração fornecida aos suínos (GUSILS et al., 2002). Dessa ação referida, particularmente na nutrição dos leitões, há a otimização indireta de alguns índices de

produção, como ganho de peso diário e conversão alimentar (ALEXOPOULUS et al., 2004).

Entre outros efeitos benéficos dos probióticos estão a produção de bacteriocininas e o estímulo ao sistema imunológico.

O uso de probióticos na suinocultura não está restrito aos leitões desmamados. A sua utilização na maternidade, adicionado à ração de gestação e à ração pré-inicial, vem se tornando um procedimento cada vez mais comum (ALEXOPOULUS et al., 2002,2004). Todas essas características positivas dos probióticos levaram-nos a defender a hipótese de que o seu uso beneficiaria um grupo de leitões recém desmamados, através da homogeneização do lote suplementado, melhorando seus índices de produção e diminuindo a ocorrência de diarreias, comparativamente a um grupo de animais não suplementado com o produto.

O objetivo deste estudo foi averiguar os benefícios do probiótico Protexin® (marca registrada da Probiotics International Ltda e distribuído no Brasil pela Novartis Saúde Animal Ltda) na manutenção e/ou rápida recuperação da integridade da flora intestinal nativa de leitões desmamados, após desafio.

A flora intestinal dos suínos é altamente complexa, estabelecendo-se ao nascimento dos leitões em poucas horas (MILES, 1993). Inúmeros fatores, como o próprio uso de probióticos ou de agentes antimicrobianos na dieta, comprometem o seu equilíbrio (ABE et al., 1995; BUDIÑO et al., 2003; JENSEN, 1998).

Beeman¹ conduziu um estudo na Escola de Veterinária da Universidade Estadual de Kansas (EUA), no sentido de demonstrar a ação dos probióticos como auxiliares na manutenção da integridade intestinal.

Na década de noventa, Cho et al. (1992), estudou os efeitos benéficos da utilização de probióticos em alguns índices de produção. Entre os índices mencionados está o ganho de peso diário (GPD) e a conversão alimentar (CA).

A literatura vem assim evidenciando, através dos vários estudos, melhora no ganho de peso e na conversão alimentar, além da menor incidência de diarreias em leitões alimentados com dieta contendo probióticos (GIARDINI et al., 2001; JIANG et al., 2002).

Fedalto et al. (2001,2002,2003) em particular, realizou uma série de investigações estudando a ação de probióticos na ração de suínos comparando-os inclusive com o uso de antibióticos.

A suplementação da ração de leitões com probióticos ou a sua aplicação individual, imediatamente após o desmame, além de melhorar a absorção de nutrientes estimula também a produção de enzimas, vitaminas e a síntese de aminoácidos essenciais (JUNQUEIRA et al., 2001; KIERS et al., 2003).

Na realidade os probióticos são microrganismos vivos que, juntamente com produtos específicos do seu metabolismo ou ingredientes que promovam seu crescimento, são adicionados à dieta dos suínos com o intuito de estabelecer um

¹ Informação fornecida por Beeman em 1988, no folheto institucional da Novartis Saúde Animal Ltda.

balanço desejável na microbiota que habita o trato gastrointestinal (BRUNO, 2004). Mudanças benéficas nessa microbiota entérica reduzem, principalmente, a população de algumas cepas potencialmente patogênicas de *Escherichia coli*, além de ajudar a diminuir a liberação de toxinas no intestino (BLOMBERG et al., 1993).

Experimentos conduzidos por Collinder et al. (2003) e Alexopoulos et al. (2004), demonstraram melhora no ganho de peso e na conversão alimentar de leitões alimentados com dieta contendo probióticos.

Os probióticos destacam-se ainda como estimuladores do sistema imunológico, através do suporte prestado à imunidade local da mucosa intestinal (BOMBA et al., 2003).

Entre os componentes do sistema imunológico envolvidos nesse processo está a Imunoglobulina A (Ig A), cuja presença no trato intestinal é fundamental como auxiliar no controle da invasão bacteriana, aglutinando antígenos particulados e neutralizando vírus (TIZARD, 1985). Além disso, a presença de probióticos no trato intestinal aumenta a atividade dos macrófagos, reforçando a implantação da resposta imune mediada por células e, conseqüentemente, estimulando a produção de anticorpos (APGAR et al., 2003).

Probióticos produzem também, através do seu metabolismo, ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e substâncias conhecidas como bacteriocininas (acidofilina, lactobacilina, entre outras), que têm efeito antimicrobiano frente a alguns patógenos intestinais, atuando no controle de diversas infecções, promovendo a profilaxia de doenças entéricas e auxiliando na manutenção do estado de saúde dos animais (AVILA et al., 1998; REID; FRIENDSHIP, 2002; SPENCER; CHESSON, 1994).

Outros autores têm comprovado que leitões alimentados com probióticos apresentam concentrações menores de toxinas nas fezes e sinais clínicos de diarreia mais brandos (ALNO et al., 2004; PETTIGREW et al., 2004).

De acordo com Benno (2001) os microrganismos que compõem as formulações dos probióticos instalam-se na parede intestinal através de mecanismos de exclusão competitiva, cuja principal característica consiste na competição com as bactérias patogênicas pelos substratos e pelos locais de adesão (GARDINER et al., 2004; KOS et al., 2003; KRAUSE et al., 1995;), além de reduzir o pH do intestino para níveis próximos de cinco a seis, o que otimiza o crescimento dos lactobacilos e inibe o crescimento dos coliformes (SAKATA et al., 2003).

Os probióticos agem, ainda, melhorando a absorção dos nutrientes através do estímulo da produção de enzimas (proteases e amilases), das vitaminas do complexo B, da vitamina K e também da síntese de aminoácidos essenciais (KORNEGAY, 1986; MELIN; WALLGREN, 2002). Há relatos de suplementação alimentar com probióticos, cuja prática levou à diminuição na concentração portal de amônia, o que melhorou a digestibilidade das proteínas devido ao aumento da atividade de proteases entéricas ácidas e alcalinas (HABERER et al., 2003).

A síntese de algumas enzimas, pelos probióticos, auxilia também a hidrólise dos constituintes à base de soja da ração, melhorando sua textura, aroma e sabor, o que favorece, indiretamente, a sua ingestão (KIERS et al., 2003).

O uso de probióticos na suinocultura não está restrito aos leitões. Há evidências de que a sua utilização na dieta de porcas lactantes melhore a ingestão de nutrientes por parte das mesmas, através do aumento do apetite. (PRADAL-ROA; VELAZQUEZ-MADRAZO, 2004). Ocorre também uma diminuição na eliminação de bactérias patogênicas, através das fezes de porcas suplementadas com probióticos.

Os principais beneficiados nesse caso, indiretamente, seriam os leitões recém nascidos, que por permanecerem num ambiente menos contaminado estariam menos sujeitos à aquisição de infecções (ALEXOPOULUS et al., 2002,2004). Pesquisas mais recentes procuram demonstrar que a eliminação dos microrganismos que compõem os probióticos, através das fezes das porcas, facultaria aos leitões a possibilidade de uma maior ingestão dos mesmos, antes mesmo de terem acesso à alimentação sólida (PIG INTERNATIONAL MAGAZINE, 2003).

Best (1999), Wenk (2003), Kritas e Morrison (2004) e Van Wesel et al. (2004) reafirmam a tendência do uso crescente de probióticos, como alternativa à proibição da inclusão de agentes antimicrobianos tradicionais nas rações de animais destinados ao consumo humano.

Apesar da diversidade de resultados e conclusões obtidos na revisão dos trabalhos consultados, resta mencionar a dificuldade de se melhor avaliar a ação do probiótico junto à microflora.

Grande parte dessa dificuldade está relacionada com o nível do desafio, representado pelos distintos padrões de sanidade encontrados nos sistemas de criação comercial de suínos. Por outro lado, a dificuldade se prende ao próprio estudo da microflora, havendo a necessidade da utilização de diferentes meios para identificação dos distintos agentes.

Dentro dessa premissa foi escolhida, para o desenvolvimento do presente estudo, uma estrutura de pesquisa que apresentasse elevado nível sanitário, com a finalidade de poder expressar verdadeiramente a ação do probiótico, aliado ao desafio representado por uma cultura de bactérias identificada.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados setenta e dois leitões recém desmamados, de linhagem híbrida, com 21 dias de idade e 6,5 kg de peso vivo em média, provenientes de uma granja comercial localizada no município de Cravinhos - S P.

4.2 LOCAL E INSTALAÇÕES

O experimento foi realizado na unidade de creche do Laboratório de Pesquisa em Suínos (LPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), *campus* de Pirassununga. Os animais foram alojados em gaiolas suspensas com piso aquecido e parcialmente ripado, medindo aproximadamente 0,600 m² e constituídas de comedouro individual e bebedouro tipo chupeta.

4.3 ALIMENTAÇÃO

A água e a alimentação foram fornecidas *ad libitum* aos leitões e a composição da ração está demonstrada na tabela 1, sendo as formulações

semelhantes às empregadas comercialmente nas criações, havendo somente a suplementação ou não do probiótico.

Tabela 1 – Composição das rações utilizadas no experimento

	Pré-inicial	Inicial I	Inicial II
<i>Macro ingredientes</i>			
Milho em grão 8.3/730 (kg)	192,300	239,730	311,100
Óleo de soja (L)	7,500	10,000	7,000
Farelo de soja 46.0/80 (kg)	100,000	125,000	158,000
Farinha de carne 45% (kg)			15,000
Sal comum (kg)			2,500
Calcáreo 38% (kg)			2,400
Fosfato Bicálcico (kg)			3,000
 Subtotal <i>Macro</i>	 299,800	 374,730	 499,000
<i>Micro ingredientes</i>			
DL - Metionina 98% (kg)			0,350
L - Lisina 80% (kg)			0,300
Vermífugo (Ivermectina) (kg)		0,170	
Suplemento mineral (kg)			0,250
Núcleo (kg)	200,000	125,000	
Probiótico ² (kg)	0,200	0,100	0,100
 Subtotal <i>Micro</i>	 200,200	 125,270	 1,000
 Batida Total (kg)	 500,000	 500,000	 500,000

² Protexin[®], adicionado apenas na ração dos tratamentos T1 e T2.

4.4 TRATAMENTOS

Foram estabelecidos quatro tratamentos: T1 - emprego do probiótico, com o desafio (CPCD); T2 - emprego do probiótico, sem o desafio (CPSD); T3 - ausência do probiótico, com o desafio (SPCD); T4 - ausência do probiótico e sem o desafio (SPSD). Os quatro tratamentos foram distribuídos em cada sala, constituindo-se assim duas salas com 12 unidades experimentais (gaiolas suspensas) com três leitões cada, sendo uma delas sem o desafio e outra completamente isolada da primeira, com o desafio.

Os animais foram pesados aos 21, 35, 49 e 63 dias de idade e as faixas de ganho médio de peso diário consideradas foram: dos 21 aos 35 dias (GMPD 35); dos 35 aos 49 dias (GMPD 49); dos 49 aos 63 dias (GMPD 63) e dos 21 aos 63 dias (GMPD Total).

4.5 . DESAFIO E COLHEITA DE FEZES

O desafio foi realizado aos 14 dias após a distribuição nos quatro tratamentos com uma amostra de *E. coli* positiva para as toxinas LT e ST b e para as fímbrias K88 e F18. As colheitas de fezes foram feitas após o desafio, em três períodos (35, 42 e 49 dias de idade dos leitões) para contagem de coliformes fecais, sendo analisadas pelo Laboratório de Sanidade Suína da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, em São Paulo. Os leitões foram inoculados por via

oral com uma concentração de 1×10^8 UFC de uma cepa de *Escherichia coli* positiva para toxinas LT/STb e fímbria F18/K88 (Amostra LSS 164/04).

As amostras de fezes de 11 animais de cada grupo experimental foram submetidas a contagem de *Escherichia coli*, *Enterococcus sp* e *Lactobacillus sp*. Para realização das contagens 1 grama de fezes foi homogeneizado com 9 ml de solução salina estéril e esta suspensão foi submetida a diluição seriada na razão de 1:10 até a diluição 1×10^{-12} . Um volume de 100 μ L de cada diluição foi semeado em ágar McConkey, ágar Sangue com Azida e ágar MRS (Oxoid - São Paulo). Após 24 horas de incubação foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de *E. coli* no ágar McConkey, *Enterococcus sp* no ágar Sangue com Azida e *Lactobacillus sp* no ágar MRS.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados, com arranjo fatorial 2 x 2, sendo um fator o uso de probiótico e o outro fator o desafio. As variáveis analisadas foram ganho de peso médio diário (GMPD) e peso médio (P), acrescido da verificação da consistência das fezes e da contagem de coliformes fecais. O ganho médio de peso diário e peso médio dos leitões foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM. A análise da consistência das fezes foi submetida ao teste Qui-Quadrado e para a contagem de coliformes fecais realizou-se a análise de medidas repetidas no tempo. A consistência das fezes, classificadas

como normal, pastosa, cremosa e líquida, foi observada em todas as gaiolas, durante todo o período experimental (42 dias). Foi utilizado para as análises o programa computacional SAS. O nível de significância foi de 5%.

5.1 HOMOGENEIDADE DA AMOSTRA

Os dados, conforme demonstra a tabela 2, referem-se aos valores médios, desvios-padrão e valores mínimo e máximo do peso aos 21 dias de idade, os quais vem corresponder à homogeneidade dos animais no início dos tratamentos.

Tabela 2 – Valores médios, desvios-padrão, mínimo e máximo no peso aos 21 dias de idade, nos tratamentos

N	T1*	T2*	T3*	T4*
33	7,08 ± 1,38	6,88 ± 0,83	7,64 ± 0,92	6,09 ± 1,22
	5 - 10	6 - 8	6 - 9	4 - 8

T1* – com probiótico e com desafio; T2* – com probiótico e sem desafio; T3* – sem probiótico e com desafio; T4* – sem probiótico e sem desafio.

Esses dados bem refletem a condição homogênea de desempenho no aleitamento, constituindo-se para o modelo experimental proposto, numa amostragem em condições ideais de resposta frente aos objetivos da pesquisa.

5.2 GANHO DE PESO E PESO DOS ANIMAIS

Os valores referentes ao ganho de peso médio não mostraram diferença significativa nos períodos compreendidos entre 35 a 49 dias e de 21 a 63 dias, havendo diferença significativa ($p < 0,05$) no ganho de peso correspondente à faixa etária entre 49 e 63 dias de idade, conforme tabela 3. Observou-se da mesma forma uma variabilidade neste período, evidenciando a ação específica do probiótico

quando verificamos os valores do tratamento com probiótico e com desafio (CPCD), comparado com o tratamento sem probiótico e com desafio (SPCD), principalmente.

Tabela 3 – Médias e desvios-padrão dos ganhos médios de peso diários: GMPD 49 (35 a 49 dias), GMPD 63 (49 a 63 dias), GMPD Total (21 a 63 dias), nos tratamentos

	Com Probiótico		Sem Probiótico		P		
	CD*	SD*	CD*	SD*	P*	D*	I*
GMPD 49	0,552 ± 0,07	0,590 ± 0,05	0,650 ± 0,06	0,555 ± 0,05	NS	NS	0,015
GMPD 63	0,711 ± 0,04	0,733 ± 0,05	0,556 ± 0,26	0,715 ± 0,06	0,1995	0,1628	0,522
GMPD Tot	0,525 ± 0,03	0,550 ± 0,01	0,491 ± 0,08	0,536 ± 0,02	NS	NS	NS

*CD = Com Desafio; *SD = Sem Desafio; *P = Probiótico; *D = Desafio; *I = Interação (P x D); NS = não significativo.

Para melhor ilustrar a significância da interação relacionada ao ganho médio de peso, a [figura 1](#) destaca tal comportamento diferencial, evidenciando a ação do probiótico frente à condição de desafio, observado nas faixas etárias de 35 a 49 dias e que levou a um ganho de peso inferior na faixa etária posterior (49 a 63 dias), correspondendo ao tratamento sem probiótico com desafio.

Figura 1 – Histograma dos ganhos de peso nos tratamentos e faixas etárias estudadas

No peso médio individual, nas faixas etárias consideradas, não foram encontradas diferenças significativas conforme demonstra a tabela 4. No entanto, evidenciou-se valor de desvio padrão maior no peso aos 63 dias de idade, ocorrendo valor numericamente inferior quanto ao peso médio no tratamento sem probiótico com desafio, o que demonstra de certo modo o efeito do desafio no grupo ao qual não foi oferecido o probiótico.

Tabela 4 – Médias e desvios-padrão dos pesos aos 35 dias de idade, peso aos 48 dias e peso aos 63 dias, nos tratamentos

Peso	Com Probiótico		Sem Probiótico		P		
	CD*	SD*	CD	SD	P*	D*	I*
35	11,22 ± 0,76	11,32 ± 0,81	10,59 ± 0,64	11,03 ± 0,74	NS	NS	NS
48	18,97 ± 11,6	19,57 ± 0,98	19,73 ± 0,96	18,81 ± 0,62	NS	NS	NS
63	28,92 ± 1,23	29,82 ± 0,45	27,51 ± 3,03	28,88 ± 1,22	0,1184	0,1286	0,743

*CD = Com Desafio; *SD = Sem Desafio; *P = Probiótico; *D = Desafio; *I = Interação (P x D); NS = não significativo.

5.3 CONSISTÊNCIA FECAL E CONTAGEM DE COLIFORMES

Quanto aos valores do exame de consistência fecal, notou-se diferenças significativas nos percentuais de fezes cremosas e normais, entre os tratamentos T1 (com probiótico com desafio) e T3 (sem probiótico com desafio), que podem ser visualizados na tabela 5 (6,42% vs.19,74% e 51,83% vs. 43,42%, respectivamente).

Tabela 5 – Valores percentuais dos tipos de consistência das fezes, nos tratamentos

Tratamento	Consistência Fecal				P
	Normal	Pastosa	Cremosa	Líquida	
T1*	51,83 (113)	38,99 (85)	6,42 (14)	2,75 (6)	0,0004
T3*	43,42 (99)	35,53 (81)	19,74 (45)	1,32 (3)	

T1* - com probiótico com desafio e T3* - sem probiótico com desafio.

Percentuais que não demonstraram significância foram evidenciados na consistência cremosa e normal das fezes, correspondentes aos tratamentos T2 (com probiótico sem desafio) e T4 (sem probiótico sem desafio), respectivamente, através dos valores 5,26% vs. 8,1% e 71,29% vs. 66,67%, conforme [tabela 6](#).

Tabela 6 – Valores percentuais dos tipos de consistência das fezes, nos tratamentos

Tratamento	Consistência Fecal				P
	Normal	Pastosa	Cremosa	Líquida	
T2*	71,29 (149)	22,97 (48)	5,26 (11)	0,48 (1)	0,4567
T4*	66,67 (140)	23,81 (50)	8,10 (17)	1,43 (3)	

T2* - com probiótico sem desafio e T4* - sem probiótico sem desafio.

Quanto aos agentes, considerando a *Escherichia coli*, observou-se pela análise descritiva dos dados uma variação marcante ao longo do tempo verificando-se valor médio superior no terceiro tempo, que correspondeu aos 49 dias do tratamento sem probiótico com desafio ($11,38 \times 10^8$ coliformes) em comparação ao tratamento com probiótico com desafio, que na contagem de coliformes apresentou valor de $1,29 \times 10^8$ coliformes, mostrando a significância que representa o efeito do probiótico na redução dos coliformes. Nos outros tratamentos não foi observada diferença significativa, conforme mostra a [tabela 7](#).

Tabela 7 – Valores médios e desvios-padrão da contagem de coliformes fecais, com base na cepa *E. coli* positiva para toxinas LT e STb e para fímbrias K88 e F18 (contagem na potência de 10^8)

	N	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3
T1*	11	$0,18 \pm 0,40$	$1,01 \pm 2,99$	$1,29 \pm 2,92$
T3*	11	$3,83 \pm 4,90$	$0,01 \pm 0,02$	$11,38 \pm 29,63$

T1* - com probiótico com desafio e T3* - sem probiótico com desafio.

Os estudos envolvendo a utilização de promotores de crescimento na suinocultura, em substituição ao uso de antibióticos, têm mostrado resultados variados na dependência de vários fatores (MILES, 1993) e dentre estes o que mais merece destaque é o fator ligado às condições sanitárias do ambiente, o qual representa, na realidade, um desafio natural para os leitões recém desmamados. Desta maneira, os resultados revelaram-se interessantes principalmente nas condições em que foi desenvolvida a metodologia experimental, na qual evidenciou-se, conforme tabela 5, interação significativa entre probiótico e desafio quanto ao ganho médio de peso compreendido entre a faixa etária de 35 a 49 dias, logo após a ingestão da *Escherichia coli* (cepa desafio).

Indicou nesse período, o ponto de inflexão que caracterizou o início da mudança no comportamento desta variável, conforme bem destaca a figura 1. Essa mudança é ressaltada no impacto causado pelo desafio, pois no ganho de peso compreendido na faixa de 49 a 63 dias, observou-se menor valor para o tratamento T3 (sem probiótico com desafio). Na literatura consultada não foi demonstrado este comportamento, cuja razão poderia estar associada diretamente às condições já referidas, relacionadas ao desafio, representados pelo nível sanitário da granja experimental. Acreditamos ter sido este o fator principal de identificação da modificação observada quanto à faixa de ganho, relacionado à faixa de 35 a 49 dias e bom ganho de peso posterior, ilustrados na figura 1.

Embora não tenha sido constatada diferença significativa no desempenho (ganho médio de peso diário e peso) nas faixas e idades consideradas, a diferença numérica entre o T3 e os demais tratamentos foi de, aproximadamente, 200g/dia/animal. Esse valor tende à significância e esta observação vem sugerir que, em ocasiões de alteração da microflora, quando microrganismos como a *Escherichia*

coli ameaçam a integridade da mucosa intestinal, a ação do probiótico é mais bem evidenciada. Constatações semelhantes foram identificadas em outros estudos (ROJELJ et. al., 2002), nos quais é ressaltada a ação do probiótico principalmente promovendo seu efeito característico de exclusão competitiva frente a outros agentes, resultando na melhor integridade intestinal, maior absorção de nutrientes e melhor desempenho. Resultados semelhantes foram também encontrados por Kyriakis et al. (1999) e, contrários a este estudo, nas averiguações conduzidas por outros autores (COLLINDER et al., 2003). Outros pesquisadores destacaram ações diversas do uso dos probióticos, como melhora em alguns índices de produção (JUNQUEIRA et. al., 2001), redução de episódios de diarreia causados por agentes diversos (TRUJANO; ARELLANO, 2004) e potencial para substituição de alguns antibióticos (AVILA et. al., 1998; CHOCT, 2001; KRITAS; SIMON et al., 2003; MORRISON, 2004).

A tendência à diferença numérica referida nesse estudo (maior variabilidade expressa pelo desvio-padrão no GMPD 63 e pelo peso aos 63 dias do T3, em comparação aos demais tratamentos) reafirma a maior heterogeneidade do lote. Analisando-se em paralelo o parâmetro consistência das fezes, nota-se do mesmo modo, que houve interação significativa em situação de desafio, através dos percentuais de fezes cremosas e normais entre os tratamentos T1 e T3 (6,42 vs. 19,74) e (51,83 vs. 43,42), respectivamente. Comprovou-se então que o probiótico agiu reduzindo o percentual de fezes cremosas, confirmando sua ação protetora da mucosa intestinal, reduzindo a perda de líquido e, conseqüentemente, a diarreia. Estudos têm, de certa forma, também evidenciado esses efeitos (GIARDINI et. al., 2001), justificados pelo mecanismo de exclusão competitiva.

Manifestou-se, portanto, efeito significativo positivo para o tratamento com probiótico. Em contrapartida, o fato de não ter sido observado significância na consistência cremosa e normal, entre T2 e T4 (5,26 vs. 8,10) e (71,29 vs. 66,67), respectivamente, deveu-se à ausência do desafio, tornando menos evidente a ação do probiótico.

Quanto aos agentes, considerando a *E. coli*, observou-se pela análise descritiva dos dados uma variação marcante ao longo do tempo, verificando-se valor médio superior no 3º tempo (49 dias) do T3 ($11,38 \times 10^8$), em comparação ao T1 ($1,29 \times 10^8$). Essa observação vem, mais uma vez, comprovar a ação do probiótico na manutenção da integridade intestinal. É importante constatar a relação dos parâmetros estudados com a ação do probiótico específico utilizado.

A ação benéfica do probiótico utilizado foi evidenciada no ganho médio de peso diário, correspondente à faixa de 49 a 63 dias, em situação de desafio, vindo associada com a menor variabilidade do peso dos leitões aos 63 dias de idade. Aliado ao desempenho, o probiótico reduziu a consistência anormal das fezes, principalmente a cremosa, bem como revelou valor inferior na contagem de *E. coli*, 14 dias após o desafio.

ABE, F.; ISHIBASHI, N.; SHIMAMURA, S. Effect of the administration of Bifidobacteria and Lactic Acid Bacteria to newborn calves and piglets. **J. Dairy Sci.** n. 78, p. 2838-2846, 1995.

ALEXOPOULUS, C.; GEORGOULAKIS, I. E.; TZIVARA, A.; KYRIAKIS, C. S.; GOVARIS, A.; KYRIAKIS, S. C. Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores on the health status, performance and carcass quality of grower and finisher pigs. **J. Vet. Med.** v. 52, p. 306-312, 2004.

ALEXOPOULUS, C.; GEORGOULAKIS, I.E; TZIVARA, A.; KRITAR, S. K.; SIOCHU, A.; KYRIAKIS, S. C. Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores on the health status and performance of sows and their litters. In: IPVS CONGRESS, 18., 2004, Hamburg. **Proceedings...** Hamburg: Int. Pig Vet. Soc., 2004, p. 865.

ALEXOPOULUS, C.; KYRIAKIS, S. C.; BOURTZI-HATZOPOULOU, E.; MILIOTIS, C. C.; TZIKA, E.; POLYZOPOULOU, E. Field evaluation of a probiotic containing *Bacillus toyoi* spores on the health status and performance of sows and their litters. In: IPVS CONGRESS. 17., 2002. Ames. **Proceedings...** Ames: Int. Pig Vet. Soc., 2002, p. 245.

ALNO, J. P.; NORMAND, V.; DELFORGE, J. Impact of a probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae boulardii* on *Clostridium difficile* neonatal diarrhea in piglets. In: IPVS Congress, 18., 2004, Hamburg. **Proceedings...** Hamburg: Int. Pig Vet. Soc., 2004, p. 723.

APGAR, G. A.; KORNEGAY, E. T.; LINDEMANN, M. D.; WOOD, C. M. The effect of feeding various levels of *Bifidobacterium globosum* A on the performance, gastrointestinal measurements and immunity of weanling pigs and on the performance and carcass measurements of grow-finisher pigs. **J. Anim. Sci.** v. 71, p. 2173. 1993.

AVILA, F. A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; QUINTANA, J. L.; BASSO, A.; AMBROSIM, J. A. Utilização de vacina e probiótico no controle de diarréia enterotoxigênica em suínos causada por *Escherichia coli*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 50, n. 5, p. 505-511, 1998.

BENNO, Y. Research and development of probiotics for animal production. **Soil Micro.** v. 55, n. 2, p. 105-111, 2001.

BEST, P. Europa confirma la prohibición de antibióticos. **Industria Porcina**, v. 19, n. 2, p. 5-6, 1999.

BLOMBERG, L.; HENRIKSSON, A.; CONWAY, P. L Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K88 to piglet ileal mucus by *Lactobacillus* sp. **Appl. Env. Micr.**, v. 59, p. 34-39, 1993.

BOMBA, A.; NEMCOVA, R.; GANCARCIKOVA, S.; HERICH, R.; PISTL, J.; REVAJOVA, V.; JONECOVA, Z.; BUGARSKY, A.; LEVKUT, M.; KASTEL, R.; BARAN, M.; LAZAR, G.; HLUCHY, M.; MARSALKOVA, S.; POSIVAK, J. The influence of omega-3 polyunsaturated fatty acids (omega-3 PUFA) on *lactobacilli* adhesion to the intestinal mucosa and on immunity in gnotobiotic piglets. **Berl. Munc. Tiera. Woche**. v. 116, n. 7-8, p. 312-316, 2003.

BRUNO, D. G. **Uso de probióticos em suínos**. 2004. 13 f. Monografia (Curso de Graduação em Medicina Veterinária) – Departamento de Nutrição e Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

BUDIÑO, F. E. L.; THOMAZ, M. C.; KRONKA, R. N.; TUCCI, F. M.; SCANDOLERA, A. J.; FRAGA, A. L.; HUYANATE, R. R. Efeito da adição de probiótico e/ou prebiótico na dieta de leitões desmamados sobre a contagem de coliformes totais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ABRAVES, 11., 2003, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Ass. Bras. Vets. Espec. Suíno, 2003, p.311.

CHO, K. H.; LEE, U. T.; YANG, C. K.; YU, I. W.; KIM, Y. S.; YOON, Y. D. The effect of *Lactobacillus casei* (TSC-66) for growth promotion in piglets. **Kor. J. Vet. Pub. Healt.** v. 16, n. 1, p. 49, 1992.

CHOCT, M. Alternatives to in-feed antibiotics in monogastric animal industry. **ASA Tech. Bull.**, v. 30, p. 6, 2001.

COLLINDER, E.; CARDONA, M. E.; BERGE, G. N.; NORIN, E.; STERN, S.; MIDTVEDT, T. Influence of zinc bacitracin and *Bacillus licheniformis* on microbial intestinal functions in weaned piglets. **Vet. Res. Commu.** v. 27, n. 7, p. 513-526, 2003.

FEDALTO, L. M.; TKACZ, M.; ADER, L. P. Probiotics in pig food from weaning to 63 days. **Arch. Vet. Sci.** v. 72, p. 1548. 2002.

FEDALTO, L. M.; TKACZ, M.; ADER, L. P.; FLEMMING, J. S.; FRANCO, S. G. Uso de probióticos na alimentação de leitões em fase inicial de crescimento. In: Congresso Brasileiro da ABRAVES, 10., 2001, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Ass. Bras. Vets. Espec. Suíno, 2001, p. 321-322.

FEDALTO, L. M.; TKACZ, M.; WENDT, H.; FRANCO, S. G.; FLEMMING, R. Probiótico *versus* antibiótico na alimentação de suínos nas fases de crescimento e terminação. In: Congresso Brasileiro da ABRAVES, 11., 2003, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Ass. Bras. Vet. Espec. Suíno, 2003, p. 303.

FULLER, R. History and development of probiotics. In: FULLER, R. **Probiotics: the scientific basis**. London: Chapman and Hall, 1992. p. 1-8.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. A review. **J. Appl. Bact.**, n. 66, p. 365-378, 1989.

GARDINER, G. E.; CASEY, P. G.; CASEY, G.; LYNCH, P. B.; LAWLOR, P. G.; HILL, C.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C.; ROSS, R. P. Relative ability of orally administered *Lactobacillus murinus* to predominate and persist in the porcine gastrointestinal tract. **Appl. and Envir. Micro.** v. 70, n. 4, p.1895-1906, 2004.

GIARDINI, A.; SALVADORI, B. B.; ROTTIGNI, C.; VIGEZZI, P.; PEDRON, O.; RENON, P. La probiotica con i batteri lattici. **Rivis. di Avico.** n. 6, p.14-28, 2001.

GUSILS, C.; BUJAZHA, M.; GONZÁLEZ, S. Preliminary studies to design a probiotic for use in swine feed. **Inter.** v. 8, n. 27, p. 409-413, 2002.

HABERER, P.; DU TOIT, M.; DICKS, L. M.; AHRENS, F.; HOLZAPFEL, W. H. Effect of potentially probiotic lactobacilli on faecal enzyme activity in mini pigs on a high-fat, high-cholesterol diet - a preliminary *in vivo* trial. **Intl. J. Food Micro.** v. 87, n. 3, p. 287-291, 2003.

HUAYNATE, R. R.; THOMAZ, M. C.; KRONKA, R. N.; SCANDOLERA, A. J.; FRAGA, A. L.; BUDIÑO, F. E. L.; NADAI, A. Suplementação de probiótico (Bacsol-VTTM) em dietas de suínos dos 23 aos 68 dias de idade. In: Congresso Brasileiro da ABRAVES, 11., 2003, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Ass. Bras. Vets. Espec. Suíno, 2003. p. 305.

JENSEN, B. B. The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. **J. Anim. Feed Sci.** v. 7, p. 45, 1998.

JIANG, P.; LUO, A. P.; LIU, Z. Y.; XIAO, X. L.; ZHOU, B. J.; XU, L. R. A protein-rich probiotic (Microbe FA9102) in feeding trials of piglets. In: IPVS CONGRESS, 17., 2002, Ames. **Proceedings...** Ames: Int. Pig Vet. Soc, 2002. p. 451.

JUNQUEIRA, O. M.; RODRIGUES, E. A.; BARBALHO, R. L. C.; PORTELA, G.; MORETTI, A. S.; LOPES, E. L. O efeito do uso de antibióticos ou probiótico em rações sobre o desempenho de suínos na fase inicial do crescimento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ABRAVES, 10., 2001, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Ass. Bras. Vets. Espec. Suíno, 2001, p. 317-318.

KIERS, J. L.; MEIJER, J. C.; NOUT, M. J. R.; ROUMBOUTS, F. M.; NABUURS, M. J. A.; VAN DER MEULEN, J. Effect of fermented soy beans on diarrhea and feed efficiency in weaned piglets. **J. Appl. Micro.** v. 95, p. 545-552, 2003.

KORNEGAY, E.T. Effect of dosing or feeding *Lactobacillus acidophilus* on blood cholesterol levels and growth rate of weanling and growing pigs. **VA Polyt. Inst. State Univ. Anim. Sci.** v. 73, p. 14. 1986.

KOS, B.; SUSKOVIC, J.; VUKOVIC, S.; SIMPRAGA, M.; FRECE, J.; MATOSIC, S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M 92. **J. Appl. Micro.** v. 94, n. 6, p. 981-987, 2003.

KRAUSE, D. O.; EASTER, B. A.; WHITE, B. A.; MACKIE, R. I. Effect of weaning diet on the ecology of adherent *lactobacilli* in the gastrointestinal tract of the pig. **J. Anim. Sci.** v. 73, p. 2347. 1995.

KRITAS, S. K.; MORRISON, R. B. Can probiotics substitute for subtherapeutic antibiotics? A field evaluation in a large pig nursery. In: IPVS CONGRESS, 18., 2004, Hamburg. **Proceedings...** Hamburg: Int. Pig Vet. Soc., 2004, p.739.

KYRIAKIS, S. C.; TSILOYIANNIS, V. K.; VLEMMAS, J.; SARRIS, K.; TSIAS, A. C.; ALEXOPOULOS, C.; JANSEGGERS, L. The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhea syndrome of piglets. **Greec. Res. Vet. Sci.** v. 67, n. 3, p. 223-228, 1999.

MELIN, L.; WALLGREN, P. Aspects on feed related prophylactic measures aiming to prevent post weaning diarrhea in pigs. **Acta. Vet. Scand.** v. 43, n. 4, p. 231-245, 2002.

MILES, R. D. Manipulation of the microflora of the gastrointestinal tract: natural ways to prevent colonization by pathogens. In: LYONS, T. P. (Ed.). **Biotechnology in the feed industry**: proceedings of Alltech's Ninth Annual Symposium. Nicholasville: Alltech Technical, 1993. p.133-150.

PETTIGREW, J. E.; KUSINA, J. F.; MIGUEL, J. C. Promoting health through the diet. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE SUINOCULTURA, 2., 2004, Foz do Iguaçu. **Anais...** Campinas: Ed. Animalworld, 2004, p. 241-248.

PIG INTERNATIONAL Magazine (Holand). **Early with probiotics**. v. 33, n.10, p. 27, 2003.

PRADAL-ROA, P.; VELAZQUEZ-MADRAZO, O. Colonization of the digestive tract of Landrace x Large White pigs by probiotic *Saccharomyces cerevisiae*. In: IPVS Congress, 18., 2004, Hamburg. **Proceedings...** Hamburg: Int. Pig Vet. Soc., 2004, p. 728.

REID, G.; FRIENDSHIP, R. Alternatives to antibiotic use: probiotics for the gut. **Anim. Biote.**, v. 13, n. 1, p. 97-112, 2002.

ROGELJ, I.; BOGOVIC MATIJASIC, B.; CANZEK MAJHENIC, A.; STOJKOVIC, S. The survival and persistence of *Lactobacillus acidophilus* LF221 in different ecosystems. **Int. J. Food Micro.** v. 1-2, n. 76, p. 83-91, 2002.

SAKATA, T.; KOJIMA, T.; FUJIEDA, M.; TAKAHASHI, M.; MICHIBATA, T. Influences of probiotic bacteria on organic acid production by pig cecal bacteria *in vitro*. **Proc. Nutr. Soc.** v. 62, n. 1, p. 73-80, 2003.

SIMON, O.; VAHJEN, W.; CHAREK, L. Microorganisms as feed additives – Probiotics. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DIGESTIVE PHYSIOLOGY IN PIGS, 9., 2003, Canada. **Proceedings...** v. 1, p. 295-318.

SPENCER, R. J.; CHESSON, A. The effect of *Lactobacillus sp* on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes. **J. Appl. Bacte.** v. 77, n. 2, p. 215-220, 1994.

TIZARD, I. **Introdução à imunologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Livraria Roca. 1985. 329 p.

TRUJANO, M.; ARELLANO, P. Use of *Saccharomyces cerevisiae* to control *Isospora suis* in piglets. In: IPVS CONGRESS, 18., 2004, Hamburg. **Proceedings...** Hamburg: Int. Pig Vet. Soc., 2004, p.729.

VAN WESEL, A. A. M.; PERDOK, H. B.; LANGHOUT, D. J. Phasing out anti-microbial growth promoters. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE SUINOCULTURA, 2., 2004, Foz do Iguaçu. **Anais...** Campinas: Ed. Animalworld, 2004, p. 141-144.

VERSTEGEN, M. W.; WILLIAMS, B. A. Alternatives to the use of antibiotics as growth promoters for monogastric animals. **Anim. Biote.** v. 13, n. 1, p. 113-127, 2002.

WENK, C. Growth promoter alternatives after the ban of the antibiotics. **Pig News and Info.** v. 24, n. 1, p. 11-16. 2003.

ZANI, J. L.; CRUZ, F. W. das; SANTOS, A. F. dos ; GIL-TURNES, C. Effect of probiotic CenBiot on the control of diarrhea and feed efficiency in pigs. **J. Appl. Micr.** v. 84, n. 1, p. 86-71, 1998.