

ANEXO I

Proyecto de investigación

“Efectos del ácido benzoico y de un probiótico a base de *Enterococcus faecium* NCIMB10415 como promotores de crecimiento en lechones destetados precozmente”

Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam

1.1. Título del Proyecto: Efectos del ácido benzoico y un probiótico a base de *Enterococcus faecium* NCIMB10415 como promotores de crecimiento en lechones destetados precozmente.

1.2. Tipo de investigación: aplicada.

1.3. Campo de aplicación principal: 1299 (Otros: Nutrición Animal).

2.1. Cátedras: Producción Porcina, Nutrición Animal, Bromatología y Patología General. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa.

2.2. Áreas y/o Institutos:

2.3. Otras instituciones: Este proyecto corresponde al trabajo de tesis del Dr. Ariel Succurro, que se halla cursando la Maestría en Salud y Producción Porcina, de la UNRC.

2.4. Integrantes del equipo:

Apellido y Nombre	Función	Cátedra o Institución	Tiempo de dedicación
Pechín, Guillermo H.	Director	Prod. Porcina, Nutr. Animal	20 %
Succurro, Ariel	Integrante	Producción Porcina	50 %
Sánchez, Fabián O.	Integrante	Producción Porcina	50 %
Álvarez, Ángela Rosa	Integrante	Patología General	20 %
Kenny, Osvaldo	Integrante	Patología General	20 %
Otrosky, Roberto	Integrante	Bromatología	20 %

3.1. Duración estimada del proyecto: 24 meses.

3.2. Fecha de iniciación: 1 enero de 2010.

Fecha de finalización: 31 de diciembre de 2011.

4.1. Resumen del proyecto:

El objetivo de este trabajo es comprobar el efecto del ácido benzoico y de un probiótico a base de *Enterococcus faecium* NCIMB10415 sobre los parámetros productivos y de salud intestinal de lechones destetados precozmente. Un total de 600 lechones serán agrupados por camada y por peso, y asignados aleatoriamente a cinco grupos: Control, Control + ácido Benzoico (AB), Control + probiótico, Control + AB + probiótico y Control + colistina (control positivo). Cada grupo experimental quedará conformado por 12 corrales de 10 lechones cada uno. Los lechones serán pesados individualmente al destete (28 días de edad, en promedio), a los 7, 14, 21 y 28 días postdestete, datos que se utilizarán para el cálculo de la ganancia diaria de peso. También semanalmente se medirán el consumo de alimento de cada corral y la conversión alimenticia, y se registrará la incidencia y severidad de diarrea en todos los lotes. Al final del período experimental, se sacrificará un lechón por corral. De los lechones faenados se tomará una muestra de contenido de estómago, duodeno, yeyuno, ileon y ciego para la medición del pH y la determinación del número de bacterias viables totales, bacterias beneficiosas (*Lactobacillus*) y potencialmente patógenas (*Escherichia coli*, *Clostridium*, *Salmonella*). Asimismo, se tomarán muestras de pared intestinal de los mismos sectores para su estudio histológico (altura de vellosidades y profundidad de las criptas en la mucosa).

5.1. Introducción

Desde hace décadas los criaderos intensivos de cerdos vienen practicando el destete precoz de los lechones, con el objeto de mejorar el desempeño reproductivo global de las cerdas. Existe consenso en torno a que un destete entre las 3 y 4 semanas de edad maximiza la cantidad de lechones destetados por cerda y por año, ya que mejora el número de partos/cerda/año, sin afectar negativamente el tamaño de camada (Whittemore, 1996).

Sin embargo, los lechones de esta edad presentan algunas limitantes desde el punto de vista de su fisiología digestiva. De acuerdo a una revisión sobre los numerosos trabajos referidos a la capacidad de digestión y absorción en lechones (Pekas, 1991), los niveles de enzimas proteolíticas y amilolíticas en el tubo digestivo permitirían una considerable digestión de proteínas vegetales y de almidones recién alrededor de la cuarta o quinta semana de edad, aunque estos niveles son todavía más bajos que a la octava semana.

En general, la adición de productos de origen lácteo como leche en polvo deshidratada, suero de queso deshidratado, lactosa, proteínas de suero deshidratadas, etc. (en proporciones del 15 al 25%) a dietas a base de maíz-harina de soja mejora la ganancia de peso y la conversión alimenticia de lechones destetados precozmente, entre las 3 y las 4 semanas de edad (Cera et al., 1988; Cline, 1991; Mahan, 1992). Otros insumos incluidos corrientemente en las dietas de destete precoz, y cuya función es aportar proteínas de alta digestibilidad y con elevado contenido de aminoácidos esenciales, son harina de pescado, plasma porcino o bovino deshidratados, huevo deshidratado, etc.

Por otro lado, un efecto colateral de este tipo de destetes es un incremento en el riesgo de diarrea postdestete, lo que puede causar retardo en el crecimiento, incremento de la mortalidad y costos extras por medicación (Aumaître et al., 1995). Con la intención de prevenir la diarea y mejorar el desempeño productivo, se ha extendido el uso de antibióticos como promotores de crecimiento.

El comienzo del uso de los antibióticos como promotores de crecimiento en aves y cerdos data de 1949 y 1950, respectivamente. El mecanismo exacto de cómo los antibióticos “promueven” el crecimiento no es enteramente claro, pero la investigación en torno al tema confirma el hecho de que permiten que los animales expresen su potencial genético para el crecimiento a través de su efecto sobre las bacterias del aparato digestivo. Otro aspecto a destacar es que las dosis utilizadas como aditivos (entre 2,5 y 50 mg/kg de alimento, según el producto) son mucho más bajas que las dosis utilizadas con fines terapéuticos o profilácticos. Los efectos positivos del uso de los antibióticos como aditivos están ampliamente documentados. Cromwell (1991) presentó los datos de 453 ensayos, realizados con 13.632 cerdos entre los 7 y 25 kg. Los antibióticos mejoraron, en promedio, la ganancia de peso en un 16,4 % y la conversión alimenticia en un 6,9 %.

Sin embargo, el uso continuo de antibióticos como aditivos puede disminuir la eficacia de los mismos para el tratamiento de las enfermedades de los cerdos, a partir de la aparición de fenómenos de resistencia bacteriana. Por otro lado, este riesgo se extiende a la salud pública, ya que existe la posibilidad de que la resistencia generada en las granjas de cerdos pueda afectar a antibióticos claves en medicina humana. Recientemente, la Unión Europea revisó la información técnica disponible y el cambio de actitud social al respecto, y resolvió retirar la gran mayoría de los antibióticos para su uso como aditivos desde agosto de 1999. Impulsados por esta preocupación, y aún antes de que se legislara sobre el tema, varios investigadores comenzaron a explorar la inclusión de aditivos alternativos en las dietas de cerdos, y específicamente de lechones destetados precozmente.

Se ha acumulado una considerable cantidad de investigación en torno a óxido de zinc, sulfato de cobre, probióticos, prebióticos, ácidos orgánicos, extractos vegetales, etc. (Canibe, 2007; Andrade da Veiga, 2008).

El óxido de zinc y el sulfato de cobre a altas dosis han disminuido la incidencia de diarreas posdestete y mejoraron la ganancia de peso en la mayoría de los ensayos, pero la contaminación ambiental generada puede afectar a esta práctica en el futuro (Canibe, 2007).

Distintos ácidos orgánicos han sido utilizados en la dieta de los lechones con el objetivo de superar una insuficiente secreción gástrica de ácido clorhídrico (HCl) y permitir una mejor acción proteolítica en el estómago (Partanen y Mroz, 1999). Por otro lado, los ácidos orgánicos producen una reducción del crecimiento de bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Clostridium* y *Salmonella*, una mejora en la morfología del epitelio intestinal y en la eficiencia de absorción de nutrientes, y, en algunos casos, efectos metabólicos. Una revisión realizada sobre una cantidad de trabajos publicados (Revindran y Kornegay, 1993) revela una considerable variación en la respuesta a la acidificación en la dietas de los lechones destetados. Varias razones fueron propuestas para explicar las inconsistencias en las respuestas, incluyendo el tipo de dieta, la edad de los cerdos, el tipo y nivel del acidificante, las condiciones sanitarias y, por lo tanto, los niveles de desempeño alcanzados previamente.

La actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos está relacionada con la reducción del pH del medio y con su capacidad para disociarse, lo que está determinado por la constante pKa de cada ácido. Los ácidos orgánicos son liposolubles cuando están en forma no disociada, por lo que son capaces de atravesar la pared microbiana. Una vez en el interior, que es un ambiente alcalino, liberan el protón y el pH intracelular disminuye. Esto afecta el metabolismo bacteriano, inhibiendo la actividad de enzimas y, además, hace que la célula use energía para deshacerse de los protones y se acumulen aniones en el interior (Cherrington et al., 1991; Russell, 1992). La reducción del pH gástrico no parece ser un efecto primariamente alcanzado en todos los trabajos, pero, en relación con la acción planteada anteriormente, el uso de ácidos orgánicos, disminuyó consistentemente el crecimiento de las bacterias coliformes en el tracto gastrointestinal.

Los ácidos orgánicos más utilizados en los ensayos fueron el cítrico, fumárico, acético, láctico, fórmico, butírico y benzoico con concentraciones dietarias que fluctuaron entre el 1 y el 3% (Giesting y Easter, 1985; Radecki et al., 1988; Roth, 2000).

En un ensayo “in vitro” realizado por Knarreborg et al. (2002) con digesta gástrica e intestinal de cerdos, se comparó la acción de seis ácidos orgánicos, a la misma concentración: fórmico, propiónico, butírico, láctico, benzoico y fumárico. El ácido benzoico mostró el mayor efecto antibacteriano, tanto hacia coliformes como hacia bacterias ácido lácticas, en contenido gástrico y de intestino delgado. Este ácido es de un uso relativamente nuevo en dietas de cerdos destetados y los niveles de inclusión necesarios son considerablemente más bajos que en el caso de otros ácidos orgánicos. Kluge et al. (2006) hallaron un aumento en el consumo de alimento y una reducción en el número de bacterias en los segmentos proximales del tubo digestivo de lechones alimentados con dietas suplementadas con 0,5-1 % de ácido benzoico comparadas con una dieta control sin ácidos.

Por otro lado, también se han investigado los efectos de los ácidos orgánicos sobre la histomorfología del intestino. Los mismos pueden prevenir, al menos en parte, el acortamiento de las vellosidades intestinales en el período postdestete por un efecto directo sobre la proliferación celular (especialmente ácidos butírico y acético) o por un efecto indirecto, a través de su acción sobre la microflora intestinal (Partanen y Mroz, 1999).

Los probióticos han sido definidos por Schrezenmeir y de Vrese, 2001) como “productos que contienen microorganismos viables y definidos, en suficiente número, que alteran la microflora (por implantación o colonización) en un compartimento del hospedador y así ejercen efectos beneficiosos sobre él”. Distintos probióticos han sido usados, en los últimos años, en lechones destetados precozmente (Canibe, 2007; Lallès et al., 2007), con resultados variables: *Saccharomyces boulardii*, *S. cerevisiae*, *Bacillus cereus*, var. canon y var. toyoi,

Escherichia coli cepa Nissle 1917, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus sobrius*, *L. reuteri* y *L. rhamnosus*.

Las principales características de un probiótico son: capacidad para adherirse a la mucosa intestinal e inhibir la adhesión de bacterias patógenas, habilidad para colonizar transitoriamente y proliferar en el intestino, prevención de algunas enfermedades intestinales como diarrea y modulación del sistema inmunitario del huésped (Teitelbaum y Walker, 2002).

La infección por *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) es una de las principales causas de diarrea en lechones lactantes y luego del destete, y la mayoría de las cepas expresan la adhesina fimbrial K88. El uso de algunos probióticos ha permitido reducir la colonización de bacterias patogénicas en el intestino y la gravedad de la diarrea (Roselli et al., 2005). Jin y Zhao (2000) demostraron que *E. faecium* es capaz de inhibir la adhesión de ETEC K88 a la mucosa intestinal de los lechones, tal vez a partir de un mecanismo de obstáculo estérico, ya que ambas bacterias no se unen al mismo dominio del receptor. Otros probióticos (*Lactobacillus plantarum* y *L. rhamnosus*) producen una inhibición de la adhesión de *E. coli* enteropatógena (EPEC) induciendo la expresión de los genes de la mucina, MUC-2 y MUC-3 (Mack et al., 1999). Diversos trabajos sugieren que los probióticos también interfieren con diferentes pasos del proceso inflamatorio, por ejemplo regulando el balance de las poblaciones de linfocitos Th1 y Th2 o actuando sobre las quimocinas involucradas en el reclutamiento de células inflamatorias (Roselli et al., 2005).

Los probióticos (entre los cuales se encuentran *E. faecium* y varias especies de *Lactobacillus*) han sido usados durante décadas para el tratamiento y prevención de enfermedades diarreicas de distinta etiología en seres humanos (de Vrese y Marteau, 2007). En lechones, los ensayos con *E. faecium* son relativamente recientes, pero muestran resultados promisorios. Taras et al. (2006) utilizaron *E. faecium* NCIMB 10415 en la dieta de las cerdas y los lechones y hallaron una reducción significativa en la incidencia y la duración de la diarrea post-destete, pero el tratamiento no mejoró la ganancia de peso de los lechones. En otro ensayo (Scharek et al., 2005), el uso de esta cepa de *E. faecium* produjo una disminución acentuada en la frecuencia de *E. coli* beta hemolítica y *E. coli* serovar O141 en contenido intestinal de lechones y una reducción de la población de linfocitos T citotóxicos (CD8+) en el epitelio del jejunio. Sin embargo, los efectos de este probiótico sobre los parámetros de inmunidad humoral (Broom et al., 2006) y sobre el transporte de nutrientes y las funciones de barrera del intestino delgado (Lodemann et al., 2006) no parecen claros hasta el momento.

Luego del análisis de la bibliografía reciente, resulta de interés continuar los ensayos con ácido benzoico debido a su comprobado efecto a bajas concentraciones en las dietas de lechones destetados, así como también investigar la inclusión de *E. faecium* NCIMB 10415 en estas dietas y los posibles efectos sinérgicos provenientes del uso conjunto de ambos aditivos.

5.2. Resultados alcanzados por el/los autores dentro del área del conocimiento del proyecto:

- Pechin, G.H.; Sánchez, F.O.; Fournier, M.T.; Cesán, R.O. 1998. Efecto de la administración de hierro dextrano sobre la ganancia de peso y parámetros sanguíneos, relacionados con el metabolismo del hierro, en lechones lactantes con acceso a tierra. Revista de Medicina Veterinaria 79: 118-120.

- Pechin, G.H.; Sánchez, F.O.; Álvarez, H.R. 2003. Efectos de la adición de suero de queso deshidratado en dietas de lechones destetados a los 30 días de edad. Ciencia Veterinaria 5: 29-33.

6.1. Hipótesis, objetivos y resultados esperados:

Hipótesis:

Nuestra hipótesis de trabajo es que la adición de ácido benzoico y de un probiótico a base de *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 en la dieta de lechones destetados precozmente disminuye la población de bacterias potencialmente patógenas, incrementa la superficie absorbente de intestino delgado y grueso, disminuye la incidencia y gravedad de las diarreas y mejora el desempeño productivo de los animales.

Objetivos generales:

Comprobar los efectos de la adición de ácido benzoico, un probiótico a base de *Enterococcus faecium* o una combinación de ambos en la dieta de lechones destetados a los 28 días de edad sobre variables productivas y parámetros relacionados con la microbiología e histología del intestino.

Objetivos particulares:

- Verificar el efecto de la adición de ácido benzoico, un probiótico a base de *Enterococcus faecium* o una combinación de ambos en la dieta de lechones destetados precozmente sobre la ganancia de peso, el consumo de alimento, la conversión alimenticia y la incidencia y gravedad de la diarrea durante las primeras cuatro semanas post-destete.
- Estudiar el efecto de estos aditivos sobre el pH, la histo-morfología del epitelio y el número de bacterias totales, de bacterias benéficas y potencialmente patógenas en los diferentes sectores del tracto digestivo de los lechones.

Resultados esperados:

Básicamente, se espera una mejora comprobable en los parámetros de interés productivo de lechones destetados precozmente y de los indicadores de salud intestinal que puedan explicar el efecto promotor de crecimiento.

6.2. Materiales y Métodos:

Seiscientos lechones (identificados individualmente con caravana numerada) serán agrupados por camada y por peso, y asignados aleatoriamente a cinco grupos:

- 1) Dieta base: control negativo, dieta sin aditivos.
- 2) Dieta base + ácido benzoico al 1 % (VevoVitall, DSM Nutritional Products).
- 3) Dieta base + *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (140 g/Tn de un producto comercial que contiene 1×10^{10} UFC/g, Cylactin, DSM Nutritional Products).
- 4) Dieta base + ácido benzoico al 1 % + *Enterococcus faecium* NCIMB 10415.

5) Dieta base + colistina (como sulfato de colistina) a razón de 300 mg/kg durante la primera semana post-destete y 50 mg/kg durante las tres semanas subsiguientes (control positivo).

Se trabajará simultáneamente con 5 corrales de 10 lechones cada uno. Las tandas se repetirán de manera de totalizar 12 repeticiones sucesivas.

La dieta base será formulada de acuerdo a los requerimientos del NRC, 1998 (Tabla 1).

Los lechones serán pesados individualmente al destete (28 días de edad), y luego semanalmente, hasta la cuarta semana postdestete, datos que se utilizarán para el cálculo de la ganancia diaria de peso (GDP) total y durante cada período. El consumo de alimento de cada corral será medido semanalmente, para calcular el consumo acumulado y la conversión alimenticia durante las semanas 1, 2, 3 y 4 del ensayo. También se registrará la incidencia de diarrea, la gravedad de la misma (pastosa o líquida) y su duración en todos los lotes, en los cuatro períodos.

Al final del período experimental, se sacrificará un lechón por corral. Dentro de los veinte minutos del sacrificio, se tomarán dos muestras de contenido de estómago, duodeno (10 cm a partir del estómago), yeyuno (60 cm desde el estómago), ileon (15 cm del ciego) y ciego porción media). En la primera muestra se realizará in situ, inmediatamente después de la recolección, la medición del pH mediante un peachímetro digital (PH208, Schwyz, Suiza). Una segunda muestra (10 g) de cada sección será asépticamente recolectada, almacenada en recipientes estériles que serán conservados refrigerados y luego transportados al laboratorio dentro de las tres horas. Luego de su cultivo en medios específicos (FDA, 1998; ICMSF, 2001), se determinará el número de bacterias viables totales, de bacterias beneficiosas (*Lactobacillus*) y de bacterias potencialmente patógenas (*Escherichia coli*, *Clostridium*, *Salmonella*). Asimismo, se tomarán muestras de pared intestinal de los cuatro sectores, en forma de anillos de 1 cm de largo, las que serán fijadas en formol bufferado al 10% y procesadas en el Laboratorio de Histopatología con las técnicas de rutina (inclusión con parafina, tinción con hematoxilina-eosina) para su estudio histológico. La medición de altura de las vellosidades y profundidad de las criptas en la mucosa se realizará con un microscopio óptico conectado a una computadora a través de una cámara digital Moticon 1000 mediante la utilización del programa de captación de imágenes Moticon Images Plus 2.0 (Ted Pella, Inc., Redding, California, USA) y del programa de análisis de imágenes Scion Image 2.0 for Windows (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA).

Tabla 1. Composición de la dieta base.

Alimento	Participación en la dieta (%)	
	Semanas 1-2	Semanas 3-4
Maíz	54,9	65,69
Pellet de soja, 44% Proteína	25	27
Harina de sangre	5	5
Plasma bovino deshidratado	3	--
Suero de queso deshidratado	10	--
Ceniza de hueso	1,0	1,74
Carbonato de calcio	0,6	0,07
Sal común	0,3	0,3
Núcleo Mineral-Vitamínico	0,2	0,2

Diseño experimental y análisis estadístico:

Los parámetros GDP, consumo de alimento, conversión alimenticia, así como la duración de los períodos con heces de consistencia disminuida, serán analizados estadísticamente utilizando un ANOVA con un diseño completamente aleatorizado, considerando los efectos de tratamiento, tiempo e interacción tratamiento x tiempo. El número de bacterias por gramo de contenido gástrico o intestinal y las mediciones en mucosa intestinal serán comparados utilizando un ANOVA simple, con un test de Tuckey para comparación de medias. La incidencia de cada tipo de diarrea en los grupos será comparada utilizando una prueba de X^2 .

6.3. Formación de recursos humanos:

Además del Dr. Ariel Succurro, quien se halla cursando la Maestría en Salud y Producción Porcina (UNRC), el trabajo de investigación contará con la participación de dos adscriptos a la Cátedra de Nutrición Animal de la Fac. de Cs. Veterinarias (UNLPam): el MV Enzo Malvica (DNI N° 27.167.988), de la actividad privada, y el Sr. Gabriel Genero (DNI N° 31.276.119), alumno del último año de nuestra carrera.

7.1. Infraestructura (ya existente):

Laboratorio de Patología.

Laboratorio de Bromatología.

8.1. Presupuesto estimado para el proyecto:

Item	Monto
Jarra de anaerobios de dos placas	\$ 625
Jarra de anaerobios de 12 placas	\$ 2.800
Medidor de oxígeno	\$ 3.800
Medidor de conductividad y temperatura	\$ 2.950
Peachímetro	\$ 2.350
Insumos para laboratorio de microbiología	\$ 1.806
Insumos para laboratorio de histopatología	\$ 4.800
Combustible para viajes a criadero	\$ 3.000
Bibliografía	\$ 1.500
Participación en Congresos	\$ 1.500
Varios	\$ 1.000
TOTAL	\$ 26.131

Detalle de insumos para laboratorio de microbiología

Agar nutritivo, 500 g	\$ 380
Agar violeta rojo bilis lactosa, 500 g	\$ 277
Agar Mc Conkey, 500 g	\$ 233
Caldo Mc Conkey, 500 g	\$ 186
Agar papa glucosada, 500 g	\$ 253
Cajas de Petri, plásticas, de 60 mm, 100 unidades	\$ 43
Placas de Petri, vidrio, 40 unidades	\$ 314
Tubos de ensayo, vidrio, 16 x 150 mm, 100 unidades	\$ 120
Subtotal	\$ 1.806

Nota:

Todos los insumos para la fabricación de los alimentos balanceados serán provistos por el propietario del criadero de cerdos.

Los aditivos (ácido benzoico, probiótico y antibiótico) serán provistos por la firma Fusión Pampa S.R.L. (General Rodríguez, pcia. de Bs. As., Argentina).

9. Bibliografía:

- Andrade da Veiga, A. 2008. Promoviendo el crecimiento naturalmente. Memorias del IX Congreso Nacional de Producción Porcina. Potrero de los Funes, 26 al 28 de mayo de 2008. p. 63-73.
- Aumaître, A.; Peiniau, J.; Madec, F. 1995. Digestive adaptation after weaning and nutritional consequences in th piglets. *Pig News Inf.* 16: 73N-79N.
- Broom, L.J.; Miller, H.M.; Kerr, K.G.; Knapp, J.S. 2006. Effects of zinc oxide and *Enterococcus faecium* SF68 dietary supplementation on the performance, intestinal microbiota and immune status of weaned piglets. *Res. Vet. Sci.* 80: 45-54.
- Canibe, N. 2007. Alimentación de lechones. 1. Sistemas de alimentación y aditivos en piensos de iniciación. XXIII Curso de Especialización FEDNA. Memorias del curso, p. 179-212.
- Cera, K.R.; Mahan, D.C.; Reinhardt, G.A. 1988. Effects of dietary dried whey and corn oil on weanling pig performance, fat digestibility and nitrogen utilization. *J. Anim. Sci.* 66: 1438-1445.
- Cherrington, C.A.; Hinton, M.; Mead, G.C.; Choppra, I. 1991. Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. *Adv. Microbial Physiol.* 32: 87-108.
- Cline, T.R. 1991. Chapter 30. Feeding pigs weaned at three to four weeks of age. In: *Swine Nutrition*. Eds: E.R. Miller, D.E. Ullrey and A.J. Lewis. Butterworth-Heinemann. Boston. USA. p. 497-508.
- Cromwell, G.L. 1991. Chapter 17. Antimicrobial agents. In: *Swine Nutrition*. Eds: E.R. Miller, D.E. Ullrey and A.J. Lewis. Butterworth-Heinemann. Boston. USA. p. 297-314.
- de Vrese, M.; Marteau, P.R. 2007. Probiotics and prebiotics: Effects on diarrhea. *J. Nutr.* 137: 803S-811S.
- FDA (Food and Drug Administration). 1998. *Bacteriological Analytical Manual*. 8th. Edition. AOAC International. Gaithersburg, USA.
- Giesting, D.W.; Easter, R.A. 1985. Response of starter pigs to supplementation of corn-soyabean meal diets with organic acids. *J. Anim. Sci.* 60: 1288-1294.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). 2001. *Microorganismos de los alimentos. Características de los patógenos microbianos*. Vol. 5. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- Jin, L.Z.; Zhao, X. 2000. Intestinal receptor for adhesive fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88 in swine – a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 311-318.
- Kluge, H.; Broz, J.; Eder, K. 2006. Effect of benzoic acid on growth performance, nutrient digestibility, nitrogen balance, gastrointestinal microflora and parameters of microbial metabolism in piglets. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berlin)* 90: 316-324.
- Knarreborg, G.; Miquel, N.; Granli, T.; Jensen, B.B. 2002. Establishment and application on an in vitro methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets. *Anim. Feed Sci. Techn.* 99: 131-140.
- Lallès, J.-P.; Bosi, P.; Smidt, H., Stokes, C.R. 2007. Weaning. A challenge to gut physiologists. *Livestock Sci.* 108: 82-93.

- Lodemann, U.; Hübener, K.; Jansen, N.; Martens, H. 2006. Effects of *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 as probiotic supplement on intestinal transport and barrier function of piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 60: 35-48.
- Mack, D.R.; Michail, S.; Wei, S.; McDougall, L.; Hollingsworth, M.A. 1999. Probiotic inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am. J. Physiol.* 276: G941-G950.
- Mahan, D.C. 1992. Efficacy of dried whey and its lactalbumin and lactose components at two dietary lysine levels on postweaning pig performance and nitrogen balance. *J. Anim. Sci.* 70: 2182-2187.
- National Research Council. 1998. Nutrient Requirements of Swine. Tenth Revised Edition. National Academy Press. Washington, D.C. USA.
- Partanen, K.H.; Mroz, Z. 1999. Organic acid for performance enhancement in pig diets. *Nutr. Res. Rev.* 12: 117-145.
- Pekas, J.C. 1991. Chapter 3. Digestion and absorption capacity and their development. In: *Swine Nutrition*. Eds: E.R. Miller, D.E. Ullrey and A.J. Lewis. Butterworth-Heinemann. Boston. USA. p. 37-74.
- Radecki, S.V.; Juhl, M.R.; Miller, E.R. 1988. Fumaric and citric acids as feed additives in starter pig diets: effect on performance and nutrient balance. *J. Anim. Sci.* 66: 2598-2605.
- Ravindran, V.; Kornegay, E.T. 1993. Acidification of weaned pig diets. A review. *J. Sci. Food Agric.* 62: 313-322.
- Roselli, M.; Finamore, A.; Britti, M.S.; Bosi, P.; Oswald, I.; Mengheri, E. 2005. Alternatives to in-feed antibiotics in pigs: Evaluation of probiotics, zinc or organic acids as protective agents for the intestinal mucosa. A comparison of in vitro and in vivo results. *Anim. Res.* 54: 203-218.
- Roth F.X. 2000. Ácidos orgánicos en nutrición porcina. Eficacia y modos de acción. XVI Curso de Especialización FEDNA. Memorias del Curso. p. 169-181.
- Russell, J.B. 1992. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *J. Appl. Bact.* 73: 363-370.
- Scharek, L.; Guth, J.; Reiter, K.; Weyrauch, K.D.; Taras, D.; Schwerk, P.; Schierack, P.; Schmidt, M.F.; Wieler, L.H.; Tedin, K. 2005. Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 105: 151-161.
- Schrezenmeir, J.; de Vrese, M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (Suppl.): 361S-364S.
- Taras, D.; Vahjen, W.; Macha, M.; Simon, O. 2007. Performance, diarrhea incidence, and occurrence of *Escherichia coli* virulence genes during long-term administration of a probiotic *Enterococcus faecium* strain to sows and piglets. *J. Anim. Sci.* 84: 608-617.
- Teitelbaum, J.E.; Walker, W.A. 2002. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annu. Rev. Nutr.* 22: 107-138.
- Whittemore, C.T. 1996. *Ciencia y práctica de la producción porcina*. Primera Edición. Editorial Acribia.