

EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI TRE DIVERSI ANTIBIOTICI SULL'ECOLOGIA INTESTINALE E SU ALCUNI PARAMETRI PRODUTTIVI DI SUINETTI IN SVEZZAMENTO: DATI PRELIMINARI.

EFFECT OF THREE DIFFERENT ANTIBIOTICS ON COMMENSAL INTESTINAL MICROFLORA AND ON SOME PRODUCTIVE TRAITS: PRELIMINAR REPORT.

BOSI P.², MERIALDI G.¹, BARDASI L.¹, SCANDURRA S.³, VECCHI M.³, FERRO P.³, MESSORI S.², NISI I.², CASINI L.², TREVISI P.²

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione Diagnostica di Bologna

² DIPROVAL, Università di Bologna

³ Elanco Animal Health, Div. Eli Lilly Italia, Sesto Fiorentino (FI)

Riassunto. E' stato condotto uno studio sperimentale al fine di valutare l'impatto della somministrazione orale di tre diversi antibiotici sulla composizione della flora intestinale e su alcuni parametri produttivi in suinetti in svezzamento. Settantadue suinetti appena svezzati provenienti da una allevamento convenzionale sono stati inclusi nello studio che è stato condotto presso una struttura di stabulazione sperimentale. I suinetti sono stati divisi casualmente in 4 gruppi da 18 soggetti cadauno ed assegnati a 4 diverse diete: dieta da svezzamento convenzionale priva di antibiotici (controllo, C), dieta con inclusione di tilmicosina (T), dieta con inclusione di amoxicillina (A), dieta con inclusione di doxiciclina (D). La prova ha avuto una durata complessiva di quattro settimane, di cui tre di trattamento. Durante la prova ed al termine della stessa sono stati misurati parametri produttivi quali incremento ponderale giornaliero (IPG), assunzione di alimento (AI) e indice di conversione dell'alimento (ICA). Sono stati inoltre prelevati settimanalmente campioni di feci per valutare la concentrazione di enterobatteri e lattobacilli. I soggetti che hanno ricevuto una dieta addizionata con antibiotico hanno mostrato un IPG e AI significativamente superiore al gruppo di controllo, senza modificare il parametro ICA. In media i tre antibiotici non hanno influenzato la concentrazione di lattobacilli, che però è stata maggiore con D e T rispetto ad A. Invece la concentrazione di Enterobatteri è stata fortemente ridotta nel gruppo alimentato con la dieta supplementata con tilmicosina.

Summary. An in vivo experiment was performed to study the effect of three different antibiotics on intestinal microflora composition and on some productive parameters and in weaned piglets. Seventy-two newly weaned conventional piglets were included and randomly assigned to 4 different diets: conventional weaning diet with no antibiotics (C), diet with tilmicosin supplementation (T), diet with amoxicillin supplementation (A) and diet with doxycyclin supplementation (D). The experiment had an overall duration of 4 weeks. Antibiotics were added to diets for 3 weeks. During the experiment and at its end, data about average daily gain (ADG), feed intake (FI), and feed to gain ratio (FGR) were recorded. Fecal samples were collected weekly for *Enterobacteriaceae* and lactobacilli. The groups receiving an antibiotic supplemented diet had significantly

higher ADG and FI values, without any impact on FGR. Lactobacilli concentration did not result averagely impaired by antibiotics, but D and T increased it, as compared with A. Conversely *Enterobacteriaceae* were strongly reduced by the tilmicosin added diet.

INTRODUZIONE

L'utilizzo di mangimi medicati con l'additivazione di sostanze ad azione antibatterica per la terapia ed il controllo delle malattie respiratorie nei reparti svezzamento è una pratica assai comune negli allevamenti suinicoli italiani. Spesso questi trattamenti hanno lunga durata e possono protrarsi per settimane. In linea generale è noto che trattamenti antibiotici possono avere come effetti indesiderati l'insorgere di resistenze e alterazioni sfavorevoli della flora intestinale. Lo svezzamento rappresenta un momento molto critico per l'apparato gastroenterico del suinetto e determina cambiamenti significativi nella microflora e dei suoi metaboliti. In particolare lo svezzamento aumenta l'instabilità della microflora ed è necessaria più di una settimana per ristabilire un equilibrio favorevole nell'ecologia della flora commensale intestinale (Konstatinov et al., 2006). Appare evidente che, in un simile contesto, l'applicazione di un trattamento antibiotico indiscriminato possa rappresentare un potenziale aggravamento della situazione di criticità, potendo favorire lo sbilanciamento della flora intestinale verso popolazioni potenzialmente patogene, primi fra tutti gli enterobatteri a cui appartengono due fra i principali patogeni enterici del suino: *Escherichia coli* e *Salmonella spp.*. Un corretto equilibrio della flora commensale intestinale è infatti essenziale per stimolare e mantenere la capacità del suino nel discriminare fra la flora innocua o benefica e quella patogena o potenzialmente tale. In particolare il rapporto fra la concentrazione di lattobacilli ed enterobatteri appare di notevole importanza. Infatti, sebbene non siano stati mai chiaramente definiti meccanismi attraverso i quali le due classi di microrganismi interagiscono, molti interventi di tipo alimentare finalizzati a migliorare la salute dell'intestino del suino mirano a contenere le concentrazioni degli enterobatteri, favorendo la flora lattica (Mikkelsen et al, 2004, Canibe e Jensen, 2003, van Winsen et al., 2001, van Winsen et al., 2002) o mimandone gli effetti attraverso l'impiego di acidificanti (Canibe et al., 2005, Øverland et al., 2000). E' stata inoltre dimostrata la capacità di ceppi di lattobacilli nell'inibire l'aderenza di *Escherichia coli* nel tratto intestinale (Spencer e Chesson, 1994). La microflora lattica del suino può avere in definitiva un ruolo protettivo nei confronti degli enterobatteri patogeni (*Escherichia coli* e *Salmonella*). Diversi meccanismi sono stati proposti per spiegare questo effetto: la competizione per siti recettoriali (Anderson et al., 1999), la produzione di batteriocine, la produzione di acidi grassi volatili (VFA: acetato, butirato e propionato) e acido lattico. Le forme indissociate dei VFA e dell'acido lattico, in particolare, sarebbero in grado di penetrare la parete degli enterobatteri. Una volta all'interno della cellula, l'acido si dissocia determinando una brusca riduzione del pH intracellulare, risultante in una alterazione permanente del metabolismo batterico (van Winsen 2001, Russel e Diez-Gonzalez, 1998). Vari studi hanno utilizzato la numerazione di enterobatteri e Lattobacilli da diversi tratti del contenuto intestinale per valutare lo stato di salute della microflora intestinale. L'utilizzo del materiale presente nel lume rettale o delle feci per questo tipo di valutazioni rappresenta un mezzo di facile applicazione e consente di osservare i suini per lungo tempo riducendo il numero dei soggetti da includere negli studi e da sacrificare. In particolare, per quanto riguarda gli

enterobatteri, vari Autori sostengono che esiste una ottima correlazione fra le cariche presenti nei primi tratti intestinali e nelle feci (van Winsen et al. 2001, van Winsen et al. 2002, Canibe e Jensen, 2003,). Recenti studi (Collier et al, 2003) hanno indicato che la somministrazione di antibiotici nel suinetto riduce la concentrazione e la variabilità della microflora intestinale determinando un effetto che, seppur potenzialmente favorevole dal punto di vista dell'utilizzo energetico dell'alimento, potrebbe indebolire la risposta dell'ospite nei confronti di agenti nocivi di varia origine. Secondo questi stessi Autori l'effetto sulla microflora commensale non è costante per tutte le molecole ma può differire in base alla categoria di antibiotico somministrato.

Sulla base di questi presupposti, che evidenziano l'importanza della microflora lattica in rapporto agli enterobatteri, si è voluto valutare l'impatto di diversi trattamenti antibiotici in suinetti svezzati sull'ecologia microbica intestinale e sull'eventuali ricadute sulle performance produttive.

MATERIALI E METODI

Settantadue suinetti appena svezzati di 24 giorni di vita, provenienti da un allevamento convenzionale sono stati stabulati presso una struttura sperimentale. Il giorno dell'arrivo i soggetti sono stati suddivisi casualmente in 4 gruppi di 18 suinetti. A ciascun gruppo è stata assegnata una delle seguenti diete: dieta convenzionale per suinetti svezzati senza aggiunta di antibiotici (dieta C); dieta C addizionata di tilmicosina (Pulmotil TM®) in ragione di 400 mg/Kg (dieta T); dieta C addizionata di doxiciclina (Pulmodox ®) in ragione di 300 mg/Kg (dieta D) e dieta C addizionata di amoxicillina (Gammamix ®) in ragione di 400 mg/Kg (dieta A).

La prova ha avuto una durata complessiva di 4 settimane; 12 soggetti per ciascun gruppo sono stati mantenuti per 3 settimane e 6 per gruppo per 4 settimane. Le diete sono state mantenute differenti per le prime 3 settimane, nella quarta settimana tutti i soggetti rimasti in sperimentazione sono stati alimentati con la dieta di controllo per valutare gli effetti residui delle diverse supplementazioni. I soggetti sono stati stabulati individualmente. Ogni animale è stato pesato settimanalmente ed è stata registrata l'assunzione di alimento.

Ai giorni 0,7,14, e 21 sono stati raccolti campioni di feci individuali che sono stati posti in brodo BHI (rapporto 1:10) supplementato di glicerolo (10%) ed immediatamente congelati a -20°C. Giornalmente è stato eseguito e registrato un controllo visivo sull'eventuale aumento di contenuto idrico delle feci. Al giorno 21 è stato prelevato un campione di sangue da ciascun soggetto per la determinazione del contenuto in IgA e IgM. Il giorno del sacrificio da ogni suino è stato misurato il peso a pieno e a vuoto del piccolo intestino e sono stati inoltre raccolti un campione di contenuto del digiuno per le determinazioni batteriologiche e campioni della parete del piccolo intestino al 25% ed al 75% dell'estensione dello stesso per la misurazione dell'altezza dei villi e della profondità delle cripte.

I campioni di feci sono stati sottoposti a numerazione di lattobacilli ed *Enterobacteriaceae* tramite *piestratura* di diverse diluizioni decimali rispettivamente su Terreno MRSA (37°C, 72 h, 10% CO₂) e VRBGA (37°C, 24 h).

La concentrazione di IgA e IgM è stata saggiata tramite un test ELISA (Bosi et al., 2007).

Una aliquota dei campioni di contenuto del digiuno è stata congelata per approfondimenti biomolecolari (DGGE) sulla ecologia e sulla variabilità della flora intestinale nei diversi gruppi di trattamento.

I dati sono stati elaborati mediante analisi della varianza con la procedura GLM del programma SAS (SAS Inst. inc., Cary, NC), considerando l'effetto della dieta e la nidata. Sono stati effettuati i seguenti confronti ortogonali tra le diete: l'effetto della supplementazione antibiotica in generale (C *vs.* T+A+D), l'effetto di tilmicosina (T *vs.* A+D) ed il diverso effetto degli altri due antibiotici (A *vs.* D).

RISULTATI

Al momento della stesura di questo report preliminare non tutte le analisi programmate sono state terminate, pertanto saranno illustrati e discussi esclusivamente i dati relativi a: determinazioni batteriologiche sui campioni fecali, parametri zootecnici, determinazioni delle IgA e delle IgM dal sangue periferico, calcolo del peso relativo del piccolo intestino a vuoto e del peso relativo del contenuto intestinale.

Durante tutta la sperimentazione gli animali hanno presentato un ottimo stato di salute e nessuna differenza è stata osservata fra i diversi gruppi in termini di presenza di diarrea o alterazioni del fecal score. Un suino della dieta T è morto in seguito ad un trauma durante la terza settimana di sperimentazione. Prima dell'incidente la crescita del suinetto era stata sovrapponibile a quella media osservata nel suo gruppo. In ogni caso i dati relativi a questo soggetto non sono stati inclusi nelle valutazioni.

I dati relativi alle concentrazioni di enterobatteri e lattobacilli sono presentati in tabella 1.

Tabella 1. Effetto dell'integrazione della dieta con tre diversi antibiotici sulle concentrazioni batteriche fecali.

Table 1. Effect of dietary addition with three antibiotics on the bacteria counts in feces and jejunum content of weaning pigs.

	Dieta					Significatività, p		
	C	A	D	T	ESM	C <i>vs.</i> (A+D+T)	T <i>vs.</i> (A+D)	A <i>vs.</i> D
<i>Enterobacteriaceae</i> (Log10 UFC/g/feci)								
d 0	7.13	6.92	7.51	7.24	0.25	0.749	0.933	0.089
d 7	5.85	6.43	5.36	3.55	0.23	0.006	<0.001	0.001
d 14	5.33	6.40	4.79	1.98	0.23	0.001	<0.001	<0.001
d 21	4.96	5.74	4.30	1.78	0.23	<0.001	<0.001	<0.001
<i>lattobacilli</i> (Log10 CFU/g feci)								
d 0	7.96	7.79	7.63	7.89	0.18	0.355	0.414	0.527
d 7	8.56	8.17	8.69	8.78	0.15	0.947	0.066	0.016
d 14	8.64	8.08	8.70	8.55	0.15	0.258	0.374	0.003
d 21	8.48	7.78	8.45	8.50	0.15	0.161	0.051	0.003

A partire dalla prima settimana si è registrata una diminuzione significativa fra i gruppi trattati e il gruppo di controllo per il parametro concentrazione di enterobatteri nelle feci. Osservando i dati ottenuti nei diversi gruppi di trattamento si osserva che questo effetto è associato esclusivamente alla dieta integrata con tilmicosina. Infatti a partire già dalla prima settimana il gruppo trattato con la dieta T ha fatto registrare una drastica riduzione del parametro in questione rispetto agli altri trattamenti. Al giorno 21 la differenza fra T e gli altri gruppi varia fra i 3 ed i 4 logaritmi. Per quanto riguarda la concentrazione dei lattobacilli, complessivamente l'effetto dei 3 antibiotici nei confronti del gruppo di controllo non appare significativo. Si evidenzia un effetto negativo sul parametro da parte della dieta A (amoxicillina) che assume carattere di significatività statistica nei confronti del gruppo D ed estendibile per analogia ai gruppi C e T.

In tabella 2 sono rappresentati i risultati dei parametri IPG, AI e ICA. Nei gruppi trattati con antibiotico si registra un aumento del 34,7% dell'IPG ($p < 0.01$) nella prima settimana e del 9% ($p < 0.05$) durante le tre settimane complessive di trattamento. Durante l'ultima settimana quando tutti i suini hanno ricevuto la stessa dieta, non sono state registrate differenze significative nella crescita.

Anche l'assunzione di alimento è risultata maggiore nei gruppi trattati. Tale aumento è stato del 19% ($p < 0.01$) e del 8,3% ($p < 0,05$) rispettivamente nella prima settimana e nelle tre settimane di trattamento. In confronto alla dieta di controllo, la supplementazione antibiotica non ha influito sulla conversione dell'alimento (ICA).

L'effetto della supplementazione con i tre antibiotici sul peso del piccolo intestino a vuoto e del contenuto dello stesso piccolo intestino sono illustrati in tabella 3.

Complessivamente i tre antibiotici non hanno influito su questi tre parametri in confronto alla dieta di controllo. Tuttavia i soggetti alimentati con tilmicosina hanno mostrato un trend ad avere un contenuto intestinale inferiore rispetto a quelli alimentati con le diete A e D, sia a termine del trattamento sia dopo la settimana di sospensione ($p = 0.070$ and $p = 0.140$). Se i dati relativi a questi due end point vengono aggregati, la differenza assume valore di significatività statistica ($p < 0.05$).

In tabella 4 sono riportati i dati relativi alla quantificazione delle IgM e delle IgA nel sangue periferico. Alla fine delle tre settimane di trattamento è stato possibile osservare una diminuzione statisticamente significativa ($p < 0,05$) della concentrazione di IgM nei gruppi trattati rispetto al gruppo di controllo.

Tabella 2. Effetto dell'integrazione della dieta con tre diversi antibiotici su alcuni parametri produttivi

Table 2. Effect of dietary addition with three antibiotics on growth performance of weaning pigs

	Dieta					Significatività, p		
	C	A	D	T	ESM	C vs.	T vs.	
						(A+D+T)	(A+D)	A vs. D
Peso vivo, kg								
d 0	6.65	6.65	6.65	6.68	0.22	0.953	0.908	0.997
d 21	13.15	13.63	13.92	13.70	0.41	0.200	0.873	0.602
d 28	16.86	16.95	18.18	17.55	0.91	0.516	0.986	0.356
ADG, g								
d 0 to 7	120	156	157	169	13	< 0.01	0.436	0.950
d 7 to 14	350	347	364	358	17	0.767	0.922	0.461
d 14 to 21	459	494	518	475	21	0.133	0.242	0.417
d 0 to 21	310	332	346	334	12	< 0.05	0.722	0.406
d 21 to 28	500	500	581	532	42	0.448	0.864	0.192
Ass. aliment, g								
d 0 to 7	217	251	261	261	12	< 0.01	0.749	0.588
d 7 to 14	453	468	453	474	20	0.596	0.564	0.597
d 14 to 21	629	652	716	684	26	0.596	0.564	0.597
d 0 to 21	433	457	477	473	15	< 0.05	0.740	0.363
d 21 to 28	790	814	927	865	67	0.330	0.946	0.252
ICA								
d 0 to 7	1.92	2.12	1.90	1.72	0.24	0.968	0.332	0.510
d 7 to 14	1.34	1.38	1.27	1.37	0.05	0.937	0.501	0.108
d 14 to 21	1.37	1.33	1.40	1.44	0.03	0.591	0.061	0.087
d 0 to 21	1.42	1.39	1.38	1.43	0.03	0.598	0.150	0.976
d 21 to 28	1.59	1.63	1.61	1.63	0.06	0.592	0.939	0.813

Tabella 3. Effetto dell'integrazione della dieta con tre diversi antibiotici su peso a vuoto relativo del piccolo intestino e del contenuto del piccolo intestino

Table 3. Effect of dietary addition with three antibiotics on the relative weight of the empty small intestine and of small intestine content of weaning pigs

	Dieta					Significatività, p		
	C	A	D	T	ESM	C vs.	T vs.	
						(A+D+T)	(A+D)	A vs. D
Peso a vuoto piccolo intestino, % PV								
21 d	3.58	3.52	3.37	3.56	0.15	0.551	0.527	0.475
28 d	3.32	3.30	3.28	3.45	0.20	0.941	0.528	0.929
Peso contenuto piccolo intestine, % PV								
21 d	2.26	2.45	2.04	1.79	0.19	0.459	0.070	0.141
28 d	1.88	2.12	1.96	1.65	0.20	0.919	0.140	0.578

Tabella 4. Effetto dell'integrazione della dieta con tre diversi antibiotici sulla concentrazione sierica di IgA e IgM

Table 4. Effect of dietary addition with three antibiotics on IgA and IgM total contents in blood serum of weaning pigs

	Dieta					Significatività, p		
	C	A	D	T	ESM	C vs.	T vs.	
						(A+D+T)	(A+D)	A vs. D
IgA (µg/mL)								
21 d1	504	490	589	469	43	0.796	0.184	0.100
28 d	623	510	747	501	135	0.826	0.441	0.221
IgM (µg/mL)								
21 d1	2577	1993	2327	1896	180	0.016	0.237	0.187
28 d	2277	1770	1591	1557	280	0.084	0.716	0.648

¹ Su tutti i suini in prova.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati fin qui ottenuti consentono di estrapolare alcune importanti considerazioni. In primo luogo i dati ottenuti confermano quanto già suggerito da Collier e collaboratori (2003) in relazione al diverso effetto che classi diverse di antibiotico possono avere sulla microflora intestinale del suinetto in svezzamento. In quel lavoro, in particolare, era stato evidenziato come a fronte di una riduzione complessiva della carica microbica ileale, i soggetti alimentati con un mangime supplementato con tilosina, avessero fatto registrare a fine prova concentrazioni di lattobacilli più elevate rispetto al gruppo alimentato con una dieta supplementata con altri antibiotici a rotazione. Nella nostra esperienza, tilmicosina, una molecola appartenente alla classe dei macrolidi come tilosina, ha avuto sostanzialmente un comportamento analogo spostando decisamente a favore dei lattobacilli e a danno degli enterobatteri l'equilibrio della flora enterica. Secondo i numerosi studi citati nella parte introduttiva, questa situazione è potenzialmente molto favorevole nel contrastare la colonizzazione e l'azione di batteri patogeni per l'intestino. Considerato il fatto che la presenza concomitante di problematiche enteriche e respiratorie nella fase di svezzamento è evenienza tutt'altro che rara, ciò potrebbe essere tenuta in considerazione nella scelta dell'antibiotico da includere nel mangime. Il tipo di analisi fin ora eseguito sulla flora intestinale non consente tuttavia di valutare quali specie batteriche siano state in particolare favorite o abbattute dai diversi trattamenti né tanto meno di stimare l'effetto sulla variabilità genetica della flora commensale. Se queste indicazioni saranno rese possibili dagli approfondimenti biomolecolari in corso (DGGE), sarà possibile formulare delle ipotesi sui meccanismi attraverso i quali i tre diversi antibiotici hanno influenzato la flora intestinale.

Per quanto riguarda l'effetto degli antibiotici sulle performance zootecniche, esso è stato favorevole in particolare nella prima settimana di somministrazione, risultando comunque apprezzabile per tutto il periodo di trattamento. Le tre diete supplementate hanno fatto registrare un aumento degli incrementi ponderali, legato direttamente ad una maggiore assunzione di alimento. L'indice di conversione dell'alimento non è risultato influenzato.

L'effetto migliorativo degli antibiotici sulle performance produttive è noto da tempo, tanto che fino a pochi anni fa il loro utilizzo come *growth promoters* era assai diffuso. Per spiegare come la somministrazione di antibiotici a dosaggi subterapeutici migliori l'efficienza produttiva del suinetto sono stati ipotizzati 4 diversi possibili meccanismi (Gaskins et al, 2002, Dibner e Richards, 2005, Page, 2006): 1) inibizione delle infezioni subcliniche con conseguente riduzione dei costi metabolici del sistema immunitario, 2) riduzione di metaboliti microbici che deprimono la crescita, 3) riduzione dell'utilizzo dei nutrienti da parte dei batteri, 4) miglioramento dell'assunzione dei nutrienti per minore spessore della parete intestinale negli animali trattati. Più recentemente è stato proposto un quinto meccanismo che indicherebbe nell'effetto antinfiammatorio non antibiotico le motivazioni del miglioramento delle performance produttive (Niewold, 2007). In questa prova gli antibiotici non sono stati somministrati come *growth promoters* ma a dosaggio terapeutico. Il fatto che il miglioramento dei parametri zootecnici sia stato legato ad un aumento dell'ingestione piuttosto che ad una diminuzione dell'ICA, mal si concilia con le ipotesi suddette. E' ipotizzabile invece che gli antibiotici abbiano migliorato a livello sistemico e/o intestinale le condizioni di salute degli animali, stimolando l'assunzione di alimento. La diminuzione delle IgM circolanti nei gruppi trattati può essere considerata a supporto di questa ipotesi, indicando una possibile diminuzione della attivazione della risposta immunitaria verso infezioni di tipo subclinico. E' stato infatti dimostrato che gli antibiotici sono in grado di diminuire la produzione di citochine pro-infiammatorie che sono responsabili anche di una diminuzione dell'appetito (Gruys et al, 2006). E' possibile inoltre che i tre antibiotici abbiano orientato la microflora intestinale verso un profilo che favorisce lo sviluppo della tolleranza immunitaria (Bailey, 2009), a prescindere dalle variazioni di conteggio dei tipi batterici considerati. In conclusione si ritiene che la scelta dell'antibiotico da utilizzare in una fase delicata come il periodo di svezzamento del suino, debba tenere in considerazione anche gli effetti che esso può determinare sull'equilibrio della microflora intestinale, che è diverso a seconda della molecola utilizzata. Ulteriori indicazioni potranno essere fornite dallo sviluppo di questo lavoro, in particolare quando saranno disponibili gli accertamenti biomolecolari che potranno fornirci un quadro più dettagliato dell'effetto dei diversi trattamenti sulla variabilità genetica della microflora e su singole specie batteriche con effetto probiotico (*Lactobacillus* spp) o patogeno (*Escherichia coli*, *Salmonella*).

Table. Effect of dietary addition with three antibiotics on IgA and IgM total contents in blood serum of weaning pigs

	Dieta					Significatività, p		
	C	A	D	T	ESM	C vs.	T vs.	
						(A+D+T)	(A+D)	A vs. D
IgA (µg/mL)								
21 d1	504	490	589	469	43	0.796	0.184	0.100
28 d	623	510	747	501	135	0.826	0.441	0.221
IgM (µg/mL)								
21 d1	2577	1993	2327	1896	180	0.016	0.237	0.187
28 d	2277	1770	1591	1557	280	0.084	0.716	0.648

¹On all pigs in trial.

References

- Anderson R. C., Genovese K. J., Harvey R. B., Stanker L. H., Keith N.k., Deloak J.R., Nisbet D.J., 1999. Effect of competitive exclusion on transmission of *Salmonella choleraesuis* between early weaned pigs. Proceedings of the 3th International Symposium on the epidemiology and control of *Salmonella* in pork, Washington., USA, p.p. 18-21.
- Bailey M., 2009. The mucosal immune system: recent developments and future directions in the pig. *Dev Comp Immunol.* 33, 75-83.
- Bosi P., Sarli P., Casini L., De Filippi S., Trevisi P., Mazzoni M., Merialdi G., 2007. The influence of fat protection of calcium formate on growth and intestinal defence in *Escherichia coli* K88-challenged weanling pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 139, 170-185.
- Canibe N. e Jansen B. B., 2003. Fermented and nonfermented liquid feed to growing pigs: effect on aspects of gastrointestinal ecology and growth performance. *J. Anim. Sci.* 81, 2019-2031
- Canibe N., Højberg O., Højsgaard S. e Jensen B. B., 2005. Feed physical form and formic acid addition to the feed affect the gastrointestinal ecology and growth performance of growing pigs. *J. Anim. Sci.* 83, 1287-1302
- Collier, C.T., M.R. Smiricky-Tjardes, D.M. Albin, J.E. Wubben, V.M. Gabert, B. Deplancke, D. Bane, D.B. Anderson, and H.R. Gaskins. 2003. Molecular ecological analysis of porcine ileal microbiota responses to antimicrobial growth promoters. *J. Anim. Sci.* 81:3035-3045.
- Dibner JJ, Richards JD, 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult Sci.*, 84(4):634-43.
- Gaskins HR, Collier CT, Anderson DB, 2002. Antibiotics as growth promotants: mode of action *Anim Biotechnol.*, 13(1):29-42.
- Gruys E.M.J., Toussaint J.M., Niewold T.A., Koopmans, S.J., van Dijk E., Meloen R.H., 2006. Monitoring health by values of acute phase proteins. *Acta Histochem.*, 108:229-232
- Konstantinov SR, Awati AA, Williams BA, Miller BG, Jones P, Stokes CR, Akkermans AD, Smidt H, de Vos WM. 2006. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environ. Microbiol.* 8:1191-1199.
- Mikkelsen L. L., Naughton P. J., Hedemann M. S. e Jensen B. B., 2004. Effects of Physical properties of feed on microbial ecology and survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the pig gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 70.6, 3485-3492
- Niewold TA., 2007. The non antibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poult Sci.* 86(4):605-9

Øverland M., Granli T., Kjos N.P., Fjetland O., Steien S.H., Stokstad M., 2000 "Effect of dietary formats on growth performance, carcass traits, sensory quality, intestinal microflora, and stomach alterations in growing-finishing pigs". *J. Anim. Sci.* 78, 1875-1884.

Page, S. W., 2006. Current use of antimicrobial growth promoters in food animals: The benefits. Pag 19-51 in *Antimicrobial Growth Promoters: where do we go from here?* D. Barug, J. de Jong, A.K. Kies, Verstegen M., Editore Wageningen Academic Publisher, Wageningen, Olanda.

Russell JB, Diez-Gonzalez F, 1998. The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Adv Microb Physiol.*;39:205-34.

Spencer RJ, Chesson A., 1994. The effect of *Lactobacillus* spp. on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes. *J Appl Bacteriol.*;77(2):215-20.

van Winsen R. L., Keuzenkamp D., Urlings B. A. P., Lipman L. J. A., Snijders J. A. M., Verheijden J. H. M. e van Knapen F., 2002. Effect of fermented feed on shedding of *Enterobacteriaceae* by fattening pigs. Short communication. *Vet. Microbiol.* 87, 267-276

van Winsen R. L., Urlings B. A. P, Lipman L.J.A., Snijders J.M.A., Keuzenkamp D., Verheijden J.H.M. e van Knapen F., 2001. Effect of fermented feed on microbial population of the gastrointestinal tracts of pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 67.7, 3071-3076