



Parámetros productivos, inmunidad innata sérica y de la mucosa digestiva de gazapos alimentados con dietas suplementadas con bacitracina de zinc o ácidos orgánicos protegidos

Performance, serum innate and digestive mucosal immunity of young rabbits fed diets supplemented with zinc bacitracine or protected organic acids

Rebollar P.G.¹, Cardinali R.², Moscati L.³, Battistacci L.³, Scicutella N.⁴, Dal Bosco A.² and Castellini C.²

¹Departamento de Producción Animal, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid. C Elect: pilar.grebollar@upm.es

²Dpto. BVBAZ, Universidad de Perugia (Italy), Facultad de Agraria, Borgo XX Giugno 74. 06100 Perugia. C Elect: rcardinali@inwind.it

³ IZS Umbria e Marche, Via Salvemini 1. 06100 Perugia. C Elect: l.moscati@izsum.it

⁴ SODA Feed Ingredients, 7 rue du Gabian. 98000 Monaco. C Elect: nicola.scicutella@soda-ingredients.com

Resumen

La adición de ácidos orgánicos e inorgánicos a las dietas de gazapos puede ser una alternativa al empleo de antibióticos. Su efecto sobre la inmunidad innata y el desarrollo del tejido linfoide localizado a nivel intestinal ha sido objeto de este estudio. Se han empleado 120 gazapos destetados (27 días), distribuidos en tres grupos que fueron alimentados hasta los 65 días de edad con una dieta control (ED 105 Mj/Kg; PB 178g/kg; E.E. 27g/kg), la misma dieta con 150 ppm de bacitracina de zinc o 0,4% de FormaXol™ (mezcla de formato de calcio, ácido cítrico y aceites esenciales microencapsulados). Finalmente, y hasta los 80 días de edad, en la segunda se retiró el antibiótico y en la tercera se incluyó 0,1% de AciXol™ (mezcla de ácido cítrico, fumárico, ortofosfórico, málico y aceites esenciales microencapsulados). Los parámetros productivos no se vieron afectados pero la mortalidad fue superior en los animales de la dieta control con respecto a los de la dieta con antibiótico, siendo intermedia en la acidificada. Los parámetros valorados para determinar la inmunidad innata sérica correspondieron con animales con una aceptable respuesta y con concentraciones que podrían ser indicio de enfermedades subclínicas. En el estudio histológico de la mucosa intestinal se observó un desarrollo normal del tejido linfoide acorde a la edad de los animales y similar entre grupos. Se observó un marcado acortamiento de la longitud de las vellosidades intestinales y lesiones de la mucosa similares a las que se describen en respuesta a un proceso infeccioso vírico o bacteriano. Sin embargo, en los animales alimentados con las dietas que contenían la combinación de ácidos orgánicos protegidos junto con aceites esenciales la longitud de las vellosidades intestinales fue estadísticamente mayor en ambos periodos ($P < 0,05$) que en el grupo control y similares a las del grupo suplementado con bacitracina, indicando que podrían ser una buena alternativa a los antibióticos en las dietas de gazapos destetados.

Palabras clave: inmunidad innata, tejido linfoide asociado a intestino, ácidos orgánicos, bacitracina de zinc.

Abstract

The supplementation of diets fed for young rabbits with organics acids can be a good alternative to antibiotics. The aim of this study was to know their effect on the innate immunity and on the lymphoid tissue associated to intestine. A total of 120 young weaned rabbits (27 days) were distributed into three groups: a control group fed till 65 days of age with a control diet (ED 105 Mj/Kg; PB 178 g/kg; E.E. 27 g/kg), a second group fed with the same diet supplemented with 150 ppm of Zinc Bacitracine and a third group fed with FormaXol™ (blend of microencapsulated Ca formate, citric acid along with essential oils) at 0.4%. Finally, in the period 65 - 80 days of



age, the antibiotic was removed in the second group whilst in the third group, AciXolTM (blend of microencapsulated fumaric, citric, orthophosphoric, malic acids along with essential oils) at 0.1% was added in replacement of FormaXolTM. Performance was similar between groups, but mortality was higher in control group, being intermediate in FormaXolTM group. Serum innate immunity parameters indicated a good immune response and it could be related to subclinical disease. Histological studies showed a normal lymphoid tissue development in accordance to age of animals and similar between groups. Marked *villi* shortening and erosive mucosa aspect in accordance to lesions produced in response to virus or bacteria were observed. However, in both periods, animals fed with diets containing the blends of protected organic acids along with essential oils allowed to achieve better values of villi height ($P < 0,05$) than control group and similar to the diet supplemented with bacitracine, indicating that their integration could be a good alternative to antibiotics in weaned rabbit diets.

Key words: innate immunity, GALT, organic acids, Zinc Bacitracine.

Introducción

Los problemas digestivos son responsables de una significativa morbilidad en gazapos, caracterizada por un retraso en el crecimiento y deficientes índices de conversión que a menudo desencadenan más pérdidas económicas que la propia mortalidad. En las granjas cunícolas el destete es una de las fases más críticas.

La inmunidad innata es el conjunto de mecanismos que existen antes de la infección, respondiendo rápidamente y de la misma manera frente a infecciones repetidas, formando así la primera línea de defensa de la respuesta inmune que tiene una significativa correlación con el estado sanitario del animal (Moscati et al., 2003). La mucosa intestinal está especialmente constituida para participar en esta respuesta y gracias a su tejido linfóide funciona como una barrera eficaz que distingue entre nutrientes y flora no patógena de otra que potencialmente puede serlo (Magalhaes et al., 2007).

Debido a la incidencia de procesos digestivos diarreicos en los gazapos, los antibióticos se emplean de manera preventiva o como promotores del crecimiento, pero pueden modificar la flora intestinal, alterando el metabolismo y la fermentación bacteriana (Pinheiro et al., 2004). Uno de los antibióticos más empleados en cunicultura es la bacitracina de zinc. Las resistencias en los animales y, a la larga, en los humanos que consumen estas carnes aconseja la reducción en su empleo.

La adición de ácidos orgánicos o de sus sales a las dietas es una alternativa, y en cerdos se ha observado que reduce la frecuencia de diarreas post-destete y la aparición de bacterias enteropatógenas en el estómago (Hansen et al., 2007). El objetivo de este trabajo es valorar el efecto de la adición de bacitracina de zinc o de ácidos orgánicos e inorgánicos sobre los parámetros productivos y el estado sanitario de gazapos a través del estudio de su inmunidad innata sérica y del desarrollo del tejido linfóide asociado a nivel de la mucosa intestinal.

Material y métodos

Un total de 120 gazapos destetados con 27 días de edad, alojados en la granja experimental del Dpto. de Biología vegetal, Biotecnología Agroambiental y Zootécnica de la Universidad de Perugia (Italia) se distribuyeron al azar en tres grupos. El grupo Control recibió un pienso formulado de acuerdo a las necesidades nutritivas para gazapos descritas por De Blas y Wisemann (1998), (Energía Digestible 105 Mj/Kg; Proteína Bruta 178g/kg; Extracto Etéreo 27g/kg). Un segundo grupo (BC) recibió el mismo pienso suplementado con Bacitracina de Zinc (150ppm) y un tercero (F/A), con un 0,4% de FormaXolTM (mezcla de formato de calcio, ácido cítrico y aceites esenciales microencapsulados). Desde los 65 hasta los 80 días de edad, los gazapos que consumían el pienso



medicado con bacitracina de zinc pasaron a consumir pienso control y los que consumían el pienso con FormaXol™ pasaron a consumir el pienso suplementado con un 0,1 % de AciXol™ (mezcla de ácido cítrico, fumárico, ortofosfórico, málico y aceites esenciales microencapsulados). Los parámetros productivos que se determinaron fueron: el consumo de alimento, la ganancia media diaria, el índice de conversión y la mortalidad. Para estudiar el efecto de las dietas sobre la morfología de la mucosa intestinal y el desarrollo del tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal se sacrificaron 5 animales al destete, y otros 5 de cada grupo a los 65 y a los 80 días de edad. Se tomó una porción de yeyuno (5 cm), una Placa de Peyer (PP) y el Apéndice Vermiforme (AV) de cada animal conservadas en una solución al 10% de formaldehído. En el Departamento de Producción Animal de la UPM (España), se procesaron, se tiñeron con hematoxilina eosina y se analizaron mediante microscopía óptica, con la ayuda de un sistema de análisis de imágenes (ImageJ v 1.26 Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA). En cada animal se determinó la longitud de las vellosidades yeyunales según Hampson (1986) y el área linfoide de la PP, del AV y de sus folículos según Castellini et al. (2007). Para evaluar la inmunidad innata se tomaron muestras de sangre por punción cardiaca a otros 5 animales por grupo y a diferentes edades (27, 35, 65 y 80 días). En el suero se determinaron los niveles de lisozima de acuerdo a Osseman and Lawlor (1966), para explicar un posible estado inflamatorio. Se realizó el análisis del sistema del complemento (HCA) de acuerdo a Barta y Barta (1993), para explicar la capacidad defensiva del animal a patógenos ambientales. Por último, se determinó la actividad bactericida sérica (SBA) o capacidad del suero para inhibir el crecimiento bacteriano de acuerdo a Amadori et al. (1997). Para realizar el análisis estadístico se empleó el paquete estadístico SAS (SAS, 1999). El efecto de los tratamientos sobre los parámetros productivos de los gazapos y sobre el tejido linfoide intestinal se analizó mediante un análisis de varianza con el procedimiento PROC GLM. La mortalidad se analizó con un test χ^2 .

Resultados y discusión

Los parámetros productivos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros productivos de gazapos alimentados con un pienso control (C), suplementado con Bacitracina de Zinc (BC) o con mezcla de acidificantes y aceites esenciales microencapsulados (F/A).

		Tratamientos			
		C	BC	F/A	DE
Peso vivo al inicio (27 d)	g	930	880	910	124
Peso vivo final (80d)	"	2680	2720	2710	245
Ganancia media diaria	g/d	33,0	34,7	34,0	6,1
Mortalidad	%	14,3 ^B	2,8 ^A	8,6 ^{AB}	3,3
Índice de conversión		3,7	3,3	3,4	0,8

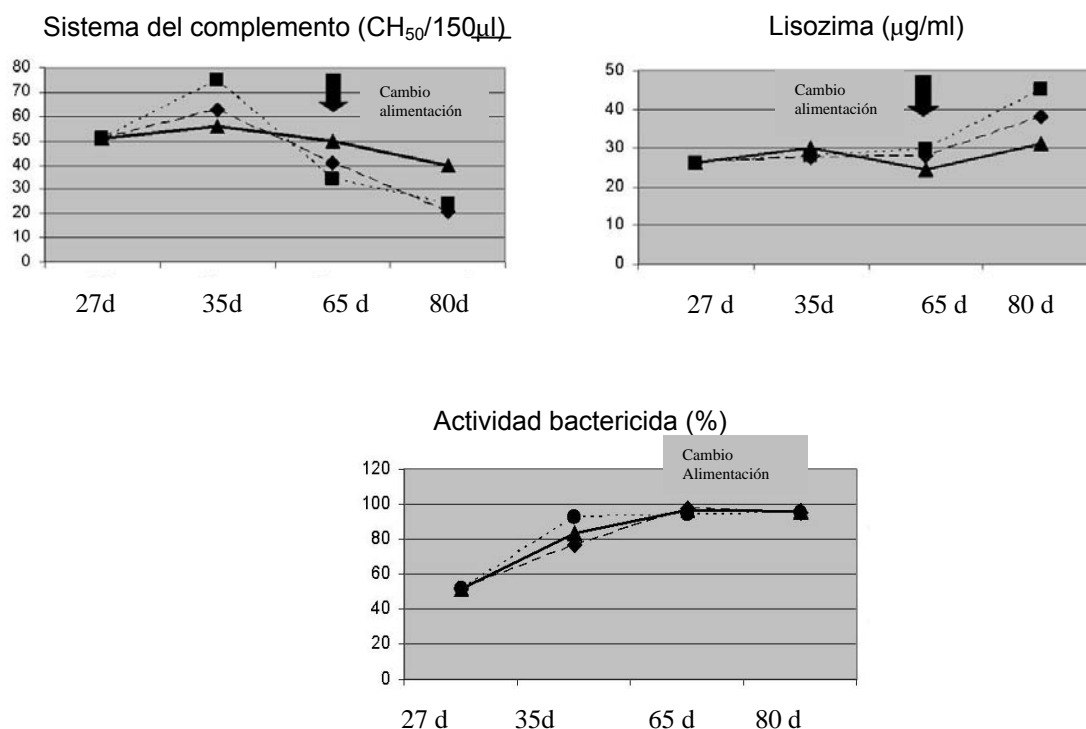
(A,B): P < 0,01; DE: desviación estándar

No hubo diferencias significativas entre tratamientos en lo que se refiere al peso, a la ganancia media diaria o al índice de conversión. Sin embargo, la mortalidad se redujo un 40% y un 80% en el grupo F/A y en el grupo BC (P < 0,01) respectivamente, con respecto al grupo control. Aunque existen otros estudios realizados en cerdos y pollos que han demostrado la eficacia de los acidificantes sobre los parámetros productivos (Dibner and Buttin, 2002; Partanen et al., 2002), nuestros resultados concuerdan con Scapinello et al. (2001), quienes, en conejos, observaron que los acidificantes (2% ácido fumárico) no afectaban a los parámetros productivos.



Los tratamientos influyeron de algún modo sobre los tres parámetros empleados para determinar la inmunidad innata del animal (Figura 1).

Figura 1. Evolución de los resultados del análisis del sistema del Complemento, de los niveles séricos de Lisozima y de la actividad bactericida del suero a lo largo del experimento en gazapos alimentados con un pienso control (C ---◆---), suplementado con Bacitracina de Zinc (BC ---■---) o con una mezcla de acidificantes y aceites esenciales microencapsulados (F/A ▲).



El análisis del complemento es un test que indica el riesgo de inicio de un proceso infeccioso o la existencia de patologías en un animal. Nuestros resultados indican que la respuesta inmune innata de los animales analizados se encontraba en un buen estado, ya que estos parámetros suelen tener unos valores medios de 51,30 CH₅₀/150µl, según Moscati et al. (datos no publicados). En particular, en el grupo F/A se observa una evolución de este parámetro a lo largo del tiempo sin incrementos o descensos bruscos. En el grupo BC se observa una evolución más irregular ya que destaca un incremento significativo de los valores del sistema del complemento en un primer periodo y un drástico descenso cuando se realiza el cambio de alimentación.

La Lisozima sérica tiene una fuerte acción bactericida (frente a Gram +), así como una acción sinérgica con la respuesta inmune humoral y con factores séricos del complemento (Carrol and Martínez, 1979). El valor sérico medio en conejos en un estudio preliminar fue de 26,06 µg/ml (Moscati et al., datos no publicados). En este trabajo los niveles de Lisozima y el sistema del complemento estuvieron inversamente correlacionados entre si, probablemente debido a la presencia de procesos inflamatorios subclínicos que podrían aumentar la liberación de lisozima, tal y como describe Moscati et al. (2003). El incremento en los niveles de lisozima observados sobre todo en el grupo BC en los últimos muestreos se podría deber probablemente a la retirada del antibiótico de la dieta a partir del día 65 de edad.



La actividad bactericida sérica es uno de los más importantes parámetros indicadores de inmunidad innata y modula la concentración de anticuerpos naturales elaborados frente a los agentes bacterianos más difundidos, principalmente de bacterias Gram-. Este parámetro muestra buenos valores, describiendo una tendencia regular a pesar de los cambios de alimentación. Todos estos parámetros relativos al estado inmunitario suelen verse afectados por las condiciones ambientales y de manejo a las que son sometidos los animales en los sistemas de producción, tal y como se ha descrito en cerdos (Moscati et al., 2003) y en vacas de leche (Amadori et al., 1997), donde una alteración del sistema inmune puede afectar tanto al estado sanitario del animal como a sus parámetros productivos.

Los resultados de los parámetros histológicos y del tejido linfoide asociado a intestino se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Parámetros histológicos y dimensiones del tejido linfoide asociado a intestino en gazapos de diferentes edades alimentados con un pienso control, suplementado con Bacitracina de Zinc o con Ácidos orgánicos.

Destete		Media ± DE			
Altura villi	□m				
Placa de Peyer (área)	mm ²				
Ap. Vermiforme (área)	"				
Fol.Linf. del AV (área)	"				
65 días de edad		C	BC	F/A	DEE
Altura villi	□m	301,15 ^a	384,25 ^{ab}	404,28 ^b	124,42
Placa de Peyer (área)	mm ²	13,01	17,06	11,81	2,42
Ap. Vermiforme (área)	"	52,56	50,47	52,41	3,45
Fol.Linf. del AV (área)	"	1,51	1,48	1,56	0,15
80 días de edad					
Altura villi	□m	359,70 ^a	429,69 ^{ab}	464,10 ^b	155,82
Placa de Peyer (área)	mm ²	16,90	18,61	11,42	3,27
Ap. Vermiforme(área)	"	80,25	78,95	81,58	0,42
Fol.Linf. del AV (área)	"	2,23	2,51	2,52	2,92

a,b P<0,05, DEE desviación estándar del error

Solamente se observó un tamaño ligeramente más alto de las vellosidades intestinales en los animales del grupo F/A a los 65 y a los 80 días de edad con respecto al grupo C. En este sentido, algunos autores han mencionado las positivas propiedades tróficas de los ácidos orgánicos sobre la mucosa gastrointestinal (Dibner y Buttin 2002). En todos los grupos, las vellosidades se encontraban fusionadas y con la zona apical muy erosionada, con abundantes linfocitos diseminados en la lámina propia y longitudes inferiores a las descritas en estas edades (Rebollar et al., 2004; 2006; Gutiérrez et al., 2002). Esto podría indicar la existencia en todos los animales de una morbilidad subclínica o asintomática que en el caso del grupo C llevaron a una mortalidad superior al 14 %. También se observaron abundantes glándulas en la submucosa y una intensa proliferación celular a nivel de las criptas de Lieberkhün, responsables de la renovación celular del epitelio intestinal. Resultados similares han sido descritos por otros autores cuando se han estudiado las lesiones histopatológicas provocadas por inoculaciones de diversos agentes etiológicos de procesos diarreicos (Heczko et al., 2000; Ciarlet et al., 1998; Hara-kudo et al., 1997)

El desarrollo de las áreas de tejido linfoide localizado en placas de Peyer y apéndice vermiforme en las diferentes edades fue similar al descrito por Castellini et al., (2007) y no se han observado diferencias significativas entre los tres grupos. Aunque el efecto de los acidificantes sobre la mucosa intestinal y el desarrollo del tejido linfoide no se ha estudiado previamente, su eficacia en cerdos se ha asociado a una mayor actividad antibacteriana y a la reducción de la población de coliformes



(Partanen et al., 1998), responsables de daños en la mucosa intestinal, origen de diversos procesos diarreicos.

En conclusión, en este estudio se muestra que la adición de ácidos orgánicos a las dietas de conejos favorece el que los parámetros para estimar la inmunidad innata se encuentren dentro de límites fisiológicos, mostrando un buen estado inmunitario, una mejor integridad de la mucosa intestinal y una menor mortalidad. Los ácidos orgánicos no afectan a los parámetros productivos pero podrían ser una buena alternativa a los antibióticos en las dietas de gazapos destetados.

Agradecimientos

Investigación financiada por Soda Feed Ingredients. Los estudios histológicos de este trabajo han sido financiados por el proyecto CICYT (AGL-2005-0196).

Bibliografía

Amadori M., Archetti I.L., Frassinelli M., Bagni M., Olzi E., Caronna G., Lanteri M. 1997. An immunological approach to the evaluation of welfare in Holstein frisian cattle. *J. Vet. Med. B.*, 44, 321-327.

Barta V., Barta O. 1993. Testing of hemolytic Complement and its components. In: Barta O., (ed.) *Vet. Cl. Imm. Lab.*, Bar-Lab, Blacksburg, USA.

Carroll S.F., Martínez R.J. 1979. Role of rabbit lysozyme in *in vitro* serum and plasma serum bactericidal reactions against *Bacillus subtilis* infect. *Immun.*, 25, 810-819.

Castellini C., Cardinali R., Rebollar P.G., Dal Bosco A., Jimeno V., Cossu M.E. 2007. Feeding fresh chicory (*Chicoria intybus*) to young rabbits: Performance, development of gastrointestinal tract and immune functions of Appendix and Peyer patch. *Animal Feed Science and Technology*, 134, 56-65.

Ciarlet M.; Gilger M.A.; Barone C.; McArthur M.; Estes M.K.; Conner M.E. 1998. Rotavirus disease, but not infection and development of intestinal histopathological lesions, is age restricted in rabbits. *Virology*, 251, 343-360.

De Blas C. y Wisemann J. 1998. *The Nutrition of the Rabbit*, 197-213. CABI Publishing, Oxon, UK.

Dibner J.J. and Buttin P. 2002. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. *Journal of Applied Poultry Research* 11, 453-463

Gutiérrez I., Espinosa A., García J., Carabaño R., De blas J.C. 2002. Effects of levels of starch, fiber and lactose on digestion and growth performance of early weaned rabbits. *J.Anim. Sci.*, 80, 1029-1037.

Hampson D.J. 1986. Alteration in piglet small intestine structure at weaning. *Res. Vet. Sci.* 40, 32-40.

Hansen C.F., Riis A.L., Bresson S., Højbjerg o., Jensen B.B. 2007. Feeding organic acids enhances the barrier function against pathogenic bacteria of the piglet stomach. *Livestock Science*, doi: 10.1016/j.livsci.2007.01.059.

Hara-Kudo Y.; Ogura A.; Noguchi Y.; Terao K. 1997. Effect of hemorrhagic toxin produced by *Clostridium sporogenes* on rabbit ligated intestinal loop. *Microbial pathogenesis*, 22: 31-38.

Heczko U.; Abe A.; Brett Finlay B. 2000. In vivo interactions of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* 0103 with its host: an electron microscopic and histopathologic study. *Microbes and infection*, 2, 5-16.

Magalhaes J.G., Tattoli I., Girardin S.E. 2007. The intestinal epithelial barrier: How to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Seminary in immunology*, doi: 10.1016/j.smim.2006.12.06.

Moscato L., Stelletta C., Sensi M., Sonaglia L., Battistacci L. 2003. Studio di alcuni parametri immunologici per la valutazione dello stato di benessere nell'allevamento del suino all'ingrasso. *Atti V° Congr. Naz. S.I.Di.L.V.*, 103-104.

Ossermann E.F., Lawlor D.P. 1966. Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. *J. Exp. Med.*, 124, 921- 952.



Partanen K.; Siljander-Rasi H.; Alaviuhkola T.; Suomi K.; Fossi M. 2002. Performance of growing-finishing pigs fed medium- or high-fibre diets supplemented with avilamycin, formic acid or formic acid-sorbate blend. *Livestock Science*, 73, 139-152.

Pinheiro V., Mourão J.L. Alves A., Rodrigues M., Saavedra M.J. 2004. Effects of zinc bacitracin on the performance, digestibility and caecal development of growing rabbits. En Proc. VIII World Rabbit Congress, 942-947.

Rebollar P.G., Espinosa A., Carabaño R. 2004. Transitory disturbances in growing lactating rabbits after transient doe-litter separation. *Rep. Nut. Dev.* 44, 437-447.

Rebollar P.G., Pereda N., Villarroel M., Millán P. and Lorenzo P.L. 2006. Oestrus synchronization of rabbit does at early post-partum by dam-litter separation or eCG injection effect on kit mortality and growth. *Livestock Science*, 103, 13-22.

SAS Institute (1999). User's guide. Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, NC.

Scapinello C., de Faria H.G., Furlan A.C., Michelin A.C. (2001) Effect of utilization of oligosaccharides mannose and acidifiers on growing rabbits performance. *Rev. Brasil. Zootec.* 30, 1272-1277.