

## RELACIÓN ENTRE LA MICROBIÓTICA INTESTINAL, EL PIENSO Y LA INCIDENCIA DE DIARREAS, Y SU INFLUENCIA SOBRE LA SALUD DEL LECHÓN TRAS EL DESTETE

J.R. Pluske, D.E. Hopwood<sup>1</sup> y D.J. Hampson

School of Veterinary and Biomedical Sciences, Murdoch University, Murdoch, Australia

<sup>1</sup>Animal Resources Centre, Murdoch Drive, Murdoch, Western Australia 6150

### 1.- INTRODUCCIÓN

Al nacer los lechones quedan expuestos a los microorganismos del ambiente que les rodea. La ingestión en este momento de heces maternas introduce bacterias que colonizan su tracto digestivo. Estas bacterias buscan el nicho más adecuado donde compiten e interaccionan entre sí, constituyendo finalmente una población relativamente estable y compleja que representa la microbiota intestinal normal. Tras la colonización inicial, la microbiota intestinal permanece relativamente estable excepto cuando se producen cambios dietéticos o ambientales importantes, tal como sucede después del destete (Radecki y Yokoyama, 1991; Conway, 1994; Jensen, 1998). Generalmente, los cerdos poseen un número relativamente elevado de bacterias tanto en el estómago como en el intestino delgado distal en comparación con otras especies. Por este motivo, se producen fermentaciones microbianas tanto en el estómago como en el intestino delgado, especialmente en el íleon donde la velocidad de tránsito de la digesta se reduce y el número de bacterias es elevado (Jensen, 1998). Cuando el lechón está mamando las bacterias dominantes en el estómago e intestino delgado suelen ser lactobacilos y estreptococos, estando ambas bien adaptadas a utilizar el sustrato lácteo disponible. La microbiota que se desarrolla en el intestino grueso poco después del nacimiento está constituida por una extensa y variada selección de bacterias mayoritariamente anaerobias estrictas, incluyendo las especies *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium* y *Clostridium* (Radecki y Yokoyama, 1991). La actividad metabólica y la presencia física de esta compleja y estable población microbiana provee al animal de una resistencia a la colonización por otras bacterias que transiten por allí, incluyendo especies potencialmente patógenas (Nurmi y Rantala, 1973).

Tras el destete, y en particular si este se realiza bruscamente, se produce un periodo breve de ayuno y el posterior consumo de una nueva ración sólida resulta en una alteración de la disponibilidad del sustrato específico para los microorganismos en todos los segmentos del tracto digestivo. La cantidad y el tipo de sustrato disponible en las diferentes partes dependen del tipo y la cantidad de alimento ingerido después del destete como de la capacidad funcional relativa del tracto digestivo del lechón tras el mismo. El destete brusco induce cambios importantes en la estructura intestinal, que conllevan una interrupción de su capacidad funcional, cuya recuperación total, eficiente y apropiada puede llevar varias semanas (Hampson, 1986; van Beers-Schreurs, 1996; Pluske et al., 1997). Estas alteraciones intestinales también se reflejan en cambios en la cantidad, composición y complejidad de la microbiota intestinal. Jensen (1998) cuantificó los cambios que ocurren en las poblaciones bacterianas a lo largo del intestino de lechones una vez destetados a los 28 días de vida. En el intestino delgado, los lactobacilos, previamente dominantes, redujeron su número durante la primera semana post destete, mientras que el número total de bacterias y la proporción de coliformes, en especial de *Escherichia coli*, aumentaron. Inmediatamente tras el destete, la mayor parte de las bacterias cultivables procedentes del lumen del intestino grueso son gram negativas. En el estudio de Jensen (1998), la actividad microbiana en el intestino grueso no aumentó significativamente hasta 20 días después del destete, mientras que en el intestino delgado la población microbiana únicamente tardó una semana en establecerse y alcanzar la máxima fermentación. Transcurrido este periodo de cambios de la microbiota intestinal, se produce una reestabilización de la misma.

Una revisión de la microbiota intestinal del cerdo más detallada, siguiendo las técnicas tradicionales de cultivo y las modernas metodologías moleculares para su detección e identificación, puede encontrarla en los artículos de Conway (1994), Stewart (1997), Mackie et al. (1999), Jensen (2001), Gaskins (2001), Leser et al. (2002), y Pluske et al. (2002). Entre éstos, hay pocos estudios que se hayan centrado en los cambios de la microflora de cerdos sanos justo tras el destete, debido que es un proceso dinámico y variable que es difícil de monitorizar sin la utilización de un número elevado de cerdos sacrificados secuencialmente para obtener las muestras intestinales. Por ejemplo, en cerdos destetados a diferentes edades se puede observar diferentes efectos sobre la microbiota (Franklin et al., 2002). El principal mensaje de esta introducción es que tanto la composición como la estabilidad de esta microbiota experimentan una alteración en el periodo inmediatamente posterior al destete, lo que deja al lechón más susceptible a una proliferación de bacterias patógenas y potencialmente causantes de enfermedad.

## **2.- PRINCIPALES ENFERMEDADES DIGESTIVAS AL DESTETE**

Las enfermedades del tracto gastrointestinal en lechones recién destetados acaban en diarrea de una manera o de otra. Estas enfermedades pueden estar asociadas con la colonización y proliferación de bacterias, virus o parásitos intestinales, o con un desequilibrio nutricional causante de irritación y/o con un incremento de la presión osmótica luminal. La diarrea tiene lugar a causa de la inflamación del tracto intestinal, o

debido a la interrupción de los procesos de absorción y secreción de las células que recubren el epitelio del tracto digestivo (Liebler-Tenorio et al., 1999), o también a desórdenes de la motilidad intestinal. La diarrea se manifiesta como un aumento del contenido en agua de las heces, y/o como un incremento diario de la deposición de heces. La diarrea se hace visualmente reconocible cuando el contenido en agua de las heces supera alrededor del 80%. La diarrea que está causada por la acción de enterotoxinas bacterianas en el intestino delgado es alcalina y acuosa (ej. diarrea “secretora” por *Escherichia coli*), mientras que aquella asociada con daño y/o pérdida de funcionalidad del epitelio y de su parte más superficial tiende a ser ácida y voluminosa (ej. diarrea “osmótica” por rotavirus o *Escherichia coli* enteropatógena). Cuando el lugar de la infección se encuentra en el intestino grueso, en las heces aparece frecuentemente mucus, y si hay daño en el tejido entonces puede aparecer sangre (ej. disentería porcina). Una hemorragia procedente de un segmento anterior normalmente resulta en heces oscuras como el alquitrán (ej. tras una úlcera gástrica).

Los virus no son una causa de mortalidad importante inmediatamente después del destete. Los rotavirus (diarrea por rotavirus) y coronavirus (gastroenteritis transmisible, diarrea epidémica porcina) pueden proliferar en el intestino delgado tras el destete, pero son un problema más habitual en lechones lactantes más jóvenes (Fu y Hampson, 1987; Will et al., 1994). Cuando éstos aparecen tras el destete su acción podría ser la de predisponer o exacerbar otros problemas, más que ser la causa inicial de la diarrea (Hampson et al., 1985; Cox et al., 1988). La peste porcina puede causar lesiones intestinales graves y diarrea, pero también manifestaciones sistémicas, y la enfermedad no está centrada en los lechones recién destetados. La infestación con el parásito del intestino grueso *Trichuris suis* puede producir diarrea mucoide, y tiene lugar típicamente cuando los lechones son destetados sobre un suelo sucio, si bien, esta enfermedad no se observa normalmente hasta más tarde en el periodo post destete. Por otra parte, la infección con coccidios normalmente ocurre durante la lactación, donde causa una diarrea blanca.

Las bacterias que se han asociado con enfermedades diarreicas tras el destete incluyen *Escherichia coli* (colibacilosis post destete/ diarrea post destete, enfermedad de los edemas) y especies del género *Salmonella*, en particular *S. enterica* serovar Typhimurium, y serovares similares (salmonelosis). Los cerdos normalmente acaban infectados con salmonela tras consumir materias primas proteicas contaminadas, o tras estar en contacto con heces de roedores o pájaros silvestres. La salmonelosis es más frecuente en cerdos destetados de más edad, como también lo es la infección por la espiroqueta intestinal *Brachyspira hiodysenteriae* (disentería porcina: DP), y *Brachyspira pilosicoli* (espiroquetosis intestinal porcina: EIP), y con la bacteria intracelular *Lawsonia intracellularis* (enteropatía proliferativa porcina: EPP). En particular la EPP y la EIP son causas comunes de diarrea generalmente leve pero crónica, mientras que la salmonelosis y la DP pueden causar una enfermedad grave, con disentería (sangre en las heces), síntomas sistémicos, y a veces la muerte. De todas estas enfermedades, la colibacilosis post destete causada por una *Escherichia coli* enterotoxigénica es la más común y extendida en el inmediato periodo post destete, y es el principal objeto de este capítulo.

### 3.- COLIBACILOSIS POST DESTETE (CPD)

La colibacilosis post destete (CPD) es la principal causa de morbilidad y mortalidad en este periodo en todo el mundo, lo que resulta en grandes pérdidas económicas (Cutler, 1981; Cutler y Gardner, 1988). El intestino delgado anterior es el principal foco de infección, y es el lugar donde se producen las pérdidas de líquido y electrolitos en el lumen intestinal, aunque la bacteria está presente a lo largo de todo el intestino. Para *E. Coli* (una bacteria coliforme) es común aparecer en gran número en las heces de cerdos en la primera semana tras el destete (Mathew et al, 1993). Esto puede suceder tanto en cerdos sanos como con diarrea, aunque el número y la proporción de cepas de *E. Coli* potencialmente patógenas en las heces de cerdos con diarrea es mayor (Kenworthy y Crabb, 1963; Svendsen et al, 1977; Hampson et al., 1985; Hinton et al, 1985; Gyles, 1993). La mayoría de las cepas de *Escherichia coli* son inofensivas, pero aquéllas que provocan diarrea tras el destete se suelen distinguir habitualmente por su capacidad para lisar glóbulos rojos, y son conocidas como *Escherichia coli* beta-hemolíticos. Esta actividad hemolítica no se considera como un factor de virulencia en si mismo. Los cerdos que padecen diarrea post destete albergan en el intestino delgado una cantidad masiva (hasta  $10^9$  unidades formadoras de colonias [UFC] e incluso más) de *Escherichia coli* hemolíticos, mientras que el cambio en las poblaciones de otras bacterias del tracto digestivo es mínimo (Smith y Jones, 1963). Aunque la digesta fluye con relativa rapidez a través del intestino delgado, la *E. Coli* patógena posee estructuras superficiales, denominadas fimbrias o pili, que se fijan a los enterocitos de la superficie de las vellosidades intestinales, o al mucus que recubre a las vellosidades. La fijación evita que la bacteria sea arrastrada a través del intestino grueso, donde tendría una mayor competencia por la supervivencia. Las adhesinas más comunes que tienen las cepas de *E. Coli* que causan CPD se conocen como K88 (o F4), y F18 (inicialmente F107), y ambas poseen varios variantes antigénicos (Francis, 2002).

Después de fijarse y colonizar el intestino delgado, la *E. Coli* hemolítica enterotoxigénica (ETEC) provoca una diarrea hipersecretora a través de la liberación de enterotoxinas específicas. La secreción de iones cloruro, sodio, bicarbonato y agua al lumen está inducido por las acciones de una toxina termolábil (TL) que se une irreversiblemente a las células de la mucosa y activa el sistema de la adenil ciclasa-cíclica AMP (Argenzio, 1992). Una segunda toxina termoestable (TE, variantes TSa y TSb) inhibe la absorción de los iones sodio y cloruro desde el lumen hasta las células epiteliales a través del sistema de la guanil ciclasa-cíclica GMP (Gyles, 1993). El exceso de líquido y electrolitos resultantes en el lumen intestinal puede ser reabsorbido in el intestino grueso únicamente si el animal no está enfermo, posee una microbiota bien desarrollada, y su capacidad física no está saturada (Argenzio, 1992). Otros determinantes virulentos menos comunes que poseen ciertas cepas de *Escherichia coli* implicadas en algunos casos de CPD incluyen la producción de enterotoxina 1, termolábil y producida por *Escherichia coli* enteroagregada, cuya función permanece sin aclarar (Choi et al., 2001), y la presencia de los genes de fijación y destrucción (Eae) que codifican intiminas en *Escherichia coli* enteropatógenas (Higgins et al, 1997). Estas proteínas de las capas externas de la membrana están implicadas en la fijación de las bacterias a los enterocitos del colon, que

precede a la destrucción de sus microvilli y al reordenamiento del citoesqueleto del enterocito (Nataro y Kaper, 1998). Otras cepas de *E. Coli* que proliferan en el tracto intestinal de lechones destetados producen una verotoxina que está implicada en la aparición de la enfermedad de los edemas, que se caracteriza por síntomas predominantemente neurológicos, acompañado a veces por diarrea (Osek, 1999).

La asociación entre la proliferación excesiva de ETEC hemolítica en el intestino de lechones recién destetados y la aparición de diarrea se observó por primera vez en 1960 y ha sido confirmada con posterioridad en numerosos estudios (Richards y Fraser, 1961; Palmer y Hulland, 1965; Hill y Kenworthy, 1970; Armstrong y Cline, 1976; Okai et al., 1976; Bertschinger y Eggenberger, 1978; Thomlinson y Lawrence, 1981; Ball y Aherne, 1982; Hampson, 1983; Cooke, 1985). La enfermedad se denominó colibacilosis post destete (CPD) y se caracteriza por diarrea, deshidratación, pérdida de peso, acidosis metabólica, cambios en el pelaje y temblores (Hampson, 1994; MacKinnon, 1998; Bertschinger, 1999). En casos graves, y en ausencia de un tratamiento específico con antibióticos y/o soluciones de electrolitos, el animal muere.

La inmunización contra una cepa de *Escherichia coli* patógena no protege frente a otras, y las granjas pueden padecer sucesivas infecciones. En la actualidad, no hay vacunas efectivas disponibles para controlar la enfermedad, y muchas cepas muestran resistencia a múltiples antibióticos (Amezcuca et al., 2002). Las infecciones duran entre 4 y 14 días, y se contagian principalmente por vía fecal-oral, pero también por aerosoles (Bertschinger, 1999). Las investigaciones a lo largo del tiempo han mostrado que la mayoría de *E. Coli* asociados con la diarrea post destete son cepas que producen enterotoxinas y hemólisis. Los *E. Coli* hemolíticos que inducen la enfermedad están habitualmente restringidos a un reducido número de serotipos, en particular, O8, O9, O71, O115, O138, O139, O141, O147, O149; O157 y NT (Hampson, 1994; MacKinnon, 1998).

### **3.1.- Factores que favorecen el desarrollo de colibacilosis post destete**

#### *3.1.1.- La función del intestino delgado*

Aunque la ETEC hemolítica ha sido identificada como el agente infeccioso primario en la CPD, hay numerosas evidencias que sugieren que se necesitan otros factores para que esta enfermedad prospere (Madec et al., 2000). El destete es un factor esencial que precipita el desarrollo de la colibacilosis post destete, independientemente de la edad a la que se realice. Los factores implicados con el destete crean un ambiente adecuado para la proliferación de ETEC y de otros patógenos en el intestino delgado. Un tiempo de tránsito intestinal más lento y el éxtasis intestinal que ocurre inmediatamente tras el destete ofrecen a las bacterias la oportunidad de fijarse al epitelio intestinal y con tiempo suficiente para reproducirse. Las partículas de alimento sin digerir en el lumen del intestino delgado aportan el sustrato para el crecimiento bacteriano, y ya no existe ninguna inmunidad pasiva procedente de la leche materna que sirva de protección. La incapacidad de termorregularse adecuadamente termina frecuentemente en estrés por frío, lo que altera

la motilidad intestinal y se cree que es un factor predisponente importante en la patogénesis de la CPD (Wathes et al., 1989).

El estrés social debido a la mezcla, lucha y aglomeración de los animales provoca una liberación de cortisol en sangre, que deprime la respuesta inmunitaria contra la infección bacteriana. El traslado a un nuevo corral causa un aumento de la exposición antigénica a microbios que residen en las heces frescas o secas. La presencia en el ambiente de otros organismos como rotavirus incrementa el riesgo de aparición de la enfermedad y su gravedad (Lecce, 1983; Tzipori et al., 1983), mientras que una higiene deficiente del corral también supone una mayor carga antigénica, como resultado del ciclo fecal-oral (Madec et al., 1998).

Los cambios morfológicos y la reducción de la capacidad funcional dentro del intestino delgado asociados con el destete pueden contribuir al desarrollo de la CPD. La atrofia de los villi del intestino delgado y la menor capacidad del mismo para absorber agua y electrolitos al destete se magnifica cuando el intestino delgado es infectado con *Escherichia coli* hemolítica, y por ello contribuye a un agravamiento de la diarrea (Nabuurs, 1998). El papel que ejerce la atrofia de los villi como predisponente de CPD está sin aclarar, sin embargo. Así, en cerdos a los que se les ha inducido experimentalmente una atrofia de los villi se ha observado una menor capacidad de *E. Coli* enterotoxigénica para colonizar (Cox et al., 1988). La falta de adaptación al nuevo pienso en el destete provoca una anorexia seguida de un sobreconsumo, lo que destruye por falta de nutrientes los enterocitos que recubren el intestino delgado, y entonces se produce la saturación de los procesos digestivos. El sobreconsumo puntual de determinados animales se ha relacionado con un incremento de la incidencia de CPD en los mismos (Hampson y Smith, 1986).

En el intestino delgado, las fimbrias de *E. Coli* se fijan a glicoproteínas receptoras que se expresan en la superficie de las células de los villi intestinales. Los receptores F4 y F18 no se expresan en animales recién nacidos, pero se desarrollan posteriormente. Aunque los receptores para F4 y F18 están todavía presentes en cerdos adultos, la susceptibilidad a la infección con ETEC disminuye con la edad (Erickson et al., 1992). Algunos cerdos son resistentes a la CPD debido a que no expresan ningún receptor, y algunos tienen receptores que poseen una adherencia débil (Chandler et al., 1994). La presencia de receptores varía entre estirpes de cerdos (Baker et al., 1997), así como entre hermanos. En definitiva, esta distribución tiene una gran influencia en si la CPD tendrá o no lugar (Madec et al., 2000).

### 3.1.2.- La función del intestino grueso

Cada vez hay más evidencias de que el intestino grueso inmaduro del lechón destetado influye sobre la patogenia de la diarrea infecciosa nutricional (Bolduan et al., 1988; van Beers-Schreurs et al., 1998<sup>a</sup>; van Beers-Schreurs et al., 1998<sup>b</sup>). El intestino grueso frecuentemente es visto como un órgano “salvador”. Las poblaciones microbianas que residen ahí degradan y utilizan el alimento no digerido y las células desprendidas, mientras que las células epiteliales reabsorben cantidades significativas de agua y

electrolitos junto con ácidos grasos volátiles (AGV) producidos en la fermentación microbiana.

El lechón de tres semanas puede absorber una cantidad considerable de agua y electrolitos en su intestino grueso (Hamilton y Roe, 1977) incluso en situaciones de atrofia de los villi del intestino delgado (Argenzio et al., 1984). La capacidad intestinal para reabsorber agua y AGV es similar en lechones destetados o no, pero la capacidad de absorción alcanza un máximo aproximadamente a las dos semanas tras el destete. En los primeros días después del destete, la absorción de AGV no aumenta la absorción de agua (van Beers-Schreurs et al., 1998a), como ocurre en cerdos adultos (Argenzio, 1992), y estos días son un periodo muy delicado para el lechón. Existe evidencia de que la reducción de la absorción en el intestino grueso durante este periodo puede exacerbar los efectos de las enterotoxinas en el intestino delgado (Nabuurs, 1998). Algunos autores recomiendan suministrar un pienso de destete que incremente las concentraciones de AGV, especialmente butirato, en el intestino grueso para maximizar absorción de las células epiteliales (van Beers-Schreurs et al., 1998b). Esto puede conseguirse mediante la inclusión en el pienso de ingredientes fibrosos. La fibra dietética no es digerida en el intestino delgado, pero posteriormente es fermentada en el intestino grueso produciendo AGV.

### *3.1.3.- La función específica del pienso*

La composición del pienso de destete juega un papel central en la patogénesis de la enfermedad entérica, dado que influye sobre la morfología de la mucosa, la capacidad de digestión y absorción, la motilidad intestinal y el tiempo de tránsito, y el crecimiento selectivo de la microbiota y los productos resultantes de la fermentación. El que los cambios en la microbiota al destete culminen o no en enfermedad depende en la naturaleza, número y actividad de las bacterias específicas presentes. En particular, la expresión de CPD depende de la existencia de una serie de factores dietéticos y otros factores predisponentes, con un creciente número de factores de riesgo que actuando coordinadamente pueden incrementar el riesgo de padecer la enfermedad (Madec et al., 1998).

Hace tiempo que se conoce que es posible influir sobre el desarrollo de la CPD cambiando la composición del pienso de destete (ver la revisión de Hampson, 1987). Algunos piensos altamente digestibles y basados en productos lácteos se han asociado con una disminución de la evidencia clínica de diarrea post destete, aunque la presencia de *E. Coli* no siempre se ha controlado (English, 1981). A la inversa, existen evidencias de que piensos con un contenido elevado en fibra proveen cierta protección frente a esta enfermedad (Bertschinger y Eggenberger, 1978; Bolduan et al., 1988; Aumaitre et al., 1995). Además, ingredientes de algunos piensos, como la soja, son considerados dañinos en piensos de destete para lechones al provocar daños en la mucosa intestinal (Li et al., 1990; Li et al., 1991), y acumulación de líquido intestinal (Nabuurs et al., 1996).

Se ha sugerido que niveles elevados de proteína en el pienso pueden predisponer a la CPD debido a su elevada capacidad para fijar ácido en el estómago, lo que le permite a la ETEC escapar del medio menos ácido del estómago y colonizar el intestino delgado (Prohaszka y Baron, 1980). La fuente de proteína utilizada en la formulación también ha sido estudiada en relación con la CPD. Piensos que contienen proteínas complejas o un gran número de proteínas diferentes pueden incrementar la gravedad de la diarrea en comparación con piensos con pocas fuentes de proteína (Okai et al., 1976; Ball y Aherne, 1982; Etheridge et al., 1984). El exceso de proteína en el intestino es degradado por los microbios y puede contribuir a una diarrea proteolítica independientemente de la presencia de *Escherichia coli*, al producirse subproductos de las aminas dañinos que irritan la mucosa e inducen diarrea (Nollet et al., 1999). Sin embargo, la proteína plasmática es popular en algunos países, particularmente en EE.UU., como un aditivo añadido en spray a los piensos de destete, observándose una mejora marcada en el crecimiento y vigor de los lechones tras el destete (Ermer et al., 1994).

#### *3.1.4.- La función específica de los polisacáridos no amiláceos del pienso en la CPD*

Como se ha comentado anteriormente, se ha observado que la fibra dietética influye sobre la fisiología intestinal y la microbiota de los lechones destetados. Recientemente, hemos investigado la influencia del tipo y del nivel de fibra dietética sobre la manifestación de la CPD (McDonald et al., 2000; McDonald, 2001; McDonald et al., 2001; Hopwood et al., 2002), y algunas de las conclusiones de estos trabajos se presentan a continuación.

En estos trabajos, se ofrecieron piensos con diferentes niveles de fibra dietética expresada en términos de polisacáridos no amiláceos (PNA) a lechones recién destetados, se controló el desarrollo natural de la CPD en los lechones infectados experimentalmente con una cepa patógena de ETEC hemolítica monitorizándose el progreso de la enfermedad. En estos experimentos se utilizó como control un pienso altamente digestible, cuyo principal ingrediente fue arroz cocido, debido a su reducido contenido en PNA (< 1% del pienso). En los piensos experimentales se sustituyó el arroz cocido por fuentes de PNA, de tal manera que el nuevo ingrediente constituyera la principal fuente de hidratos de carbono en estos piensos (más de un 50% de inclusión). Los contenidos en proteína y energía de los diferentes piensos se mantuvieron prácticamente sin cambios. Los ingredientes para aportar los PNA se eligieron de acuerdo con el tipo de PNA a estudiar y fueron los siguientes: mezcla de PNA solubles de poca viscosidad, fácilmente fermentables y PNA insolubles de fermentación lenta (piensos basados en trigo molido o extrusionado), PNA solubles de una viscosidad moderada (piensos basados en cebada perlada), y PNA solubles sintéticos de elevada viscosidad que resisten la fermentación en el intestino grueso (pienso basado en caroximetilcelulosa –CMC). Además, también se formuló un pienso basado en arroz hidrolizado para compararlo con la dieta control basada en arroz cocido, y un pienso con cebada perlada a la que se añadió enzimas para estudiar este aditivo podría evitar los efectos adversos inducidos por la presencia de PNA solubles.

En todos los experimentos se utilizaron cerdos Large White x Landrace de una granja libre de patógenos específicos que se destetaron a los 21 d de edad y se transportaron a la granja experimental donde se les asignó un pienso experimental de tal manera que los animales asignados a cada pienso tuvieron el mismo peso medio. Desde el destete hasta el final de cada experimento, se tomaron diariamente muestras de heces mediante hisopos rectales para determinar la presencia de la ETEC hemolítica, y se realizó una estimación de la proporción de ETEC fecal en estas muestras. Los lechones infectados de forma natural con CPD presentaron ETEC del serotipo O149;K91;K88 (enterotoxinas LT, STa y STb). Los animales infectados experimentalmente fueron inoculados oralmente 48-72 horas tras el destete con 5-50 ml de un caldo que contenía de media  $10^{8.5}$  ETEC hemolítico/ml de serotipo O8;K88;K87 (enterotoxinas LT, STb, STab) o con el mismo serotipo observado en los animales infectados de forma natural y que se cultivó a partir de los mismos.

Los lechones infectados experimentalmente con ETEC comenzaron a excretar las bacterias en sus heces en las 24 horas siguientes a la inoculación, y la diarrea acuosa grave que sobrevino poco después estuvo asociada con un denso y casi puro crecimiento de ETEC hemolítico en sus heces. Los lechones que desarrollaron de forma natural la CPD comenzaron a excretar gran densidad de ETEC hemolítico al día siguiente de aparecer la diarrea, normalmente 4-5 días después del destete.

Los conteos de ETEC hemolíticos realizados en muestras fecales pueden reflejar mejor el crecimiento de *Escherichia coli* en el intestino grueso que en el intestino delgado, donde estimulan la diarrea (Armstrong y Cline, 1977; Sarmiento, 1988). Por ello, estos conteos no se tomaron como único indicador de colonización y proliferación de *Escherichia coli* hemolítico. Un método más preciso de determinar el lugar de proliferación fue el conteo de bacterias viables en el contenido intestinal. Los conteos de bacterias en el intestino delgado de lechones infectados experimentalmente varían entre 2,7 y 9,7 UFC/g (log 10) (Smith y Halls, 1968), y conteos similares se obtuvieron en nuestros experimentos. En estos experimentos se recogieron raspaduras del intestino delgado de cerdos sacrificados 7-8 días tras el destete, 3-4 días después del inicio del proceso diarreico. Los conteos de bacterias viables obtenidos en estos experimentos permiten la comparación cuantitativa entre los lechones que recibieron las diferentes fuentes de PNA y ayudaron a profundizar en el efecto que tiene la infección sobre el desarrollo del intestino.

El número de ETEC en el intestino delgado medio y la expresión de la CPD aumentaron al aumentar la concentración de PNA solubles del pienso. Además, todas las fuentes naturales de PNA que exacerbaban la CPD fueron solubles, rápidamente fermentables por las bacterias intestinales, y tendieron a ser de naturaleza viscosa, observándose un mayor número de ETEC con mayores viscosidades. La mayor proliferación de ETEC ocurrió como parte del proceso de infección natural y se precipitó por la presencia en el pienso y en la digesta intestinal del compuesto sintético soluble CMC caracterizado por su elevada viscosidad. Las características diferenciales del pienso que contenía CMC fueron su elevada capacidad de retención de agua, naturaleza altamente viscosa, elevada solubilidad y resistencia a la fermentación intestinal. El incremento de la

proliferación intestinal de ETEC hemolítico en cerdos alimentados con CMC, viscosa y no fermentable, infiere que una fermentabilidad baja (característica del consumo de la dieta basada en arroz) no es una característica que proteja per se. La viscosidad puede tener en sí misma una influencia significativa sobre la compleja interacción entre la microbiota intestinal, el pienso y los procesos entéricos. Este es un concepto bien aceptado en el caso de la avicultura (Choct y Annison, 1992; Langhout, 1998).

El resultado más significativo y consistente de todos los experimentos de infección de CPD fue el reducido nivel de proliferación intestinal de ETEC hemolítica en cerdos alimentados con el pienso de arroz cocido. La mayoría de los cerdos alimentados con arroz cocido tuvieron una mínima colonización con ETEC, aunque algún que otro cerdo mostró valores moderados de esta bacteria en su tracto intestinal. Aunque no es del todo protectora, el pienso con arroz pareció reducir la incidencia de la enfermedad, e inhibió la capacidad de la bacteria para establecerse en el intestino delgado. Las propiedades destacadas del arroz cocido fueron su elevada digestibilidad, reducida capacidad de hincharse, baja viscosidad y carencia de sustratos fermentables (p.ej. fibra dietética). Pienso altamente digestibles como este proveen energía al individuo, generalmente reduciendo tanto el impacto de la enfermedad como la duración de la diarrea. Este es el principio que apoya el uso de soluciones rehidratadoras para tratar la diarrea en humana.

El residuo en el intestino delgado que quedó del pienso con arroz cocido fue pequeño lo que probablemente inhibió el crecimiento de los patógenos en este segmento por carecer de sustrato disponible. El lechón es incapaz de digerir totalmente alimento sólido inmediatamente después del destete, lo que supone la entrada de algún residuo del alimento en el intestino grueso (independientemente del pienso), donde es fermentado. Esta presencia incrementa la osmolaridad del contenido intestinal (Etheridge et al., 1984). La presencia de PNA, o de cualquier sustancia con elevada capacidad de hidratación probablemente exacerbará más este problema. De acuerdo con este principio, el pienso con arroz cocido habría minimizado este fenómeno.

La capacidad de minimizar significativamente el establecimiento de ETEC hemolíticos estuvo limitada al pienso con arroz cocido bajo en fibra. En los últimos años, la investigación en cobayas han identificado una sustancia en el arroz hervido que inhibe uno de los mecanismos por los cuales las enterotoxinas provocan diarrea secretoria (Mathews et al., 1999). Es posible que esta sustancia contribuyese al efecto protector del arroz visto en los experimentos descritos anteriormente. Inesperadamente, la ingestión del pienso con arroz hidrolizado, cuya consistencia era harinosa, no evitó la proliferación de ETEC. Esta falta de protección podría haber sido el resultado de la presencia de un exceso de almidón fácilmente fermentable en el intestino delgado, que actuase como sustrato para el crecimiento microbiano. La adición de enzimas exógenas al pienso con cebada perlada tampoco evitó la colonización, quizás porque aumentó la digestibilidad del pienso y, por tanto, llegó un exceso de sustrato a las bacterias de manera similar a lo que sucedió con el arroz hidrolizado. De acuerdo con la idea de que el sustrato que llega al intestino delgado puede ser importante para regular la población de *Escherichia coli*, los piensos que tienen un contenido elevado de PNA insolubles han demostrado previamente que son capaces de reducir la colonización de *Escherichia coli* hemolítica (Bertschinger y Eggenberger, 1978).

En este caso, la fibra insoluble podría obstaculizar físicamente al sustrato evitando el acceso al mismo de ETEC en el intestino delgado.

Además de lo ya mencionado, todos los cerdos con CPD experimental o natural presentaron un crecimiento corporal reducido, y tuvieron una menor fermentación microbiana en el intestino grueso que sus compañeros sanos. Todos los cerdos infectados alimentados con los piensos que contenían más de un 1% de PNA perdieron peso tras la inoculación. Subjetivamente, los cerdos infectados que ingirieron el pienso con arroz cocido (< 1% PNA) estuvieron más despiertos y tuvieron mejor apetito que los cerdos alimentados con otros piensos, aunque esto podría ser el resultado de que estuvieron sanos mientras que sus compañeros desarrollaron diarrea.

El que un patógeno invasor se establezca y prolifere en el tracto intestinal depende de la velocidad con que se adhiera a la pared intestinal y de la capacidad de suprimir el patógeno de los factores reguladores normales. Estos mecanismos reguladores incluyen la exclusión competitiva (competición por los nutrientes o lugares de fijación) y la producción de metabolitos tóxicos que eliminan directamente a los patógenos o crean condiciones ambientales adversas (Hentges, 1992). Hay cuatro habitats en los que pueden proliferar las bacterias: la superficie de las células epiteliales, dentro de capa de mucus de las criptas intestinales, en el mucus que recubre el epitelio, en el lumen del intestino (Freter, 1974). El mucus puede ser beneficioso o perjudicial para la salud del animal, dependiendo de si es usado como lugar de fijación o de si evita el acceso de las bacterias al epitelio. La capa de mucus que recubre el intestino se engrosa por la presencia de sustancias viscosas en la digesta (como CMC), y la producción de mucus se incrementa cuando aumenta la concentración de fibra en el pienso. Este engrosamiento aumenta la distancia que deben recorrer los nutrientes para ser absorbidos (Blackburn y Johnson, 1981; Blackburn et al., 1984), y provee un lugar de fijación para *Escherichia coli* hemolítica que está repleto de los nutrientes que requiere el crecimiento bacteriano. *Escherichia Coli* posee la habilidad de fijarse a las mucinas, lo que reduciría el tiempo que necesita para establecerse al disminuir la distancia necesaria para acceder a los lugares de fijación. De hecho, un mucus más grueso o más voluminoso puede permitir un establecimiento más rápido porque, en efecto, hay más lugares de fijación disponibles. La fuerza mecánica es el mecanismo bacteriostático primario en el lumen intestinal. Una ralentización en la mezcla permitirá la proliferación bacteriana, y es factible que la presencia de fibra tanto viscosa como no viscosa pueda interferir con el patrón de mezcla y con la velocidad de tránsito.

Curiosamente, en lechones destetados de más edad, la presencia de PNA viscosos fermentables y solubles no fermentables también puede aumentar y acelerar el inicio de la propagación de espiroquetas del intestino grueso (Siba et al., 1996; Pluske et al., 1998; Hampson et al., 2000; Hopwood et al., 2002). Igualmente, el pienso altamente digestible de arroz cocido utilizado en los experimentos de CPD descritos ha sido el pienso más eficiente para reducir o evitar la manifestación de la enfermedad experimental debida a las espiroquetas intestinales. Estas observaciones ponen de manifiesto la necesidad de realizar

más estudios sobre los efectos implícitos de los PNA viscosos que facilitan la colonización y la proliferación de bacterias entéricas patógenas en cerdos.

#### 4.- CONCLUSIONES

Dado que las enfermedades entéricas tienen un origen multifactorial, la prevención debería estar enfocada a reducir el número de factores de riesgo predisponentes presentes (Hampson, 1994; Madec et al, 1998; Bertschinger y Fairbrother, 1999). Principalmente hay tres formas de manipular el desarrollo de la enfermedad entérica que destacan al ser fácilmente puestas en práctica:

1. Optimizar el medio ambiente al destete (social, térmica e higiénicamente).
2. Reducir el impacto del destete sobre el medio ambiente intestinal optimizando el pienso (composición, forma, ingestión o aditivos), y
3. Manipulando el desarrollo y estabilidad de la microbiota intestinal por medio de la utilización de medicamentos o dietas (composición y aditivos antibacterianos específicos).

Para controlar la CPD se recomienda especialmente utilizar piensos que sean fácilmente digestibles y contengan concentraciones bajas de PNA solubles

#### 5.- REFERENCIAS

- AMEZCUA, R., FRIENDSHIP, R.M., DEWEY, C.E., GYLES, C.L. y FAIRBROTHER, J.R. (2002) *Can. J. Vet. Res.* 66: 73-78.
- ARGENZIO, R.A. (1992) En: *Veterinary Gastroenterology*. N. Anderson (Eds.), 2nd ed. Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 163-172.
- ARGENZIO, R.A., MOON, H.W., KEMENY, L.J. y WHIPP, S.C. (1984) *Gastroenterology*. 86: 1501-1509.
- ARMSTRONG, W.D. y CLINE, T.R. (1976) *J. Anim. Sci.* 42: 592-598.
- ARMSTRONG, W.D. y CLINE, T.R. (1977) *J. Anim. Sci.* 45: 1042-1050.
- AUMAITRE, A., PEINIAU, J. y MADEC, F. (1995) *Pig News Info.* 16: 73-79N.
- BAKER, D.R., BILLEY, L.O. y FRANCIS, D.H. (1997) *Vet. Microbiol.* 54: 123-132.
- BALL, R.O. y AHERNE, F.X. (1982) *Can. J. Anim. Sci.* 62: 907-913.
- BERTSCHINGER, H.U. (1999) En: *Diseases of Swine*. B.E. Straw, S. D'Allaire, W. L. Mengeling y D.J. Taylor (Eds.), 8th Edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 441-454.
- BERTSCHINGER, H.U. y EGGENBERGER, E. (1978) *Vet. Microbiol.* 3: 281-290.
- BERTSCHINGER, H.U. y FAIRBROTHER, J.M. (1999) En: *Diseases of Swine*. B.E. Straw, S. D'Allaire, W.L. Mengeling y D.J. Taylor (Eds.). 8th edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 431-433.
- BLACKBURN, N.A. y JOHNSON, I.T. (1981) *Br. J. Nutr.* 46: 239-246.

- BLACKBURN, N.A., REDFERN, J.S., JARJIS, H., HOLGATE, A.M., HANNING, I., SCARPELLO, J.H.B., JOHNSON, I.T. y READ, N.W. (1984) *Clin. Sci.* 66: 329-336.
- BOLDUAN, G., JUNG, H., SCHNABEL, E. y SCHNEIDER, R. (1988) *Pig News Info.* 9: 381-385.
- CHANDLER, D.S., MYNOTT, T.L., LUKE, R. y CRAVEN, J.A. (1994) *Vet. Microbiol.* 38: 203-215.
- CHOCT, M. y ANNISON, G. (1992) *Br. Poult. Sci.* 33: 821-834.
- CHOI, C., CHO, W.S., CHUNG, H.K., JUNG, T., KIM, J. y CHAE, C. (2001) *Vet. Microbiol.* 81: 65-71.
- CONWAY, P.L. (1994) En: *Proceedings of the VIth International Symposium on Digestive Physiology in Pigs Proceedings*. W.B. Souffrant y H. Hagemester (Eds.). EAAP Publication, Ban Doberan, Germany. pp. 231-240.
- COOKE, E.M. (1985) *J. Hyg. (Lond)* 95: 523-530.
- COX, E., COOLS, V., THOONEN, H., HOORENS, J. y HOUVENAGHEL, A. (1988) *Vet. Microbiol.* 17: 159-169.
- CUTLER, R. (1981) En: *Pigs*. T.G. Hungerford (Ed.). The Post-Graduate Committee in Veterinary Science, Bendigo, Victoria, Australia. pp. 49-51.
- CUTLER, R. y GARDNER, I. (1988) *A Blue Print for Pig Health Research*. Australian Pig Research Council, Canberra, Australia.
- ENGLISH, P.R. (1981) *Proc. Pig Vet. Soc.* 7: 29-37.
- ERICKSON, A.K., WILLGOHS, J.A., MCFARLAND, S.Y., BENFIELD, D.A. y FRANCIS, D.H. (1992) *Infect. Immun.* 60: 983-988.
- ERMER, P.M., MILLER, P.S. y LEWIS, A.J. (1994) *J. Anim. Sci.* 72: 1548-1554
- ETHERIDGE, R.D., SEERLEY, R.W. y HUBER, T.L. (1984) *J. Anim. Sci.* 58: 1403-1411.
- FRANCIS, D.H. (2002) *J. Swine Health Prod.* 10: 171-175.
- FRANKLIN, M.A., MATHEW, A.G., VICKERS, J.R. y CLIFT, R.A. (2002) *J. Anim. Sci.* 80: 2904-2910.
- FRETER, R. (1974) *Am. J. Clin. Nutr.* 27: 1409-1416.
- FU, Z.F. y HAMPSON, D.J. (1987) *Res. Vet. Sci.* 43: 297-300.
- GASKINS, H.R. (2001) En: *Swine Nutrition*. A.J Lewis y L.L. Southern (Eds.). 2<sup>nd</sup> ed. CRC Press LLC, Florida, pp. 585-608.
- GYLES, C.L. (1993) En: *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. C.L Gyles y C. O. Thoen (Eds.). Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 164-187.
- HAMBRECHT, E. (1998) *Effect of non-starch polysaccharides on performance, incidence of diarrhoea and gut growth in weaned pigs*. Masters thesis, Hohenheim University, Stuttgart-Hohenheim, Germany.
- HAMILTON, D.L. y ROE, W.E. (1977) *Can. J. Comp. Med.* 41: 241-250.
- HAMPSON, D.J. (1983) *Post-weaning changes in the piglet small intestine in relation to growth checks and diarrhoea*. PhD thesis, University of Bristol, Bristol, UK.
- HAMPSON, D.J. (1986) *Res. Vet. Sci.* 40: 32-40.
- HAMPSON, D.J. (1987) En: *Manipulating Pig Production*. J.L Barnett, E.S. Batterham, G.M. Cronin, C. Hansen, P.H. Hemsworth, D.P. Hennessy, P.E. Hughes, N.E.

- Johnston y R.H. King (Eds.). Australasian Pig Science Association, Werribee, Victoria, Australia. pp. 202-214.
- HAMPSON, D.J. (1994) En: *Domestic Animals and Humans*. C.L. Gyles (Ed.). *Escherichia coli* in CAB International, Wallingford, England. pp. 171-191.
- HAMPSON, D.J. y Smith, W.C. (1986) *Res. Vet. Sci.* 41: 63-69.
- HAMPSON, D.J., HINTON, M.H. y KIDDER, D.E. (1985) *J. Comp. Pathol.* 95: 353-362.
- HAMPSON, D.J., ROBERTSON, I.D., LA, T., OXBERRY, S.L. y PETHICK, D.W. (2000) *Vet. Microbiol.* 73: 75-84.
- HENTGES, D.J. (1992) En: *Probiotics. The scientific basis*. R. Fuller (Ed.). Chapman and Hall, London. pp. 87-110.
- HIGGINS, R.J., PEARSON, G.R. y WRAY, C. (1997) *Adv. Exp. Med. Biol.* 412: 59-62.
- HILL, I.R. y KENWORTHY, R. (1970) *J. Appl. Bact.* 33: 299-316.
- HINTON, M., HAMPSON, D.J., HAMPSON, E.M. y LINTON, A.H. (1985) *J. Appl. Bact.* 58: 471-478.
- HOPWOOD, D.E, PETHICK, D.W. y HAMPSON, D.J. (2002) *Br. J. Nutr.* 88: 523-532.
- JENSEN, B.B. (1998) *J. Anim. Feed Sci.* 7: 45-64.
- JENSEN, B.B. (2001) En: *Gut Environment of Pigs*. A. Piva, K.E. Bach Knudsen y J.E. Lindberg (Eds.). Nottingham University Press, Loughborough, England. pp. 181-200.
- KENWORTHY, R. y CRABB, W.E. (1963) *J. Comp. Pathol.* 73: 215-228.
- LANGHOUT, D.J. (1998) *The role of the intestinal flora as affected by non-starch polysaccharides in broiler chicks*. PhD thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- LECCE, J.G. (1983) *Ann. Rech. Vet.* 14: 463-8.
- LESER, T.D., AMENUVOR, J.Z., JENSEN, T.K., LINDECORONA, R.H., BOYE, M. y MOLLER, K. (2002) *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 673-690.
- LI, D.F., NELSSSEN, J.L., REDDY, P.G., BLECHA, F., HANCOCK, J.D., ALLEE, G.L., GOODBAND, R.D. y KLEMM, R.D. (1990) *J. Anim. Sci.* 68: 1790-1799.
- LI, D.F., NELSSSEN, J.L., REDDY, P.G., BLECHA, F., KLEMM, R. y GOODBAND, R.D. (1991) *J. Anim. Sci.* 69: 4062-4069.
- LIEBLER-TENORIO, E.M., POHLENZ, J.F. y WHIPP, S.C. (1999) En: *Diseases of Swine*. B.E. Straw, S. D'Allaire, W.L. Mengeling y D.J. Taylor (Eds.). Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. pp. 821-831.
- MACKIE, R.I., SGHIR, A. y GASKINS, H.R. (1999) *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 1035S-1045S.
- MACKINNON, J.D. (1998) *The Pig Journal* 41: 227-255.
- MADEC, F., BRIDOUX, N., BOUNAIX, S. y JESTIN, A. (1998) *Prev. Vet. Med.* 35: 53-72.
- MADEC, F., BRIDOUX, N., BOUNAIX, S., CARIOLET, R., DUVAL-IFLAH, Y., HAMPSON, D.J. y JESTIN, A. (2000) *Vet. Microbiol.* 72: 295-310.
- MATHEW, A.G., SUTTON, A.L., SCHEIDT, A.B., PATTERSON, J.A., KELLY, D.T. y MEYERHOLTZ, K.A. (1993) *J. Anim. Sci.* 71: 1503-1509
- MATHEWS, C.J., MACLEOD, R.J., ZHENG, S.X., HANRAHAN, J.W., BENNETT, H.P.J. y HAMILTON, J.R. (1999) *Gastroenterology* 116: 1342-1347.
- MCDONALD, D.E. (2001) *Dietary fibre for the newly weaned pig; influence on pig performance, intestinal development and expression of post-weaning colibacillosis and*

- intestinal spirochaetosis*. PhD thesis, Murdoch University, Perth, Western Australia.
- MCDONALD, D.E., PETHICK, D.W., MULLAN, B.P., PLUSKE, J.R. y HAMPSON, D.J. (2000) En: *Digestive Physiology of Pigs*. J.E. Lindberg y B. Ogle (Eds.). CABI Publishing, Wallingford, England. pp. 280-282
- MCDONALD, D.E., PETHICK, D.W., MULLAN, B.P. y HAMPSON, D.J. (2001) *Br. J. Nutr.* 86: 487-498.
- NABUURS, M.J.A. (1995) *Pig News Info.* 16: 93N-97N.
- NABUURS, M.J.A. (1998) *Vet. Quart.* 20: S42-S45.
- NABUURS, M.J.A., HOOGENDOORN, A. y VAN ZIJDERVELD-VAN BEMMEL. (1996) *Res. Vet. Sci.* 61: 72-77.
- NATARO, J.P. y KAPER, J.B. (1998) *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 142-201.
- NOLLET, H., DEPRez, P., VAN DRIESSCHE, E. y MUYLLE, E. (1999) *Vet. Microbiol.* 65: 37-45.
- NURMI, E. y RANTALA, M. (1973) *Nature* 241: 210-211.
- OKAI, D.B., AHERNE, F.X. y HARDIN, R.T. (1976) *Can. J. Anim. Sci.* 56: 573-586.
- OSEK, J. (1999) *Vet. Microbiol.* 68: 209-217.
- PALMER, N.C. y HULLAND, T.J. (1965) *Can. Vet. J.* 6: 310-316.
- PLUSKE, J.R., HAMPSON, D.J. y WILLIAMS, I.H. (1997) *Livestock. Prod. Rev.* 51: 215-236.
- PLUSKE, J.R., DURMIC, Z., PETHICK, D.W., MULLAN, B.P. y HAMPSON, D.J. (1998) *J. Nutr.* 128: 1737-1744.
- PLUSKE, J.R., PETHICK D.W., HOPWOOD, D.E. y HAMPSON, D.J. (2002) *Nutr. Res. Rev.* 15: 333-371.
- PROHASZKA, L. y BARON, F. (1980) *Zbl Vet. Med. B*, 27: 222-232.
- RADECKI, S.V. y YOKOYAMA, M.T. (1991) En: *Swine Nutrition*. E.R. Miller, D. E. Ullrey y A. J. Lewis (Eds.). Butterworth Heinemann, Boston, USA. pp. 439-447.
- RICHARDS, W.P.C. y FRASER, C.M. (1961) *Corn. Vet.* 51: 245-257.
- SARMIENTO, J.I. (1988) *Am. J. Vet. Res.* 49: 1154-1159.
- SIBA, P.M., PETHICK, D.W. y HAMPSON, D.J. (1996) *Epidemiol. Infect.* 116: 207-216.
- SMITH, H.W. y HALLS, S. (1968) *J. Med. Microbiol.* 1: 45-59.
- SMITH, H.W. y JONES, J.E.T. (1963) *J. Path. Bacteriol.* 86: 387-412.
- STEWART, C.S. (1997) En: *Gastrointestinal Microbiology*. R.I. Mackie, B.A. White y R.E. Isaacson (Eds.). Chapman and Hall, New York, USA. pp. 142-186.
- SVENDSEN, J., RIISING, H.J. y CHRISTENSEN, S. (1977) *Nord. Vet. Med.* 29: 212-20.
- THOMLINSON, J.R. y LAWRENCE, T.L. (1981) *Vet. Rec.* 109: 120-122.
- TZIPORI, S., CHANDLER, D. y SMITH, M. (1983) *Prog. Food Nutr. Sci.* 7: 193-205.
- VAN BEERS-SCHREURS, H.M.G. (1996) *The changes in the function of the large intestine of weaned pigs*. PhD thesis, University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands.
- VAN BEERS-SCHREURS, H.M.G., VELLENGA, L., WENSING, T. y BREUKINK H.J. (1992) *Vet. Quart.* 14: 29-34.
- VAN BEERS-SCHREURS, H.M.G., NABUURS, M.J.A., VELLENGA, L., KALSBECK-VAN DER VALK, H.J., WENSING, T. y BREUKINK, H.U. (1998a) *Vet. Quart.* 20: S64-S69.

- VAN BEERS-SCHREURS, H.M.G., NABUURS, M.J.A., VELLENGA, L., WENSING, T. y BREUKINK, H.J. (1998b) *Am. J. Vet. Res.* 59: 696-703.
- WATHES, C.M., MILLER, B.G. y BOURNE, F.J. (1989) *Anim. Prod.* 49: 483-496.
- WILL, L.A., PAUL, P.S., PROESCHOLDT, T.A., AKTAR, S.N., FLAMING, K.P., JANKE, B.H., SACKS, J., LYOO, Y.S., HILL, H.T. y HOFFMAN, L.J. (1994) *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 416-422.

FEDNA