

VALUTAZIONE DI PARAMETRI IMMUNITARI IN SUINETTI ALIMENTATI CON SUPPLEMENTAZIONE A BASE DI FERMENTI LATTICI VIVI E MANNO-OLIGOSACCARIDI CON β -GLUCANI

EVALUATION OF IMMUNE PARAMETERS IN PIGLETS FED WITH LACTIC ACID BACTERIA, MANNAN-OLIGOSACCHARIDES AND β -GLUCANS IN SUPPLEMENTED FEED

PAOLO BORGHETTI¹, LUCA FERRARI¹, ELENA DE ANGELIS¹, LUCA MORANDINI⁴, FREDERIC PELENC², GIULIO GABALDO³, EZIO BOTTARELLI¹, PAOLO MARTELLI¹.

¹ Dipartimento di Salute Animale, Università degli Studi di Parma

² Original Process France

³ Original Process Italia

⁴ Veterinario libero professionista

Parole chiave: fermenti lattici vivi, manno-oligosaccaridi, β -glucani, suinetti, risposta immunitaria.

Key words: lactic acid bacteria, mannan-oligosaccharides, β -glucans, piglets, immune response.

Riassunto. Il presente studio ha analizzato alcuni parametri immunitari in suinetti che fino a 8 settimane di vita hanno ricevuto una supplementazione nella dieta con *Micronil*[®], prodotto registrato ed in commercio a base di cereali germinati e fermentati mediante metodo FAP[®] con l'utilizzo di fermenti lattici vivi e contenente manno-oligosaccaridi con β -glucani, in confronto a scrofe e suinetti (controlli) non alimentati con tale supplementazione. La supplementazione delle scrofe e dei loro suinetti con *Micronil*[®] ha mostrato un significativo incremento della responsabilità linfocitaria nei suinetti in confronto ai suinetti controllo sia come secrezione di IFN γ che come attività proliferativa e metabolica dopo stimolazione aspecifica con PHA. Queste modificazioni si associano a più alti livelli di linfociti T γ/δ nel sangue. Ulteriori studi potranno confermare questi risultati preliminari e approfondirne le implicazione funzionali in termini di potenziale influenza sulla qualità dell'apporto latteo materno e di risposte immunitarie specifiche (i.e. vaccinazioni) o in presenza di infezione.

Abstract. This study analyzed some immune parameters in piglets fed up to 56 days of age with a supplementation of a registered feed additive (*Micronil*[®]) based on lactic fermentation (FAP[®] method) of cereals containing probiotic acid bacteria, mannan-oligosaccharides with β -glucans in comparison to control piglets not fed with this supplementation. Supplementing sows' and their piglets' feed, a significant increase of lymphocyte responsiveness in piglets when compared to controls was observed, both as IFN γ secretion and proliferative/metabolic lymphocyte activity after non-specific stimulation (PHA). These changes were associated with

higher levels of T γ/δ lymphocytes in blood. Further studies could confirm these preliminary results and better investigate functional implication as potential influence on sow milk quality and/or on the efficiency of specific immune response such as vaccination or during infection.

INTRODUZIONE

Nell'allevamento intensivo del suino, la ricerca applicata sta analizzando tecniche manageriali e nutrizionali che siano in grado di potenziare la risposta difensiva nei confronti dei patogeni mediante modulazione e/o maturazione della risposta immunitaria locale e sistemica. Tali indagini appaiono importanti soprattutto nel periodo più critico per lo sviluppo dell'efficienza immunitaria che coincide col primo periodo di vita dei suinetti (periodo pre- e post-svezzamento) in cui la risposta immunitaria naturale e specifica non solo si sviluppa in termini strutturali e funzionali ma viene anche modulata da importanti stimoli di natura ambientale e vaccinale (Borghetti et al., 2006). In tale ottica, si è sviluppato l'interesse sugli effetti di pro-biotici e pre-biotici sull'ecosistema intestinale e sull'“educazione” del sistema immunitario mucosale e sistemico con, di conseguenza, potenziali effetti benefici non solo sulla salute dell'animale ma anche sulle performance di crescita (Kocher, 2005; Mordenti, 2005; Dritz et al., 1995; Davis et al., 2004).

Il presente studio ha analizzato alcuni parametri immunitari in suinetti che hanno ricevuto una supplementazione nella dieta con *Micronil*[®], prodotto registrato ed in commercio a base di cereali germinati e fermentati mediante metodo *FAP*[®] con l'utilizzo di fermenti lattici vivi e contenente manno-oligosaccaridi con β -glucani, in confronto a scrofe e suinetti (controlli) non alimentati con tale supplementazione.

MATERIALI E METODI

Animali

La presente ricerca si è svolta in un allevamento convenzionale su gruppi di scrofe di razza *Goland* e sulle rispettive nidiate. Da 12 scrofe di secondo o terzo parto scelte casualmente si sono costituiti due gruppi di 6 scrofe ciascuno: un gruppo a cui è stata somministrata una dieta supplementata con *Micronil*[®] ed un altro gruppo (controllo) la cui alimentazione non prevedeva alcuna supplementazione.

Dalle nidiate delle scrofe controllo e trattate sono stati poi selezionati casualmente 4 gruppi di 6 suinetti ciascuno:

Gruppo 1 (TC): 6 suinetti, nati da scrofe che hanno ricevuto *Micronil*[®], i quali NON hanno ricevuto dieta supplementata con *Micronil*[®];

Gruppo 2 (TT): 6 suinetti, nati da scrofe che hanno ricevuto *Micronil*[®], i quali hanno ricevuto alimentazione supplementata con *Micronil*[®] fino a 56 giorni di età;

Gruppo 3 (CT): 6 suinetti, nati da scrofe controllo, i quali hanno ricevuto alimentazione supplementata con *Micronil*[®] fino a 56 giorni di età;

Gruppo 4 (CC): 6 suinetti, nati da scrofe controllo, NON alimentati con supple-

mentazione nella dieta con *Micronil*[®].

I suinetti sono stati vaccinati verso *Mycoplasma hyopneumoniae* al 7° giorno di vita con richiamo al 21° giorno di vita e sono stati svezzati a 25 giorni di età.

Somministrazione alimentare con Micronil[®]

Il Micronil[®] è stato somministrato alle scrofe dal 55° giorno di gravidanza fino alla fine della lattazione alle dosi prescritte dalla ditta produttrice per tale prodotto (200 g/100 Kg di mangime).

Ai suinetti il Micronil[®] è stato somministrato con il mangime sottoscrofa messo a disposizione dopo la prima settimana di vita e poi come supplementazione nell'alimento post-svezzamento alla dose di 200 g ogni 100 Kg di mangime

Determinazione dei parametri immunitari

Ai suinetti appartenenti ai quattro gruppi è stato prelevato il sangue alla nascita (T0), 7 (T1), 14 (T2), 21 (T3), 28 (T4), 35 (T5), 42 (T6), 56 (T7) giorni di età.

Il sangue è stato consegnato al laboratorio entro 1.5-2 ore dal prelievo ed è stato immediatamente processato. Il plasma ed il siero sono stati conservati a -20°C.

Risposta linfocitaria in sangue periferico

La responsività delle cellule linfocitarie alla stimolazione *in vitro* con antigeni specifici ed aspecifici è stata valutata come produzione di IFN γ determinata mediante tecnica ELISpot e come linfoproliferazione analizzata mediante la test MTT secondo protocolli precedente descritti (Ferrari et al. 2005; Mocchegiani et al., 1998; Thacker et al., 2000). Per la produzione di IFN γ mediante tecnica ELISpot le cellule mononucleate isolate da sangue periferico [Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)] sono state stimolate in vitro con PHA (*Phytoemagglutinin*) 0.25-0.5 μ g/ml (stimolazione aspecifica alla nascita, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 56 giorni di età) e con ceppo vaccinale P-5722-3 [6.25 MHDCE. (*M. Hyo.* DNA Cells Equivalents)] per la stimolazione specifica con *Mycoplasma hyopneumoniae* a 7 giorni di età (1a vaccinazione), a 21 (2a vaccinazione) ed a 35 giorni di età. L'analisi dell'attività metabolica e di linfoproliferazione mediante test MTT è stata ottenuta stimolando le PBMC (200.000 cellule / 100 μ l di RPMI-1640) per 48 ore a 37°C in incubatore con PHA in confronto a cellule seminate unicamente in terreno di coltura. La reazione colorimetrica è stata quantificata mediante spettrofotometro con lettura di riferimento a 690 nm.

Sottopopolazioni linfocitarie nel sangue periferico (citofluorimetria a flusso)

Per la caratterizzazione delle sottopopolazioni linfocitarie mediante citofluorimetria a flusso sono stati processati campioni di sangue periferico di suinetto, prelevati in litioeparina 5 mM per impedirne la coagulazione secondo metodiche precedentemente descritte (Borghetti et al., 2006). Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anti-CD3 ϵ -PE (PPT3), anti-CD4 α -FITC (74-12-4), anti-CD8 α -FITC (76-2-11) e anti-CD21-FITC (BB6-11C9.6) da Southern Biotech; anti-TcR1-N4 (PGBL22A - VMRD) + anti-IgG1-FITC (M32001 - Caltag Labs); anti-CD16-FITC (G7 - Setotec).

Esame ematologico

L'esame emocromocitometrico è stato effettuato tramite contaglobuli automatico

(*Medonic CA570 - Delcon*), specificatamente tarato per l'ematologia suina. La formula leucocitaria è stata calcolata su striscio di sangue processato mediante colorazione *May Grünwald-Giemsa* ed osservato al microscopio ottico ad ingrandimento 1000x. Le popolazioni considerate sono state: 1) leucociti (WBC : *White Blood Cells*) (valore assoluto = n° cellule / μ l); 2) linfociti (valore assoluto).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata mediante Test *ANOVA (ANalysis Of VAriance)* per l'analisi della varianza e *Test di Tukey-Kramer* (programma SPSS v.12).

RISULTATI

Esame ematologico

I livelli di leucociti totali (n° cellule/ μ l) nel sangue periferico dei suinetti in esame sono apparsi alla nascita significativamente inferiori ($p < 0.05$) nel gruppo 1 rispetto agli altri gruppi i quali hanno invece mostrato valori comparabili e più elevati. Fino a 28 giorni di età non sono state evidenziate modificazioni significative mentre i valori sono aumentati nelle ultime 3 settimane di indagine in maniera più evidente per il gruppo 2. I livelli assoluti di linfociti periferici, nelle prime settimane di vita, hanno mostrato un incremento progressivo per poi stabilizzarsi nel rimanente periodo di analisi; alla nascita sono state osservate differenze anche per questa popolazione, con valori assoluti più elevati per i suini del gruppo 2 ($p < 0.05$).

Sottopopolazioni linfocitarie

I livelli assoluti (n° cellule/ μ l) di alcune sottopopolazioni linfocitarie hanno mostrato alcune differenze significative tra i gruppi, ma al tempo stesso sono apparse limitate solo ad alcune età specifiche; nel particolare, cellule a fenotipo citotossico (CD3-CD8+) e cellule a fenotipo CD4+CD8+^{low} (linfociti memoria) hanno mostrato livelli più elevati nel gruppo 2 alla nascita ma alle altre età non si sono riscontrate differenze significative (dati non mostrati). Le differenze più importanti si sono osservate per i livelli assoluti dei linfociti T γ/δ nel sangue periferico (Fig. 1A): nei vari gruppi di suinetti si è osservato un progressivo incremento dei valori di tale sottopopolazione linfocitaria ed il gruppo 2 ha mostrato valori significativamente più elevati ($p < 0.05$) rispetto al gruppo 4 per quasi tutto il periodo di osservazione.

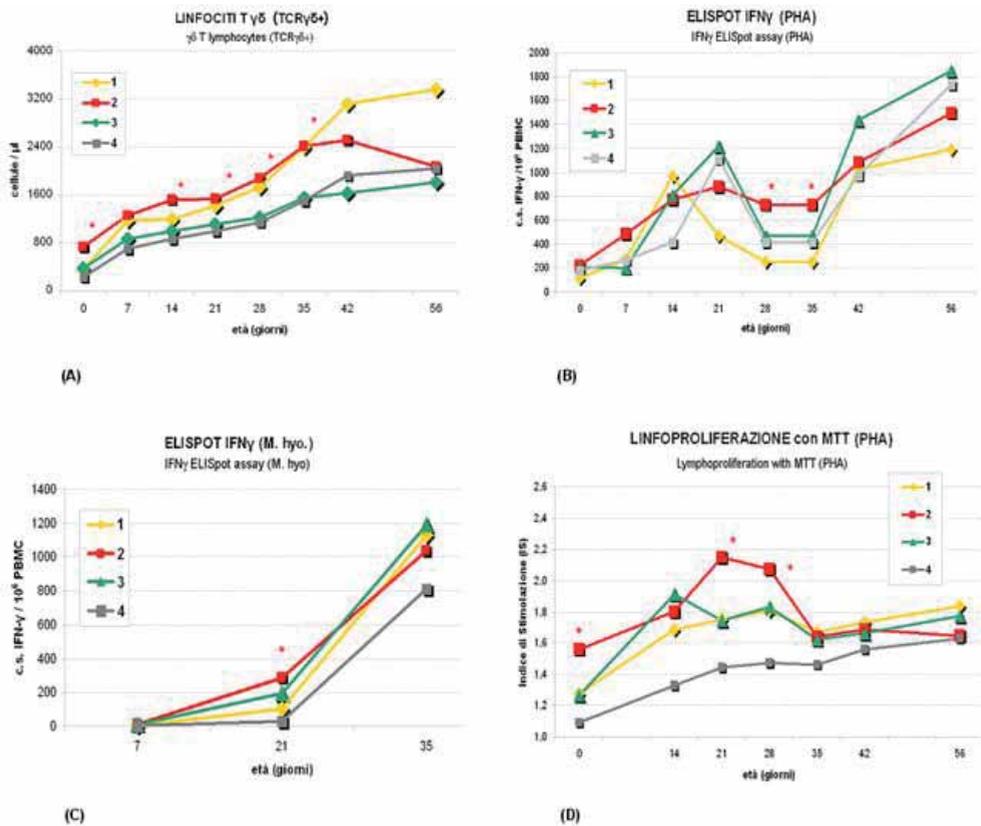


Fig. 1: **A)** Livelli assoluti (n° cellule/ μ l) di linfociti T $\gamma\delta$ nel sangue periferico; **B)** Risposta cellulare in PBMC dopo stimolazione aspecifica *in vitro* con PHA valutata come cellule secernenti (c.s.) IFN γ con tecnica ELISpot; **C)** Risposta cellulare a seguito di stimolazione *in vitro* con vaccino inattivato di *Mycoplasma hyopneumoniae* valutata come n° di cellule secernenti (c.s.) IFN γ con tecnica ELISpot; **D)** Attività metabolica e capacità proliferativa dei PBMC a seguito di stimolazione con PHA valutata come indice di stimolazione (I.S.) con test MTT.

Fig. 1: **A)** Absolute values (nr. of cells/ μ l) of T $\gamma\delta$ lymphocytes in the peripheral blood; **B)** Cell responsiveness after non-specific stimulation with PHA in PBMC determined as number of IFN γ secreting cells by ELISpot assay; **C)** Cell responsiveness after *in vitro* stimulation with *Mycoplasma hyopneumoniae* in PBMC determined as number of IFN γ secreting cells by ELISpot assay; **D)** Metabolic/proliferative activity of PBMC after *in vitro* stimulation with PHA (stimulation index) by MTT assay.

Risposta linfocitaria nel sangue periferico valutata come cellule secernenti (c.s.) IFN γ

Stimolazione con PHA

La risposta cellulo-mediata a seguito di stimolazione aspecifica *in vitro* con PHA è stata valutata come cellule secernenti (c.s.) IFN γ determinata con tecnica ELISpot (Fig. 1B). Alla nascita i livelli di cellule responsive sono apparsi comparabili tra i gruppi; a 14 giorni i gruppi 1, 2 e 3 sono risultati con valori medi superiori rispetto al gruppo 4 (1 vs. 4, $p < 0.05$) mentre a 21 giorni il gruppo 1 è risultato avere i valori più bassi (1 vs. 3, $p < 0.05$). Dallo svezzamento (25 giorni di età) fino a 35 giorni, pur nell'ambito di una risposta comunque ridotta in tutti i gruppi, il gruppo 2 ha mostrato una responsività significativamente più elevata rispetto agli altri gruppi ($p < 0.05$). Nelle ultime 2 settimane si è osservato un incremento progressivo ed intenso per tutti i gruppi di suinetti ($p < 0.05$).

Stimolazione con *Mycoplasma hyopneumoniae*

La risposta cellulo-mediata a seguito di stimolazione *in vitro* con vaccino inattivato di *Mycoplasma hyopneumoniae* è stata valutata come n° di cellule secernenti (c.s.) IFN γ con tecnica ELISpot (Fig. 1C) ha evidenziato un incremento del numero di cellule responsive dopo 2 settimane (21 giorni di età) dalla prima vaccinazione con valori significativamente maggiori nei gruppi 2 e 3 rispetto al gruppo 4. In seguito all'intenso effetto *booster* dopo 2 settimane dalla seconda vaccinazione, a 35 giorni di vita, i valori sono aumentati con valori medi che si mantengono più elevati nei gruppi 1, 2 e 3 rispetto al gruppo 4 ma senza differenza statisticamente significativa.

Attività metabolica e linfoproliferazione (MTT)

La valutazione dell'attività metabolica e della capacità proliferativa delle PBMC a seguito di stimolazione con PHA valutata con test MTT (Fig. 1D) ha evidenziato una maggior responsività nei suinetti del gruppo 2, con differenze significative rispetto al gruppo 4 alla nascita, a 21 e 28 giorni di età ($p < 0,05$); nelle prime 5 settimane di vita i gruppi 1, 2 e 3 hanno manifestato una maggior risposta rispetto al gruppo 4. Nelle ultime tre settimane di indagine i valori si sono mostrati invece comparabili.

DISCUSSIONE

Un precedente lavoro sulla supplementazione con *Micronil*[®] nelle scrofe come additivo alimentare ha evidenziato effetti positivi sul peso e sulla omogeneità della nidiata allo svezzamento e ridotta mortalità presvezzamento (Pelenc et al., 2004). In questa prova di campo, i risultati ottenuti mettono in evidenza che tale supplementazione alimentare è in grado di influenzare alcuni parametri immunologici di tipo sistemico sia in termini di incremento numerico che di attività funzionale. Inoltre, si è riscontrato che, nell'ambito del presente studio, il trattamento che appare più efficiente nel determinismo di tali differenze rispetto agli animali controllo, è quello che prevede la supplementazione con *Micronil*[®] sia nelle scrofe che nei suinetti mentre il solo trattamento dei suinetti dal 10° giorno di vita all'8a settimana non si mostra in grado di determinare gli stessi effetti almeno

nelle prime due settimane di vita; questo potrebbe essere messo in relazione alla limitata assunzione del prodotto test nell'alimento nel periodo sottoscrofa, ma anche all'influenza di fattori (al momento non determinati) presenti nel latte in grado di modulare positivamente la risposta linfocitaria fin dalla nascita e nelle prime settimane di vita, momento critico per la maturazione immunitaria.

Per quanto riguarda lo studio immunologico, alcune delle differenze osservate in certi parametri immunitari, seppur statisticamente significative, appaiono di difficile interpretazione soprattutto perché appaiono limitate a specifiche età degli animali e transitorie. Viceversa, per quanto riguarda altri parametri, tali modificazioni appaiono più consistenti sia perché evidenziate per un periodo più protratto sia perché interpretabili come significato funzionale, anche in relazione ai risultati di similari ricerche riportate in letteratura. In particolare, risulta interessante l'incremento di responsività linfocitaria sia come produzione di citochine (IFN γ) ma soprattutto come incremento dell'attività proliferativa e metabolica sotto stimolo aspecifico (PHA) che è significativamente aumentata nei soggetti alimentati con *Micronil*[®], rispetto agli animali controllo. Più complessa si propone l'interpretazione del riscontrato incremento della risposta cellulare Micoplasma-specifica evidente sia dopo la prima vaccinazione che dopo il *booster*. È ipotizzabile che le risposte aspecifiche e specifiche aumentate possano essere parzialmente associate se gestite dalle stesse cellule linfocitarie. In effetti, la maggior responsività linfocitaria potrebbe essere messa in relazione con i maggiori valori sistemici riscontrati nel sangue per i linfociti T γ/δ , in quanto si mostra costante per quasi tutto il periodo di osservazione nei suinetti nati da scrofe alimentate con *Micronil*[®] nonché da suinetti nati da scrofe trattate e poi alimentati con tale prodotto. I linfociti T γ/δ sono presenti in elevata percentuale nei giovani suinetti nel sangue fin dalla nascita (Borghetti et al., 2006) e rappresentano cellule atte a rispondere precocemente nell'ambito di una risposta innata a *challenge* di patogeni. La caratteristica fondamentale di tali cellule è che sono rappresentate in maniera importante non solo a livello del sangue ma anche a livello mucosale e soprattutto intestinale (Vega-López et al., 2001) dove, nella specie suina, rappresentano un percentuale elevata dei linfociti intraepiteliali. Inoltre, diversi lavori evidenziano che tali linfociti sono in grado di rispondere con meccanismi di riconoscimento non MHC-mediati a stimoli diversi che includono virus (Olin et al., 2004) e molecole di patogeni [PAMPs (*Pathogen Associated Patterns*)]. Tali cellule sono inoltre fondamentali fonti di produzione di IFN γ durante la risposta immunitaria innata influenzando positivamente l'attivazione di altre cellule quali NK ad azione citotossica naturale verso cellule infettate e la maturazione delle cellule dendritiche atte alla presentazione antigenica.

Si può ipotizzare che i manno-oligosaccaridi, in grado di interagire con i batteri patogeni e di modulare la microflora intestinale saprofitica, possano favorire la maturazione della popolazione macrofagica e linfocitaria intestinale a livello mucosale (Davis et al., 2004) con un possibile effetto anche sistemico. In aggiunta, il β -glucano, costituente della parete di piante, batteri e funghi, è in grado, interagendo con i recettori del riconoscimento tissutale, di modulare la risposta infiammatoria and immunitaria (Dritz et al., 1995; Brown e Gordon, 2003; Wang et al., 2008). Specifici studi, hanno evidenziato che il β -glucano può stimolare la

risposta immunitaria innata e favorire una più intensa risposta immunità al virus della PRRS in quanto in grado di incrementare la produzione di IFN γ (Xiao et al., 2004); recentemente la supplementazione di β -glucano ha dimostrato effetti protettivi nei confronti di infezione da ceppi enterotossigeni di *E. coli* (Stuyven et al., 2008).

Inoltre, l'associazione simbiotica presente nel *Micronil*[®] tra prebiotici (manno-oligosaccaridi e β -glucano) e probiotici (fermenti lattici) potrebbe essere in grado di esaltare l'effetto positivo sia a livello locale che sistemico (Mordenti, 2005).

In conclusione, alla luce di questi preliminari risultati che evidenziano una positiva influenza sulla responsività linfocitaria dei suinetti, ne deriva l'interesse di approfondire ulteriormente le implicazioni funzionali che tale supplementazione simbiotica potrebbe avere in termini di risposta/maturazione immunologica e di *performance* di crescita. Sarebbe pertanto auspicabile incrementare le conoscenze su eventuali modificazioni qualitative e quantitative nel latte delle scrofe alimentate con *Micronil*[®] durante tutta la lattazione, approfondire i dati immunologici in corso di risposte immunitarie specifiche (i.e. vaccinazioni) e su modificazioni ormonali (i.e. asse GH/IGF-1) in relazione alle possibili correlazioni con dati di crescita dei suinetti. Inoltre, tali studi potrebbero fornire informazioni ulteriormente più probanti se condotte anche in presenza di infezione o comunque di scarse condizioni sanitarie e di crescita.

Bibliografia

- 1) Borghetti P., De Angelis E., Saleri R., Cavalli V., Cacchioli A., Corradi A., Mocchegiani E., Martelli P. (2006) Peripheral T lymphocyte changes in neonatal piglets: relationship with growth hormone (GH), prolactin (PRL) and cortisol changes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 110, 17-25.
- 2) Brown G.D. e Gordon S. (2003) Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity*, 19, 311-315.
- 3) Ferrari L., Miduri F., De Angelis E., Grazioli S., Terreni M., Cavalli V., Saleri R., Corradi A., Borghetti P., Martelli P. (2005) Caratterizzazione della tecnica ELISpot per la valutazione funzionale dell'immunità cellulo-mediata nella specie suina. Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini (S.I.P.A.S.), XXXI Meeting Annuale – Mantova, 345-351.
- 4) Davis M.E., Maxwell C.V., Erf G.F., Brown D.C., Wistuba T.J. (2004) Dietary supplementation with phosphorylated mannans improves growth response and modulates immune functions of weanling pigs. *J. Anim. Sci.*, 82, 1882-1891.
- 5) Dritz S.S., Shi J., Kielian T.L., Goodband R.D., Nelssen J.L., Tokach M.D., Chengappa M.M., Smith J.E., Blecha F. (1995) Influence of dietary β -glucan on growth performance, nonspecific immunity and resistance to *Sterptococcus suis* infection in weanling pigs. *J. Anim. Sci.*, 73, 3341-3350.
- 6) Kocher A. (2005) Microflora intestinale e performance dei suinetti. *Suinicoltura*, Z, 96-97.
- 7) Mocchegiani E., Corradi A., Santarelli L., Tibaldi A., DeAngelis E., Borghetti P., Bonomi A., Fabris N., Cabassi E. (1998) Zinc, thymic endocrine activity and mitogen responsiveness (PHA) in piglets exposed to maternal aflatoxicosis B1 and G1. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 62, 245-260.
- 8) Mordenti A.L. (2005) Microflora intestinale e salute. *Large Animals Reviews*, 11, 21-31.
- 9) Olin M.R., Batista L., Xiao Z., Dee S.A., Murtaugh M.P., Pijoan C.C., Molitor T.W. (2005) Gamma-delta lymphocyte response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viral Immunol.* 18, 490-499.
- 10) Pelenc F., Delporte I., Jouglar J.Y. (2004) Effect of feeding supplementation with MICRONIL® on sow performance and behaviour. Proceedings of the 18th IPVS Congress, Hamburg, Germany, 2, 880-881.
- 11) Stuyven E., Cox E., Vancaeneghem S., Arnouts S., Deprez P., Goddeeris B.M. (2008) Effects of β -glucans on a ETEC infection in piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* (in press).
- 12) Thacker E.L., Thacker B.J., Kuhn M., Hawkins P.A., Waters W.R. (2000) Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 61, 1384-1389.
- 13) Xiao Z., Trincado C.A., Murtaugh M.P. (2004) β -Glucan enhancement of T cell IFN γ response in swine. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 102, 315-320.

- 14) Vega-López M.A., Arenas-Contreras G., Bailey M., Gonzalez-Pozos S., Stokes C.R., Ortega M.G., Mondragon-Flores R. (2001) Development of intraepithelial cells in the porcine small intestine. *Dev. Immunol.*, **8**, 147-158.
- 15) Wang Z., Shao Y., Guo Y., Yuan J. (2008) Enhancement of peripheral blood CD8⁺ T cells and classical Swine Fever antibodies by dietary β -1,3/1,6 glucan supplementation in weaned piglets. *Transbound. Emerg. Dis.*, **55**, 369-376.