



universidad  
de león

## TESIS DOCTORAL

### **Alternativas y reducción del uso de antibióticos en el ganado porcino.**

**Esther Pérez Fernández**

Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias y de los Alimentos

Departamento de Sanidad Animal

Facultad de Veterinaria

**Tutora:** Sonia Martínez Martínez

**Directores:** César Bernardo Gutiérrez Martín y Sonia Martínez Martínez

**León, 2022**





Tengo mucho que agradecer, así que empezaré por el ámbito laboral:

En primer lugar, agradecer esta tesis doctoral a mis directores Sonia Martínez Martínez y César Bernardo Gutiérrez Martín, por la disponibilidad, dirección y, sobre todo, por las numerosas correcciones de esta tesis.

Gracias a la financiación asociada a un contrato a cargo del proyecto “Uso Racional y Prudente de Antibióticos en Producción Porcina”. Perteneciente a la Submedida 16.1 del Programa de Desarrollo Rural de Castilla y León 2014-2020. En este grupo operativo el representante de las empresas fue Agropecuaria del Centro Agrocesa y participaron: Cobadu, Copese, Copiso, Nutriganse, Proinserga, Progatecsa, S.A.T. Agroalimentaria Hermanos Chico y Uvesa, el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León y la Universidad de León representada por los grupos de investigación BACRESPI y DIGESPORC.

A Elías Fernando Rodríguez Ferri y German Naharro Carrasco, vuestra pasión por la investigación y me ha servido de guía durante mi paso por el departamento, mucho más de lo que os podéis imaginar.

A María Mediavilla por tus consejos sobre cualquier procedimiento de laboratorio, y de la vida. Cada vez es más difícil encontrar buenas personas con tu entereza. Gracias por ayudarme siempre.

Al Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León, donde he desarrollado mi trabajo de Tesis Doctoral. Gracias a todos mis compañeros, así como a todas las personas que en algún momento han pasado por el departamento, también a los que os habéis quejado por estar “bajo mi esclavitud”. Alba, Alberto, Ana Isabel, Aroa, Elena Herencia, Isora, Jose (Jos), Juan, Lucía, María Alcalá, Maxi, Mónica, Rafaela y Rubén. Me veo también en la obligación de agradecer a esas personas que se atrevieron “a pasar por nuestras tierras”, Clara, Héctor Puente, Lucía, Luis Getino, Manuel, y como no, al gran Óscar. Por todo lo que me habéis prestado y enseñado, y por todas las carcajadas que nos hemos echado.

También a todo el personal de las diferentes explotaciones porcinas. En Especial Alberto Alevia, Alberto Megia, Javier G. Rabanal y Milagros Illanas por todo vuestro apoyo directo en este proyecto, a Carla y José por su hospitalidad en Peleas de Arriba.

A todo el departamento de Enfermedades Infecciosas, en especial quiero agradecer a Ana Carvajal, Diana Molina, Héctor Arguello y Juan Fregeneda por estar siempre disponibles para todas mis consulta, y por todo vuestro cariño. También a todo el departamento de Anatomía Patológica por la realización de necropsias para aislamientos bacterianos, en especial a Ana Valseiro, Claudia Pérez, María José y Valentín Pérez por todas las lecciones y ayuda.

A Paulino de Paz, Antonio Sánchez, y todo el personal técnico del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León, por todas las horas rompiéndonos la cabeza y peleándonos con los microscopios electrónicos para poder obtener las fotografías de estas tesis doctoral.

Y no me gustaría terminar esta sección sin agradecer a José Cobo, por su labor como bioinformático, colaborando directamente con todo el procesado y análisis de datos de secuenciación en esta tesis, y por toda la paciencia que has tenido conmigo y por tu calidad humana.

A la memoria de Donal Savage, al que le prometí que en los agradecimientos de mi tesis escribiría por fin bien su nombre, sin la d final. Los que le conocéis ya sabéis la historia del pato. Ahora más que nunca comprendo ese sentimiento de ser extranjero, y a la vez autóctono en otro país. Sin tus consejos y tus taza de Barry's el camino se hizo un poco más duro, pero se logró.

*Cheers to the heaven Don!*

A mi familia:

A mis padres por todo, por haber apostado siempre por esta tesis. Por apoyarme siempre a seguir adelante, a pesar de todas las adversidades que nos ha tocado vivir. Por darme todo por nosotros, y, sobre todo, por el cariño y comprensión que siempre me habéis dado. ¡Somos los mejores!

A mi hermano, aunque muchas veces me saques de quicio, nada de esto hubiera sido posible sin un referente como tú. Gracias por abrirme los ojos tantas veces, por apoyarme en los peores momentos y por enseñarme que hay un mundo entero ahí fuera.

A Miguel, por estar siempre al pie de cañón desde el minuto cero, por todo el tiempo y apoyo invertido a mi lado en esta tesis. Por todas las noches en vela consolándome, por todos los malos momentos apoyándome, por todos los buenos momentos celebrando a mi lado, por romperme todos los esquemas. Por todo lo que nos espera. *Tu es la vraie joie de vivre.*

*Para Armelim e Margarida, muito obrigado pelo vosso amor, apoio e compreensão. Ao Dr. Pedro, obrigado pelas suas palavras de encorajamento e compreensão e pelos bons momentos. Para Andresillo, por ser único, incomparável e insuperável!*

A mis tíos Fidel y Merce, a mi tía Anun, porque la vida no os lo ha puesto nada fácil, y aun así nunca me ha faltado vuestro apoyo.

A mis primos Adrián, Alexia, y Fani, simplemente por compartir ADN, y también porque sé que puedo contar con vosotros.

A mi abuela Azucena, porque allá donde estés sé que estás muy orgullosas de tu “farmacéutica favorita”. También a mi abuela Gelita, porque pasan los años, pero tu recuerdo y tu alegría permanecen. Vuestra luz me guía.

A Lucía Alegre por acompañarme en todas mis aventuras desde que tengo uso de razón, por tu apoyo incondicional y animarme a no tirar la toalla en los peores momentos, por todas las veces que me sacaste arrastras del pozo. Esta tesis también es tuya amiga.

Y, por último, y no por ello menos importante a mis amigos:

A Aroia, porque la casualidad no pudo hacerlo mejor con nosotras. Gracias por todos los años en los que compartimos piso y vida, los recuerdo de los mejores. Por apoyarme siempre y verme como imparables, al final lo fui.

A Cristina, Elora y Katerina, a pesar de tantos años y tantos kilómetros seguís siendo mis puntos de apoyo y de desconexión. Por ser incondicionales, por ser tan distintas, pero en lo importante ser tan iguales. Por todo lo que me aguantáis en general, y en particular con esta tesis.

A Violeta y Mireia, por creer siempre en lo que hago. Por todos vuestros consejos y apoyo. Porque no sabéis lo que me alegro yo de todo lo que habéis conseguido, lo mismo que os pasa a vosotras conmigo. Gracias amigas, nos vemos en Montréal, o en Maastricht.

A la Dra. Laura Rego Cabezas, le tengo que agradecer dos cosas. Gracias por tu amistad imperecedera, por todos tus consejos y ayuda. También por luchar a contracorriente en este mundo que nos toca vivir a muchas mujeres científicas.

A la Dra. Laura Buzón Durán, por ser tan buena y tan única, sin tus consejos esta tesis me hubiera costado el doble. Muchas gracias de corazón.

Gracias también a mis compañeros de Máster Natalia, Alejandra y Chemita por todo vuestro apoyo y sinceridad. Por todas las risas y por lo que nos alegramos cada vez que a alguno le pasa algo bueno, sois únicos.

A Helena, Víctor, Loli e Isma, y también a todos los demás compañeros de CrossFit y Taekwondo, me resulta imposible nombraros a todos, pero sin esta vía de escape hubiera sido imposible la realización de esta tesis. ¡Sois geniales!

A mi profe Nuria, por todo lo que me enseñaste en 2007, y todo lo que me sigues enseñando en 2022. Por ser la única persona que durante nuestra enseñanza primaria nos educó el pensamiento crítico y la lógica. Mil millones de gracias por todo lo demás.

A Isabel Abella, por obligarme a rastras a aprender francés, por ser de esas profesoras que marcan la diferencia. Por todo el cariño que nos seguimos teniendo. A Teresa Ferreras, temida profesora de física y química, pero muy buena persona, gracias por todo lo que me has enseñado, y sobre todo por lo que no estaba en los libros. A Mari Luz, que me tuvo estudiando piedras “hasta el día del juicio final”, cuando yo lo que quería era no soltar el microscopio.

Con referencias como vosotras he llegado muy lejos. Millones de gracias por todo.

Y, por último, quisiera agradecer con más detalle: A Aroa Vicente, por caerte tan mal en el momento de conocernos, y caernos tan bien el resto de nuestras vidas. A Alberto Perelló, porque como veterinario vales tu peso en oro, pero como persona tu valor es incalculable. A Elenita Buenaon, por ser una gran aprendiz y aún mejor viróloga y persona, gracias por todo el apoyo. A Sonia, a pesar de que la vida no te lo ha puesto fácil eres una luchadora, por como eres y por todo lo que desprendes GRACIAS. Quería agradeceros todo lo que me habéis ayudado y enseñado a nivel personal y profesional a lo largo de estos años. Ojalá nadie apague vuestro brillo.

Si eres una de esas buenas personas que se me ha olvidado mencionar, en los agradecimientos perdón, ya sabéis como soy. Os debo un botillo.

Muchas gracias a todos.

Esther.



**El trabajo recogido en la presente Memoria de Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en la Universidad de León y ha sido subvencionado por la Junta de Castilla y León, por el proyecto Apoyo para la creación de Grupos Operativos de la AIE en Materia de Productividad y Sostenibilidad Agrícola (VA/16/0077/G01).**



*“Science and everyday life cannot and  
should not be separated”*

*“La ciencia y la vida cotidiana no pueden y  
no deben ser separadas”*

***Rosalind Franklin, 1940***



# ÍNDICES



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Sector porcino .....</b>	<b>1</b>
Tendencias en producción del sector porcino.....	1
Complejo Respiratorio Porcino (CRP) .....	3
Pérdidas derivadas del CRP .....	8
<b>1.2. Antibióticos .....</b>	<b>9</b>
Definiciones .....	11
Uso terapéutico .....	12
Uso preventivo y como promotores de crecimiento .....	12
Clasificación de los antibióticos:.....	15
Tendencias de consumo de antibióticos .....	17
<b>1.3. Resistencias frente a los antibióticos .....</b>	<b>21</b>
Tipos de resistencia .....	22
Regímenes actuales sobre estrategias frente a resistencias .....	24
Resistencia en el sector porcino.....	32
<b>1.4. Alternativas al uso de antibióticos .....</b>	<b>33</b>
Bioseguridad.....	34
Ácidos grasos.....	40
<b>2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
<b>PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS .....</b>	<b>47</b>
<b>OBJETIVOS: .....</b>	<b>47</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1. Cepas obtenidas mediante necropsia .....</b>	<b>51</b>
<b>3.2. Cepas ambientales obtenidas en las granjas y los camiones .....</b>	<b>53</b>
<b>3.3. Medios de cultivo .....</b>	<b>57</b>
Agar chocolate (BioMérieux) .....	57
Agar sangre (BioMérieux) .....	57
Caldo Soja Trypticaseína (TSB, Condalab) .....	57
Caldo de Tripton y Soja con agar (TSA, Condalab).....	57
Agar con extracto de levadura (YEA, Condalab) .....	58
Agar MacConkey Broth (MacConkey, Condalab): .....	58

Agar Mueller Hinton.....	58
Agar BD Haemophilus (HTM).....	59
<b>3.4. Medio de congelación .....</b>	<b>59</b>
<b>3.5. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) .....</b>	<b>59</b>
Extracción del ADN .....	59
Reactivos para la PCR .....	60
PCR específica de especie: .....	60
PCRs de serotipo .....	63
<b>PCRs de factores de virulencia .....</b>	<b>68</b>
PCRs de genes de resistencia frente a antibióticos:.....	69
<b>Electroforesis en gel de agarosa.....</b>	<b>71</b>
<b>3.6. MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo).....</b>	<b>72</b>
Material y equipamiento .....	72
Procedimiento.....	72
<b>3.7. Determinación de resistencias frente a antibióticos mediante un método comercial (Sensititre®).....</b>	<b>74</b>
Material.....	74
Instrumental.....	74
Método.....	75
<b>3.8. Discos de antimicrobianos para determinación de resistencias frente a antibióticos.....</b>	<b>76</b>
Material.....	77
Instrumental.....	77
Método.....	77
<b>3.9. Ácidos grasos de cadena media .....</b>	<b>78</b>
Experimentos basados en difusión .....	78
Método por difusión en placa .....	78
Método de difusión en disco.....	79
Método basado en el recuento bacteriano.....	79
<b>3.10. Estudio de la actividad del ácido láurico sobre <i>Streptococcus suis</i> mediante microscopía electrónica .....</b>	<b>81</b>
Barrido .....	81
Transmisión .....	83

3.11.	<b>Desinfectantes</b> .....	<b>85</b>
3.12.	<b>Evaluación <i>in vitro</i> de desinfectantes sobre diferentes aislados del CRP y bacterias de origen ambiental</b> .....	<b>86</b>
	Bacterias y desinfectantes .....	87
3.13.	<b>Estudio <i>in vivo</i> de la acción de los desinfectantes en las granjas</b> .....	<b>87</b>
	Granjas para la prueba de desinfectantes .....	88
3.14.	<b>Estudio <i>in vitro</i> de la desinfección mediante radiación ultravioleta sobre diferentes aislados ambientales</b> .....	<b>89</b>
3.15.	<b>Estudio <i>in vitro</i> de la desinfección mediante ozono sobre diferentes aislados ambientales</b> .....	<b>90</b>
	Primera y segunda prueba.....	90
	Tercera prueba.....	90
3.16.	<b>Estudio <i>in vivo</i> de la desinfección con ozono y agua ozonizada en las granjas</b> .....	<b>91</b>
	Primer muestreo.....	92
	Segundo muestreo .....	93
	Tercer muestreo .....	93
3.17.	<b>Estudio <i>in vivo</i> de la actividad del ácido láurico sobre la <i>microbiota</i> porcina intestinal y nasal e índices de conversión</b> .....	<b>94</b>
3.18.	<b>Instalaciones utilizadas</b> .....	<b>98</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>99</b>
4.1.	<b>Cepas obtenidas</b> .....	<b>101</b>
	Cepas bacterianas obtenidas de las necropsias.....	101
	Cepas ambientales obtenidas en las granjas y en camión.....	107
4.2.	<b>Resistencias frente a antibióticos</b> .....	<b>108</b>
	Determinación de resistencias frente a antibióticos mediante un método comercial (Sensititre®) .....	108
	Discos de antimicrobianos para la determinación de resistencias .....	112
4.3.	<b>Resultados frente a los desinfectantes</b> .....	<b>114</b>
	Ensayos <i>in vitro</i> .....	114
	Estudio <i>in vitro</i> de la desinfección mediante ozono sobre aislados ambientales .....	118
4.4.	<b>Estudio <i>in vivo</i> de la desinfección con ozono y agua ozonizada en las granjas</b> .....	<b>123</b>

Primer muestreo:.....	123
Segundo muestreo:.....	124
Tercer muestreo:.....	125
<b>4.5. Resultados frente a ácidos grasos de cadena media .....</b>	<b>126</b>
Experimentos basados en difusión .....	126
Experimento basado en recuento .....	128
<b>4.6. Resultados de microscopia electrónica.....</b>	<b>129</b>
<b>4.7. Estudio <i>in vivo</i> de la actividad del ácido láurico sobre bacterias del complejo respiratorio en ganado porcino. ....</b>	<b>131</b>
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>137</b>
<b>5.1. Resistencia frente a antibióticos y perfil virulento de las cepas obtenidas mediante necropsia .....</b>	<b>139</b>
<b>5.2. Desinfectantes .....</b>	<b>145</b>
Desinfectantes convencionales <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	145
Desinfección <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> con nuevas técnicas: luz ultravioleta, agua ozonizada y ozono.....	148
<b>5.3. Ácido láurico .....</b>	<b>151</b>
Ensayos <i>in vitro</i> .....	151
Ensayo <i>in vivo</i> .....	152
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>159</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>163</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>185</b>
<b>ANEXO 1. Composición del pienso <i>starter</i>.....</b>	<b>187</b>
<b>ANEXO 2. Composición del pienso <i>pre-starter</i>.....</b>	<b>191</b>
<b>ANEXO 3. Bacterias más abundantes identificadas en la microbiota nasal durante los tres muestreos, los análisis e imágenes fueron realizadas con la versión 3.6.2 del software R.....</b>	<b>195</b>
<b>ANEXO 4. Bacterias más abundantes identificadas en la microbiota fecal durante los tres muestreos, los análisis e imágenes fueron realizadas con la versión 3.6.2 del software R.....</b>	<b>199</b>
<b>9. RESUMEN.....</b>	<b>203</b>
<b>10. SUMMARY.....</b>	<b>211</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Evolución del censo de ganado porcino en España. Fuente: SG Análisis, Coordinación y Estadística; Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). Elaboración: SG Producciones Ganaderas y Cinegéticas 2021. ....	1
<b>Figura 2:</b> Áreas de defensa y mecanismos de transmisión que afectan a los patógenos primarios y oportunistas del animal en lo que respecta al Complejo Respiratorio Porcino. Adaptado y editado de Brockmeier (2002) e infografía creada mediante la herramienta BioRender.com por Esther Pérez Fernández. ....	7
<b>Figura 3.</b> Factores que afectan directa e indirectamente al Complejo Respiratorio Porcino. Elaboración propia. ....	9
<b>Figura 4:</b> Mecanismos de acción de los antibióticos sobre las distintas estructuras de las bacterias. Adaptación de Bbosa, (2014). Infografía creada mediante la herramienta BioRender.com por Esther Pérez Fernández. ....	15
<b>Figura 5:</b> Mapa que detalla la venta de antibióticos para ganado por país en mg/PCU en 2017. Extraído de la Agencia Europea del Medicamento (AEMA, 2019). ....	17
<b>Figura 6.</b> Evolución del consumo de antibióticos de uso sistémico expresado en Dosis Diaria Definida (DDD) por 1000 habitantes y día, para 30 países de la UE/EEE, 1997-2017. extraído de Bruyndonckx, (2021). ....	18
<b>Figura 7.</b> Consumo de antibióticos en Medicina desde el periodo 2015 hasta 2019. DHD: Dosis Diarias Definidas (DDD) por cada 1.000 habitantes y día. Cedido por PRAN, (2020). ....	20
<b>Figura 8.</b> Consumo de antibióticos en Veterinaria desde el periodo 2014 hasta 2019. Miligramos de principio activo por Unidad de Corrección de Población (Population Correction Unit). Cedido por PRAN, (2020). ....	20
<b>Figura 9:</b> Proceso de mutación e intercambio de genes bacterianos representando la transmisión de genes de resistencia frente a antibióticos. En naranja, las bacterias mutantes; en azul, la población inicial. Infografía adaptada de NIAID (2021), mediante la herramienta BioRender.com por Esther Pérez Fernández. ....	23
<b>Figura 10.</b> Distribución geográfica de las muertes estimadas asociadas, a la multirresistencia bacteriana (O'Neill, 2016). ....	26
<b>Figura 11:</b> Clasificación de los antibióticos de uso veterinario. Extraído de Agencia Europea del Medicamento (EMA, 2019). ....	28
<b>Figura 12:</b> Ventas de antimicrobianos (mg/PCU) en animales productores de alimentos, en 31 países europeos en 2018 (EMA, 2020). ....	29

<b>Figura 13:</b> Denominador (PCU) y su distribución por especies animales productoras de alimentos (1 PCU=1 kg). Others incluye caballos, peces de piscifactoría y conejos. En color turquesa se representa el ganado porcino (EMA, 2020). .....	29
<b>Figura 14:</b> Adaptación propia de Vigilancia Europea del Consumo de Antimicrobianos Veterinarios (ESVAC, 2021).....	31
<b>Figura 15:</b> Importancia relativa de las diferentes vías de transmisión de los patógenos entre granjas (Laanen <i>et al.</i> , 2010).....	35
<b>Figura 16:</b> Esquema de un buen protocolo de limpieza y desinfección en granja, basado en De Reu <i>et al.</i> , (2016) y Reicks (2019). .....	37
<b>Figura 17.</b> Formación de la molécula de ozono (elaboración propia).....	39
<b>Figura 18:</b> Estructura molecular del ácido láurico y su fórmula química.....	42
<b>Figura 19.</b> Efectos de la administración de los ácidos orgánicos en el ganado porcino. Infografía adaptada de Pearlin <i>et al.</i> (2020) por Esther Pérez Fernández. ....	43
<b>Figura 20.</b> Esquema de estrategias para la disminución de consumo de antibióticos (elaboración propia).....	44
<b>Figura 21:</b> Plano con los diferentes puntos de muestreo en una de las granjas. El 1 y el 2 representan comederos y bebederos, el 3 juguetes ,y el 4, conductos de ventilación, el 5, las placas calefactoras, el 6, los suelos y el 7, las paredes.....	55
<b>Figura 22:</b> Lugares a muestrear en camiones, en los que 1 y 3 son los suelos de las diferentes alturas, 4 y 2, las paredes y 5, las ruedas. ....	56
<b>Figura 23.</b> Plano de las dos salas gemelas en las que se realizó el experimento y lugares donde se muestrearon. 1 Comederos. 2 Bebederos. 3 Juguetes. 4 Conductos de ventilación. 5 Mantas calefactoras. 6 Suelos. 7 Paredes. ....	91
<b>Figura 24.</b> Diseño experimental del estudio para determinar la actividad del ácido láurico suplementado en el pienso durante la fase de destete, en parámetros productivos y sanitarios. Figura diseñada mediante la herramienta BioRender.com por Esther Pérez Fernández.....	95
<b>Figura 25:</b> Mapa de procedencia de los aislados de las diferentes bacterias del CRP. <b>(a)</b> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> , <b>(b)</b> <i>Pasteurella multocida</i> , <b>(c)</b> <i>Glaesserella parasuis</i> y <b>(d)</b> <i>Streptococcus suis</i> .....	102
<b>Figura 26. (a)</b> Porcentaje de bacterias del complejo respiratorio porcino aisladas. <b>(b).</b> Mapa donde se localizaron los aislados. En azul oscuro, <i>S. suis</i> ; en verde, <i>P. multocida</i> ; en rojo, <i>A. pleuropneumoniae</i> , y en naranja, <i>G. parasuis</i> .....	103
<b>Figura 27:</b> (a) Riqueza de la microbiota nasal y fecal, donde se representa la abundancia de bacterias durante los tres tiempos. En rojo las bacterias en los animales control, en naranja para la suplementación de 2 kg/T de ácido láurico en pienso y en rojo para 4 kg/T. (b) Índice de Simpson o índice de diversidad de la microbiota nasal y	

fecal, donde se representa la abundancia de bacterias durante los tres tiempos. En rojo las bacterias en los animales control, en naranja para la suplementación de 2 kg/T de ácido láurico en pienso y en rojo para 4 kg/T. .... 134

**Figura 28:** Los ejes muestran los primeros dos componentes principales del análisis (a) Análisis de componentes principales del análisis de la microbiota nasal, donde el azul representa las bacterias identificadas en el muestreo inicial, el verde en el tiempo intermedio y el rojo en el momento final. (b) Análisis de componentes principales del análisis de la microbiota fecal, donde el azul representa las bacterias identificadas en el muestreo inicial, el verde en el tiempo intermedio y el rojo en el momento final..... 135



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Año de descubrimiento de los agentes antimicrobianos más importantes y año de comunicación de la existencia de cepas resistentes a los mismos. Adaptada de Errecalde, (2004).....	10
<b>Tabla 2.</b> Principales familias de antibióticos según su estructura química. Extraída de del Arco, (2014). .....	16
<b>Tabla 3.</b> Aspectos más relevantes de la bioseguridad externa e interna (elaboración propia).....	35
<b>Tabla 4:</b> Volúmenes de los reactivos de la PCR.....	60
<b>Tabla 5:</b> Cebadores de PCR específicos y condiciones de PCR de especie para <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> . .....	61
<b>Tabla 6:</b> Cebadores de PCR específicos y condiciones de PCR de especie para <i>Glaesserella parasuis</i> . .....	61
<b>Tabla 7:</b> Cebadores de PCR específicos y condiciones de PCR de especie para <i>Pasteurella multocida</i> . .....	62
<b>Tabla 8:</b> Cebadores de PCR específicos y condiciones de PCR de especie para <i>Streptococcus suis</i> .....	62
<b>Tabla 9:</b> Cebadores de PCR de serotipo y condiciones de PCR para <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> . .....	63
<b>Tabla 10:</b> Cebadores de PCR de serotipo y condiciones de PCR para <i>Glaesserella parasuis</i> . .....	64
<b>Tabla 11:</b> Cebadores de PCR de serotipo y condiciones de PCR para <i>Pasteurella multocida</i> . .....	65
<b>Tabla 12:</b> Cebadores de PCR de serotipo y condiciones de PCR para <i>Streptococcus suis</i> .....	66
<b>Tabla 13:</b> Cebadores de PCR de factores de virulencia y condiciones de PCR para <i>Pasteurella multocida</i> .....	68
<b>Tabla 14:</b> Cebadores de PCR de factores de los virulencia y condiciones de PCR para <i>Streptococcus suis</i> .....	69
<b>Tabla 15:</b> Cebadores de PCR de factores de virulencia y condiciones de PCR para <i>P. multocida</i> .....	70
<b>Tabla 16:</b> Cebadores de PCR de factores de virulencia y condiciones de PCR para <i>Streptococcus suis</i> .....	71
<b>Tabla 17:</b> Volúmenes y medios utilizados para las diferentes bacterias durante el desarrollo de la técnica.....	75

<b>Tabla 18.</b> Referencias de los discos de antibióticos usados para este procedimiento experimental .....	77
<b>Tabla 19:</b> Nombres comerciales y composición de los desinfectantes utilizados durante este experimento. Se corresponden con los más utilizados en las explotaciones porcinas estudiadas. ....	86
<b>Tabla 20:</b> Rangos de porcentajes de eficacia de los desinfectantes probados. ....	89
<b>Tabla 21:</b> Localización anatómica de las muestras recibidas, de las cuales se realizaron los aislados bacterianos. ....	101
<b>Tabla 22:</b> Localización geográfica de las muestras obtenidas.....	104
<b>Tabla 23:</b> Porcentaje de la prevalencia de cada gen de factores de virulencia presente en el total de aislados de <i>Streptococcus suis</i> .....	105
<b>Tabla 24:</b> porcentaje de la prevalencia de cada gen de factores de virulencia presente en el total de aislados de <i>Pasteurella multocida</i> .....	106
<b>Tabla 25:</b> porcentaje de la prevalencia de cada gen de resistencia frente a antibióticos presente en el total de aislados de <i>Streptococcus suis</i> .....	106
<b>Tabla 26:</b> porcentaje de la prevalencia de cada gen de resistencia de genes de resistencia frente a antibióticos presente en el total de aislados de <i>Pasteurella multocida</i> . ....	107
<b>Tabla 27:</b> Rango de susceptibilidad a los diferentes antibióticos, CMI <sub>50</sub> , CMI <sub>90</sub> y porcentaje de resistencia de los aislados de <i>P. multocida</i> . ....	110
<b>Tabla 28:</b> Rango de susceptibilidad a los diferentes antibióticos, CMI <sub>50</sub> , CMI <sub>90</sub> y porcentaje de resistencia de los aislados de <i>Streptococcus suis</i> .....	111
<b>Tabla 29:</b> Porcentaje de sensibilidad por los discos de antibiogramas para <i>A. pleuropneumoniae</i> . ....	112
<b>Tabla 30:</b> Rango de sensibilidad por los discos de antibiogramas para <i>G. parasuis</i> . ....	113
<b>Tabla 31.</b> Capacidad bactericida de los desinfectantes utilizados en granja sobre bacterias del complejo respiratorio porcino. Se toma la solución salina estéril como control positivo.....	114
<b>Tabla 32.</b> Capacidad de los desinfectantes utilizados en granja sobre bacterias ambientales fácilmente encontradas en granja. Se toma la solución salina estéril como control positivo.....	115
<b>Tabla 33.</b> Resultados de la radiación Ultravioleta frente a diferentes aislados ambientales. ....	116
<b>Tabla 34.</b> Resultados del agua ozonizada frente a diferentes aislados ambientales. ....	117
<b>Tabla 35.</b> Reducción logarítmica para concentración de 1ppm. ....	118
<b>Tabla 36.</b> Reducción logarítmica para concentración de 1,5 ppm. ....	119

<b>Tabla 37.</b> Resultados de los muestreos ambientales en granja.....	122
<b>Tabla 38.</b> Valoración de 1 ppm de ozono sobre granja.....	123
<b>Tabla 39.</b> Valoración de 1,2 ppm de ozono y agua ozonizada sobre granja. ....	124
<b>Tabla 40.</b> Valoración de 1,5 ppm de ozono y agua ozonizada sobre granja. ....	125
<b>Tabla 41.</b> Resultados de ácido láurico en disco de difusión sobre las bacterias <i>Streptococcus suis</i> y <i>Pasteurella multocida</i> . ....	126
<b>Tabla 42.</b> Resultados de ácido láurico en medio líquido sobre las bacterias <i>Streptococcus suis</i> y <i>Pasteurella multocida</i> . ....	128
<b>Tabla 43.</b> Índices paramétricos en los tres grupos a lo largo del experimento. Se expresa la GMD en kilos, con media y la desviación típica, el consumo de pienso por corral durante los dos intervalos estudiados en kilos, y el índice de conversión como la transformación de alimento a masa corporal.....	132



## ÍNDICE DE IMÁGENES

<b>Imagen 1.</b> Tablillas de Nippur. Primeros grabados sobre terracota datados hace 2150 años donde se han encontrado remedios para las enfermedades infecciosas (Jácome-Roca, 2017). .....	12
<b>Imagen 2.</b> Muestras biológicas recibidas en varios envíos. A la izquierda, pulmón derecho de cerdo de cebo, a la derecha dos pulmones de unos lechones.....	51
<b>Imagen 3.</b> Aislado de <i>Pasteurella multocida</i> en una placa de agar sangre. ....	52
<b>Imagen 4.</b> De izquierda a derecha: placa RODAC para toma de muestras por contacto, placa tomando una muestra, esponja para la toma de muestras y esponja tomando una muestra.....	54
<b>Imagen 5:</b> (a) Fotografía de la placa del MALDI-TOF entrando en el espectrómetro de masas Microflex LT para ser analizada. (b) Espectrómetro de masas.....	73
<b>Imagen 6. (a)</b> El dosificador Sensititre® automatizado con el que se añadía el volumen exacto de bacteria en el medio de crecimiento, sobre la placa de 96 pocillos. <b>(b)</b> Nefelómetro para la evaluación de la densidad óptica del crecimiento bacteriano. ....	75
<b>Imagen 7.</b> Bacterias en crecimiento en un cultivo líquido con adición de ácido láurico. Detalle de la turbidez generada al añadir el ácido.....	80
<b>Imagen 8.</b> De izquierda a derecha: pulverizador de oro SCD 004 de BALZERS Union Limited y desecador de punto crítico. ....	83
<b>Imagen 9.</b> Realización de la deshidratación en alcohol. ....	84
<b>Imagen 10.</b> (a) Ultramicrotomo con el que se realizaron los cortes. (b) Detalle del ultramicrotomo. ....	85
<b>Imagen 11. (a)</b> Ejemplo de granja vaciada y limpia para el muestreo. <b>(b)</b> Material con el que se realizó el muestreo.....	88
<b>Imagen 12.</b> Aparatos utilizados para generación y medición del ozono generado en la granja. De arriba izquierda hasta abajo derecha: lámpara de ozono, equipo home, lampara de ozono, sensor y cañón de ozono.....	92
<b>Imagen 13.</b> (a) Necropsia en sala de necropsias. (b) Muestras obtenidas para posterior aislamiento bacteriano.....	98
<b>Imagen 14:</b> Discos de antibiograma en <i>Glaesserella parasuis</i> mostrando los característicos halos de inhibición, que ponen de manifiesto la sensibilidad frente a los antibióticos probado.....	113
<b>Imagen 15:</b> Halo de inhibición formado por un ácido orgánico sobre bacteria de CRP. ....	127
<b>Imagen 16:</b> Imágenes de microscopía electrónica de <i>S. suis</i> a diferentes concentraciones de ácido láurico frente a microscopia de barrido.....	130



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AEMPS</b>	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>CEE</b>	Comunidad Económica Europea
<b>CLSI</b>	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio ( <i>Clinical And Laboratory Standards Institute</i> )
<b>CMI</b>	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>CMI50</b>	Concentración de antimicrobiano que inhibe al 50% de las cepas bacterianas
<b>CMI90</b>	Concentración de antimicrobiano que inhibe al 90% de las cepas bacterianas
<b>CRP</b>	Complejo Respiratorio Porcino
<b>DDD</b>	Dosis diaria definida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EDO</b>	Enfermedad de declaración obligatoria
<b>EEE</b>	Espacio Económico Europeo
<b>EMA</b>	Agencia Europea de Medicamentos ( <i>European Medicines Agency</i> )
<b>EUCAST</b>	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura ( <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> )
<b>FDA</b>	Agencia para la Administración de Alimentos y Medicamentos ( <i>Food and Drug Administration</i> )
<b>GMD</b>	Ganancia media diaria
<b>GRAS</b>	Generalmente reconocido como seguro, dicho de una sustancia o compuesto ( <i>Generally Recognized as Safe</i> )
<b>ICA</b>	Índice de conversión de alimento
<b>MALDI-TOF</b>	Desorción/Ionización Láser asistida por matriz ( <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight</i> )
<b>MAPA</b>	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
<b>MEB</b>	Microscopio electrónico de barrido

<b>MET</b>	Microscopio electrónico de transmisión
<b>Mg</b>	Miligramo
<b>ml</b>	Mililitro
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µl</b>	Microlitro
<b>OIE</b>	Organización Mundial de Sanidad Animal
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OPS</b>	Organización Panamericana de la Salud
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PIBM</b>	Países de ingresos bajos y medianos
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>PRAN</b>	Plan Nacional frente a la resistencia a los antibióticos
<b>PROA</b>	Programas de Optimización de uso de los antibióticos
<b>PRRS</b>	Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino ( <i>Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome</i> )
<b>RA</b>	Resistencia frente a antibióticos
<b>SSE</b>	Solución salina estéril
<b>TSA</b>	Agar Triptona-Soja
<b>UE</b>	Unión Europea
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias





# 1. INTRODUCCIÓN

## Introducción

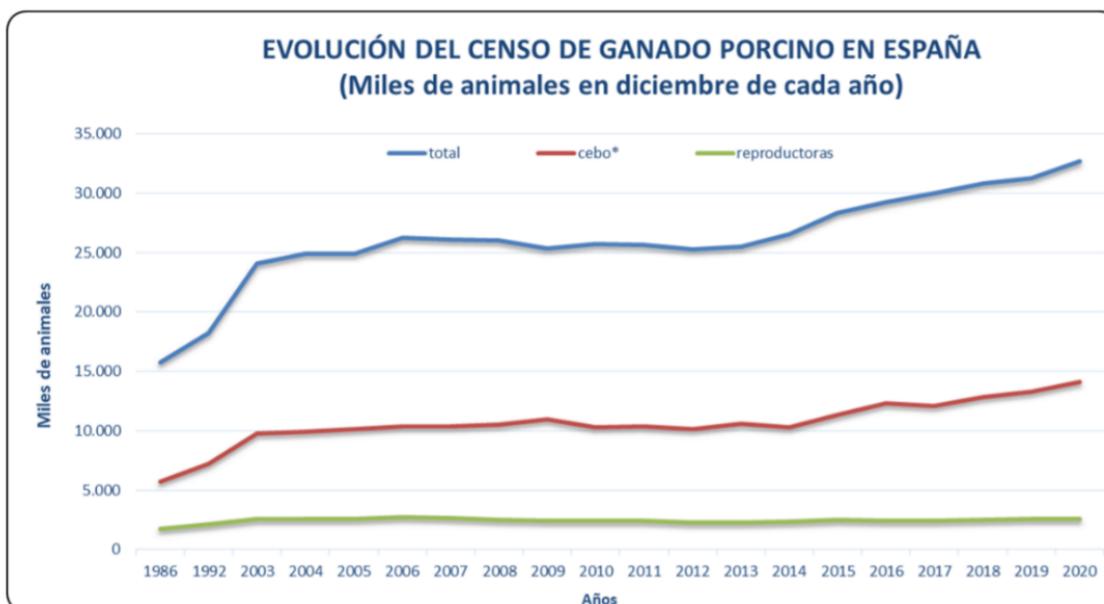
---

### 1.1. Sector porcino

#### Tendencias en producción del sector porcino

El sector porcino es uno de los más productivos en ganadería. Según datos de la FAO en 2020, un 36% de la carne consumida a nivel mundial procedió del cerdo. No es de extrañar que en España sea también la carne más comercializada (FAO, 2020).

A nivel europeo, España encabeza el ranking, únicamente se encuentra por detrás de Alemania, (con una diferencia de 0,2% de producción en toneladas de carne), situándose así la cuarta a nivel mundial, por detrás de China, Estados Unidos y Alemania. El año 2020 ha sido un año récord para el porcino en España: 56,4 millones de animales sacrificados, y unos 5 millones de toneladas de carne producida. También sabemos que en los últimos 5 años la producción en la UE ha descendido un 5%, y que la producción en España ha crecido un 15% en el mismo periodo (Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas. Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2022).



**Figura 1:** Evolución del censo de ganado porcino en España. Fuente: SG Análisis, Coordinación y Estadística; Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). Elaboración: SG Producciones Ganaderas y Cinegéticas 2021.

Dentro de todas las razas existentes, el cerdo blanco es el más común en la ganadería intensiva de España. Estos animales proceden de una selección genética muy específica para la optimización de la carne. Podemos diferenciar su vida productiva

## Introducción

---

en dos fases (Buxadé Carbó, 1996; Buxadé Carbó y Ambrogi, 1997; Babot Gaspa *et al.*, 2017):

- Reproductores: madres y verracos.
- Lechones:
  - **Lactantes**, aún están con la madre, aproximadamente dura entre 3 y 4 semanas, pesan aproximadamente 7 kilos.
  - **Destete o transición**, con una duración de entre 5 y 7 semanas, en la que se obtienen animales de entre 17 y 22 kg de peso.
  - **Crecimiento o cebo**, dura unas 15 semanas, que variará en función del peso final que se quiera obtener.

Es reseñable que tanto el parto (las primeras 48 horas de vida) como el destete son dos puntos clave para el futuro del animal, siendo los momentos en los que más probabilidades tienen de enfermar o morir. En las horas posteriores a su nacimiento, los problemas que presentan los neonatos son su debilidad y las amputaciones o muertes por aplastamiento. Superando esta fase, y con la inmunidad que les confiere el calostro materno, los lechones no tendrán más disbiosis hasta la fase de transición (Babot Gaspa *et al.*, 2017).

El momento del destete es el que presenta más estrés para los lechones, sobre todo en los casos en los que éste se produce antes de las 4 semanas, como suele ocurrir en las granjas españolas (entre los 21 y 28 días de edad). Existen dos cambios críticos: la separación de las madres y su cambio en la alimentación. El aparato digestivo aún no esté preparado para una alimentación distinta de la leche materna. Esta situación provoca disbiosis intestinales, lo que les puede volver más susceptibles a otras enfermedades, como las respiratorias (Babot Gaspa *et al.*, 2017).

Los problemas respiratorios son uno de los principales desafíos sanitarios a los que se enfrenta la industria porcina. Su impacto económico es muy alto, además de estar directamente relacionado con una mayor mortalidad, reducción de la eficiencia de la producción (disminución en índices de conversión y crecimiento), y aumentando los costes en todos los casos. (Brockmeier *et al.*, 2002).

### **Complejo Respiratorio Porcino (CRP)**

En el tracto respiratorio porcino encontramos poblaciones bacterianas, las cuales, en situaciones sin patología, colonizan las vías respiratorias de los animales. Cuando existen disbiosis y alteraciones en el sistema inmune, son esas bacterias las que pueden escapar de los mecanismos de defensa y establecer la infección, actuando como patógenos oportunistas, que aprovechan los mecanismos de virulencia de los patógenos primarios para establecer las infecciones. Algunos de estos microorganismos se pueden considerar tanto como patógenos primarios como secundarios. Se puede definir el “**complejo respiratorio porcino**” (CRP) como una entidad nosológica multifactorial en la que está involucrado tanto el ambiente, como el hospedador (sistema inmune), y su relación con una serie de microorganismos primarios y secundarios (Brockmeier *et al.*, 2002).

Suele generar sintomatología entre las semanas 14 y 20 del animal (algunos autores afirman que pueden empezar desde la octava o duodécima semana de vida), a pesar de que afecta también a otras etapas. La etiología múltiple del CRP nos hace ver que no existe un periodo específico de incubación; además, presenta numerosas sintomatologías clínicas, aunque la más común es la tos. Los agentes implicados en esta entidad nosológica pueden ser primarios o secundarios (Brockmeier *et al.*, 2002).

En Estados Unidos es considerada una enfermedad animal endémica; además, las áreas con las temperaturas más bajas del país favorecen la propagación de uno de sus agentes causante, el virus del Síndrome Respiratorio y Reprodutor Porcino (PRRS). La enfermedad es transmisible y persiste durante largos periodos en los animales infectados, así como en el ecosistema. Este virus no establece zoonosis con el ser humano, motivo por el cual no existen programas oficiales para su control. A pesar de ello, muchos productores realizan programas regionales para mejorar los protocolos de manejo y bioseguridad, reduciendo así su propagación por fómites contaminados y animales infectados (Swann *et al.*, 1969; Opriessnig *et al.*, 2011).

### **Agentes infecciosos**

A pesar de que los agentes primarios pueden causar enfermedad por sí solos, los problemas de salud más comprometidos llegan cuando entran en juego los secundarios, generando patologías y pérdidas económicas de mayor gravedad. Algunos de los agentes bacterianos pueden actuar como primarios y secundarios según la situación. Los agentes primarios en los cerdos incluyen agentes víricos, destacado el

virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino (PRRSV) también agentes bacterianos, como *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Glaesserella parasuis* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*. El agente secundario más común es *Pasteurella multocida*, pero otros agentes oportunistas comunes incluyen, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus suis*, *Arcanobacterium pyogenes* y *Salmonella choleraesuis* (Brockmeier *et al.*, 2002).

### Primarios

#### **Virus del síndrome Respiratorio y Reproductor Porcino (PRRS)**

El Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductor Porcino (PRRS), miembro de la familia *Arteriviridae*, es un virus con ARN monocatenario con envoltura. Se identificó por primera vez en una epidemia aguda a fines de la década de 1980. Dependiendo de la cepa, la dosis y el estado inmunológico, algunas granjas pueden experimentar una infección subclínica por PRRS, mientras que otras experimentan enfermedades reproductoras y/o respiratorias graves. Los cerdos en crecimiento infectados con PRRS pueden presentar enfermedades respiratorias que van desde signos indetectables hasta el desarrollo de neumonía letal, dependiendo de la cepa del virus PRRS y las coinfecciones. Además, el PRRS afecta a distintas fases del ciclo productivo, provocando desde un aumento en las tasas de aborto y mortalidad en lechones, hasta fallos reproductivos en cerdas, o una disminución en la conversión en los cerdos de engorde (Zimmerman *et al.*, 1997; Álvarez *et al.*, 2015).

El virus del PRRS induce la lisis celular de los macrófagos alveolares pulmonares y de los macrófagos intravasculares pulmonares, que son los lugares primarios de replicación del virus. Los cerdos afectados pueden manifestar fiebre, escalofríos, disnea, aumento las tasas de aborto, abortos con momificaciones y cambios en el celo; en los verracos puede existir una disminución en la calidad del semen; en los lechones lactantes, incrementa la tasa de mortalidad; en los cerdos de transición, problemas respiratorios asociado a infecciones bacterianas, y también bajas con pérdida de peso, fiebre, escalofríos, disnea, enrojecimiento de la piel, neumonía, miocarditis, encefalitis, rinitis, vasculitis o linfadenopatías; en cerdos de cebo, problemas respiratorios y bajas por pérdida de peso (Thanawongnuwech *et al.*, 1997).

Aunque el virus parece diseminarse rápidamente, pueden pasar de 4 a 5 meses antes de que por lo menos el 90% las cerdas se vuelvan seropositivas. Pese a la secuenciación del virus, es imposible predecir la virulencia, presentación clínica o

protección cruzada entre cada cepa identificada. Un factor importante de este virus es que se puede transmitir por medio del semen. La forma crónica afecta continuamente a los animales de todas edades, pero con una clínica menos grave (Halbur *et al.*, 1996). La bioseguridad es el arma principal para combatir esta enfermedad, ya por el momento no existe un tratamiento eficaz. Lo único que se puede hacer es llevar un buen control de todos los parámetros de la granja para evitar su contagio y expansión (Reicks, 2019).

### ***Actinobacillus pleuropneumoniae***

Se trata un bacilo Gram-negativo y causante de la pleuroneumonía porcina, que se encuentra como comensal en las tonsilas y el tracto respiratorio superior de los animales. En los casos en los que las cepas sean virulentas o la inmunidad del animal se encuentre comprometida pueden desplazarse hasta los pulmones y causar enfermedad. Las lesiones típicas de pleuroneumonía se presentan en pulmones y la pleura. En casos agudos pueden existir lesiones fibrinosas en los lóbulos, así como pleuritis fibrinosa en zonas afectadas (Gottschalk y Taylor, 2006).

La transmisión de la enfermedad puede ocurrir por la diseminación de la bacteria por los animales infectados, o bien por la introducción sin control de animales portadores. Dichos animales pueden propagar el patógeno a través del aire, o por el contacto directo entre las fosas nasales. Esta bacteria puede actuar como agente primario pulmonar, o agente secundario. (Muñoz *et al.* 2010).

### ***Glaesserella parasuis***

Anteriormente denominada *Haemophilus parasuis*. Se trata de un bacillo Gram-negativo que coloniza las vías respiratorias del cerdo desde su nacimiento, aunque también puede ocurrir en edades más avanzadas (Macedo *et al.*, 2015; Mahmmod *et al.*, 2020). La enfermedad de Glässer, producida por este agente, constituye hoy en día uno de los problemas más graves de las explotaciones porcinas, sobre todo, de lechones entre cinco a ocho semanas; sin embargo, animales de cualquier edad pueden verse afectados. Sus manifestaciones clínicas incluyen fiebre, rinitis purulenta, anorexia e inflamación de las articulaciones, con cojera y disnea. Al igual que *Actinobacillus pleuropneumoniae* este agente también puede actuar como primario sistémico, o secundario. (Macedo *et al.*, 2015; Aragón, 2017).

### ***Mycoplasma hyopneumoniae***

Es un microorganismo Gram-positivo, a pesar de tener la peculiaridad de haber perdido la capacidad de sintetizar pared celular. Se trata de un patógeno respiratorio primario, muy importante como desencadenante y/o potenciador de problemas respiratorios de gran relevancia económica. La infección por *M. hyopneumoniae* aumenta la intensidad de la infección por el virus del PRRS (Thacker *et al.*, 1999; Neto *et al.*, 2012). El efecto inmunosupresor local influye negativamente en la gravedad del Complejo Respiratorio Porcino cuando otros agentes infecciosos aparecen involucrados simultáneamente, tales como *A. pleuropneumoniae*, *G. parasuis* y *S. suis*. (Caruso y Ross, 1990; Regula *et. al.*, 2003).

### **Secundarios**

#### ***Streptococcus suis***

Se trata de una bacteria Gram-positiva, con una morfología muy característica en forma de cacahuete. La diseminación de este patógeno se suele producir mediante transmisión vertical desde el canal del parto, por ello, es difícil romper el ciclo de transmisión (Pallarés *et al.*, 2003). A pesar de que los lechones son colonizados en el nacimiento, las primeras manifestaciones ocurren de dos a tres semanas después del destete, cuando la inmunidad materna proporcionada por el calostro disminuye (Lisebrois *et al.*, 1990).

Uno de los primeros signos en aparecer suele ser la fiebre, seguida de artritis, cojera, poliserositis, y neumonía; el curso de la infección puede desembocar en endocarditis y meningitis. Es una bacteria muy variada en cuanto a serotipos; en concreto, se han descrito al menos 35 distintos, los cuales varían en distribución geográfica y patogenicidad (Halbur *et al.*, 2000).

#### ***Pasteurella multocida***

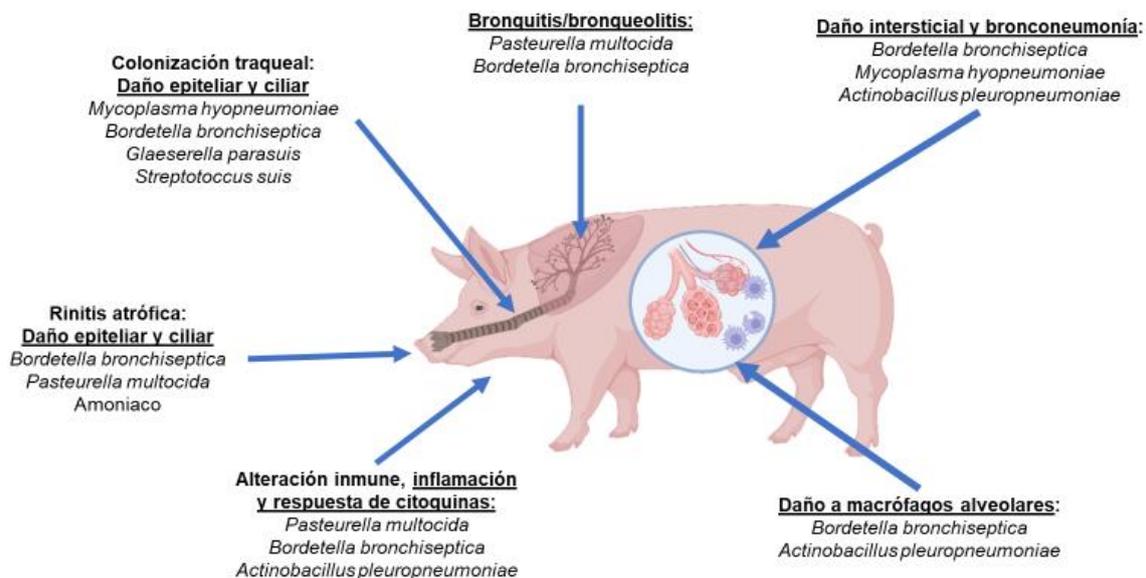
Se trata de una bacteria Gram-negativa con morfología de cocobacilo. Forma parte del microbiota nasal orofaríngea de diferentes especies animales, tanto domésticas como salvajes (Oehler *et al.*, 2009). Además, es el agente más frecuentemente aislado e identificado en pulmones de cerdos neumónicos en los últimos 100 años (Weber *et al.*, 1984). Se han identificado hasta 5 tipos capsulares diferentes basándose en los polisacáridos de su cápsula (A, B, C D y E). Siendo las cepas la A y la D las más toxigénicas (Weber *et al.*, 1984).

Por sí misma, puede generar tos crónica, dificultad para respirar o retrasos en el crecimiento. En estadios más avanzados provoca pleuritis, adhesiones pleurales y abscesos. Asociada a otros patógenos, como *Bordetella bronchiseptica*, pudiendo generar rinitis atrófica. Por otro lado, su combinación con agentes vírico, como el virus de PRRS, produce cuadros todavía aún más graves. (Brockmeier *et al.*, 2002; Oehler *et al.*, 2009).

### ***Bordetella bronchiseptica***

Bacteria Gram-negativa del género *Bordetella*, a diferencia de *Bordetella pertussis* (causante de la tosferina, enfermedad de declaración obligatoria en España) esta bacteria suele infectar perros y cerdos, y en el caso de los suinos afecta más a los lechones (Finger y Koenig, 1996; Coote, 2001).

Está frecuentemente involucrada en patología del CRP. Como patógeno único produce rinitis no progresiva sin afectaciones graves; sin embargo, genera grandes lesiones en los cornetes nasales cuando se asocia con *P. multocida*, produciendo la rinitis atrófica progresiva. La asociación entre *B. bronchiseptica* y *P. multocida* genera grandes pérdidas económicas por la mortalidad y bajo rendimiento de los cerdos afectados (Espinosa y Martínez, 2008).



**Figura 2:** Áreas de defensa y mecanismos de transmisión que afectan a los patógenos primarios y oportunistas del animal en lo que respecta al Complejo Respiratorio Porcino.

Adaptado y editado de Brockmeier (2002) e infografía creada mediante la herramienta BioRender.com por Esther Pérez Fernández.

### **Agentes no infecciosos:**

Las causas no infecciosas (manejo y factores ambientales) contribuyen también a aumentar las enfermedades respiratorias. Por un lado, pueden incrementar la propagación de los patógenos y, por otro, generan condiciones ambientales desfavorables que provoca un mayor estrés y daño en las vías respiratorias de los cerdos (Brockmeier *et al.*, 2002; Laanen *et al.*, 2011; Siekkinen *et al.*, 2012).

En las últimas décadas, la producción porcina se ha intensificado con piaras de mayor tamaño, hecho que ha desencadenado un aumento en las enfermedades respiratorias. No es inusual encontrarse granjas con de centenares de cerdos cobijados en ambientes cerrados o semicerrados, enfatizando la importancia de una ventilación adecuada y la eliminación de residuos para la salud respiratoria de los cerdos. El hacinamiento y/o la ventilación inadecuados pueden conducir a temperaturas extremas, aumentando del estrés de los animales e incrementando en los niveles de amoníaco y suciedad, que tendrán un impacto negativo el tracto respiratorio (Brockmeier *et al.*, 2002; Fèvre *et al.*, 2006; Laanen *et al.*, 2013).

Algunas medidas que requieren de un especial cuidado frente a los agentes no infecciosos son los flujos continuos de cerdos, en los cuales se introducen permanentemente animales jóvenes mientras se retiran los más viejos para llevar a matadero. Muchos patógenos respiratorios son tan comunes que es difícil encontrar una piara libre; por ello, la mezcla de cerdos de múltiples orígenes y grupos de edad contribuye a la propagación de estos agentes infecciosos, siendo un buen manejo en la granja una clave fundamental para su control (Brockmeier *et al.*, 2002; Hege *et al.*, 2002; Wong, 2004). Por ello, una mejora en el manejo y una buena bioseguridad incrementan los índices paramétricos de producción y la rentabilidad de las granjas, afectando favorablemente la disminución del uso de antibióticos (Laanen *et al.*, 2011; Siekkinen *et al.*, 2012; Laanen *et al.*, 2013).

### **Pérdidas derivadas del CRP**

Sumado a los problemas de sanidad animal que esta patología puede ocasionar en las granjas, existen también pérdidas económicas derivadas del CRP. Se sabe que el CRP es puede llegar a causar una reducción en la ganancia diaria de peso estimada en hasta el 6% (Brockmeier *et al.*, 2002).

En América del Norte se realizó una investigación para estimar las pérdidas económicas obtenidas por bajas durante un año en el subcontinente, obteniendo una pérdida anual de más de medio millón de dólares en (Valdes-Donoso *et al.*, 2018).

En Europa, los estudios realizados se centraron en los dos países con mayor producción porcina, España y Alemania, estimando unas pérdidas totales de entre 1.000-15.000 millones de euros (Nathues *et al.*, 2017). En otro estudio, en el año 2012, se analizaron 9 granjas alemanas con afecciones del CRP, calculando que el 18% de los cerdos no se pudieron vender por bajas o mal estado de los animales, generando así costes en medicación, vacunación, diagnósticos a los que sumar las pérdidas por las propias bajas, con un promedio de 126€ por animal (Nieuwenhuis *et al.*, 2012).



**Figura 3.** Factores que afectan directa e indirectamente al Complejo Respiratorio Porcino. Elaboración propia.

### 1.2. Antibióticos

Uno de los grandes hitos en la lucha frente a las enfermedades bacterianas ocurrió en 1928 de la mano de Alexander Fleming: el descubrimiento de la penicilina, el primer antibiótico empleado como remedio eficaz. El propio Fleming predijo que un mal uso de estos antimicrobianos podría llegar a generar resistencias, y tenía razón: un año después de su comercialización en 1941 ya existían cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la penicilina (Jácome-Roca, 2017).

## Introducción

---

Unas décadas después, en el informe Swann (1969) se generaron las primeras evidencias de que las bacterias con resistencias frente a los antibióticos (RA) se podían propagar por la cadena alimentaria, esto fue el origen de las primeras preocupaciones acerca del empleo de antibióticos los animales de consumo (Barton, 2000).

**Tabla 1.** Año de descubrimiento de los agentes antimicrobianos más importantes y año de comunicación de la existencia de cepas resistentes a los mismos. Adaptada de Errecalde, (2004).

Compuesto	Año de descubrimiento	Año de utilización en clínica	Año de resistencia clínica
Penicilina	1928	1943	1954
Estreptomicina	1944	1947	1956
Tetraciclina	1948	1953	1956
Eritromicina	1952	1955	1956
Vancomicina	1956	1972	1994
Gentamicina	1963	1967	1968
Fluoroquinolonas	1978	1982	1985

Los primeros antibióticos sintéticos surgieron al poco tiempo de los naturales, inicialmente fueron los semisintéticos, realizando pequeñas modificaciones a la cadena lateral de la penicilina G original. Con el aislamiento del núcleo químico 6-aminopenicilánico (6-APA) se pudieron añadir distintas cadenas laterales de diferentes naturalezas químicas, generando las primeras penicilinas semisintéticas, como fueron la metilina en 1960 y la ampicilina al año siguiente (Jácome-Roca, 2017).

En los siguientes años se fueron descubriendo las siguientes familias de antibióticos (ver Tabla 1) y generando antibióticos totalmente sintéticos. A partir de aquí existe un estancamiento en los nuevos antibióticos: los compuestos naturales con propiedades antibióticas descubiertos posteriormente presentaron propiedades muy similares a los anteriores, por otro lado, la síntesis química *de novo* de los nuevos compuestos dieron como resultado moléculas muy similares a las actuales. Por ello, los

avances en este campo son muy escasos, ya que prácticamente se han agotado las posibilidades de nuevas moléculas que puedan luchar de una forma totalmente nueva contra las bacterias (Angulo *et al.*, 2004; Jácome-Roca, 2017).

### Definiciones

¿Qué son los antibióticos? La RAE los define de la siguiente manera: *“Dicho de una sustancia química capaz de paralizar el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos, por su acción bacteriostática, o de causarles la muerte, por su acción bactericida, y que es producida por un ser vivo o fabricada por síntesis”*.

El enfoque que le da el manual para profesionales de la salud MSD (*Merck Sharp y Dohme*) es el siguiente: *“Los antibióticos son fármacos que se utilizan para tratar las enfermedades bacterianas. Son ineficaces contra las enfermedades víricas y la mayoría del resto de enfermedades”*.

Otros autores definen a antibióticos como sustancias producidas por varias especies de microorganismos (bacterias u hongos), que suprimen el desarrollo de otros microorganismos y que incluso pueden llegar a destruirlos. Se ha ido comprobando que muchas bacterias producen sustancias que a la vez actúan como agentes antibacterianos (Sumano, 2006).

Los compuestos antimicrobianos se emplean en Veterinaria con fines terapéuticos y profilácticos, para tratar o prevenir enfermedades. En ambos casos, los antibióticos deben ser suministrados bajo el control de un profesional veterinario y la normativa vigente exige la prescripción de la receta veterinaria. Esto se aplica desde su publicación en 1995 del Real Decreto 109/1995 sobre medicamentos veterinarios. No obstante, su puesta en marcha en las distintas comunidades autónomas tuvo lugar unos años más tarde, y sigue vigente en la actualidad.

Durante décadas los antibióticos también han sido empleados en producción animal como promotores del crecimiento. Esta técnica comenzó en los Estados Unidos a finales de los años 40, extendiéndose por todo el mundo y afectando a la ganadería porcina europea. Es cierto que los antibióticos como promotores de crecimiento se utilizan a menor concentración (desde 2,5 hasta 5 ppm), concentraciones las cuales no acaban con las bacterias, pudiendo existir así resistencias que se pasen a las siguientes generaciones. Además, estas bacterias resistentes pueden causar infecciones en el ser humano, y no responder a ningún tratamiento antibiótico. En la actualidad el uso de

antibióticos como promotores de crecimiento está prohibido (Barton, 2000; Cepero Briz, 2006).

Un 66,7 % del consumo de antibióticos total en nuestro planeta pertenece a la medicina veterinaria. Las sulfonamidas, tetraciclinas y penicilinas se encuentran entre los antibióticos más usados por este sector (Hernando-Amado *et al.*, 2019). Estos tres antibióticos pertenecientes a la categoría D (ver Figura 11), también conocida como de uso prudente, por el impacto que podría tener sobre la salud humana (Ma *et al.*, 2021).

### Uso terapéutico

Instintivamente el ser humano ha buscado remedios con los que aliviar sus padecimientos y enfermedades: claros ejemplos son los restos de hombre primitivo con heridas lamidas y realización de rituales de desparasitación, con el fin de prevenir las enfermedades. Otros hallazgos fueron un conjunto de tablillas sumerias datadas de 2150 a.C., en las que se relataban lavados de heridas cutáneas con cerveza, el uso de los primeros “antibióticos” naturales para remedios tópicos (ajo, cebolla y aloe vera), hasta la primera industrialización y utilización de la penicilina en el siglo pasado (Jácome-Roca, 2017).



**Imagen 1.** Tablillas de Nippur. Primeros grabados sobre terracota datados hace 2150 años donde se han encontrado remedios para las enfermedades infecciosas (Jácome-Roca, 2017).

También la Veterinaria ha pasado por diferentes etapas, desde el antiguo Oriente, con los primeros tratados (sobre todo, registrados para caballos), hasta el actual uso de antibióticos para producción animal y para mascotas (Jácome-Roca, 2017).

### Uso preventivo y como promotores de crecimiento

Un uso muy extendido de estos agentes antimicrobianos es el profiláctico, es una manera muy eficaz de prevenir la enfermedad, ya que elimina las poblaciones bacterianas antes de que se asienten y colonicen los tejidos animales, lo que, sin duda representa un arma de doble filo: por un lado, protege un lote de animales, incluso una

## Introducción

---

granja entera, de contraer una enfermedad. Pero, por otro, muchas bacterias, tanto las patógenas como las comensales, pueden adquirir resistencias fácilmente al estar en contacto directo con el antibiótico. Estas prácticas están cada vez más vetadas por ley, reservándose en medicina humana y veterinaria para las intervenciones pre- y postoperatorias, pero siempre con la dosis y duración adecuada de los tratamientos (Torres y Zarazaga, 2002; Cardinal *et al.*, 2019; Barbosa *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2021a).

A principios del siglo pasado, en Europa empezaron a aparecer las primeras producciones intensivas, situación que dio lugar a muchos avances en ganadería. Uno de ellos, muy importante para las siguientes generaciones de bacterias resistentes frente a los antibióticos, fue el descubrimiento de que las dosis subterapéuticas de antibióticos mejoraban los resultados en producción: más ganancia, y además menos enfermedad, mejorando notablemente las producciones intensivas y haciéndolas más rentables (Barton, 2000; Torres y Zarazaga, 2002).

En la actualidad, desde el año 2006 su uso como promotores de crecimiento está prohibido en la Unión Europea (Reglamento de la Comunidad Europea o CE nº1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre aditivos en la alimentación animal).

A nivel mundial la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la administración estatal de los Estados Unidos, a través de la Agencia para la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), restringieron en 2017 el uso como promotores de crecimiento de múltiples grupos de antibióticos. En regiones de gran tradición ganadera, como Sudamérica o Asia, aún no existen programas para mitigar el uso de antibióticos como promotores de crecimiento (Scott *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2021).

Con la utilización de estos compuestos como promotores de crecimiento se vieron claramente aumentadas estas RA. Por ello, desde 1945 hasta el día de hoy se han ido implementando medidas para prevenirlas.

- **1945-década de 1960:** Primeras advertencias del riesgo de resistencias bacterianas, demostración genética de la transmisión vertical y horizontal de genes en las bacterias (Edqvist y Pedersen, 2008).
- **1969-1975:** Comité Swann: primeras recomendaciones para dejar de utilizar antimicrobianos de uso terapéutico para la Medicina humana en pienso para evitar RA. Comienza la aplicación de las recomendaciones del comité Swann,

sobre todo en Reino Unido y la Comunidad Económica Europea. A mitad de la década. las medidas del comité Swann se relajan (Edqvist y Pedersen, 2008).

- **1984-1985:** Los ganaderos suecos solicitan a su gobierno la prohibición de los promotores de crecimiento a causa de la preocupación de los consumidores.
- **1986:** Prohibición de los promotores de crecimiento en Suecia, fundamentada en el desarrollo de RA y en sus efectos “inseguros” a largo plazo (Edqvist y Pedersen, 2008).
- **1993:** Primeros estudios que indican una relación entre el uso de avoparcina y el aumento y transmisión de los enterococos resistentes a vancomicina, antibiótico del mismo grupo (glucopéptidos) (Edqvist y Pedersen, 2008).
- **1995:** Suecia y Finlandia entran en la UE, con permiso para mantener su prohibición de los promotores de crecimiento. Prohibición de la avoparcina en Dinamarca (Edqvist y Pedersen, 2008).
- **1996:** Prohibición de la virginiamicina en Dinamarca y de la avoparcina en Alemania (Edqvist y Pedersen, 2008).
- **1997:** La UE prohíbe la avoparcina. La OMS concluye que “es esencial sustituir el uso de promotores de crecimiento” (Edqvist y Pedersen, 2008).
- **1998:** La UE prohíbe la ardamicina como promotor del crecimiento, por riesgos de resistencias cruzadas, y el uso desde 1999 de otros 4 antibióticos (virginiamicina, bacitracina, tilosina, espiramicina) como “medida de precaución” (Edqvist y Pedersen, 2008).
- **1999:** El comité científico permanente de la UE recomienda el abandono de los promotores de crecimiento que puedan ser usados en Medicina y Veterinaria, o que promuevan resistencias cruzadas. Dinamarca prohíbe todos los promotores del crecimiento (Edqvist y Pedersen, 2008).
- **2000:** La industria farmacéutica se opone judicialmente a la decisión de la UE, sin resultado (Edqvist y Pedersen, 2008).
- **2006:** Total prohibición en la UE del uso en alimentación animal de antibióticos promotores de crecimiento (Cepero Briz, 2006).

En la actualidad, siguen existiendo programas cada vez más estrictos sobre el control y abuso de estos antimicrobianos como promotores del crecimiento.

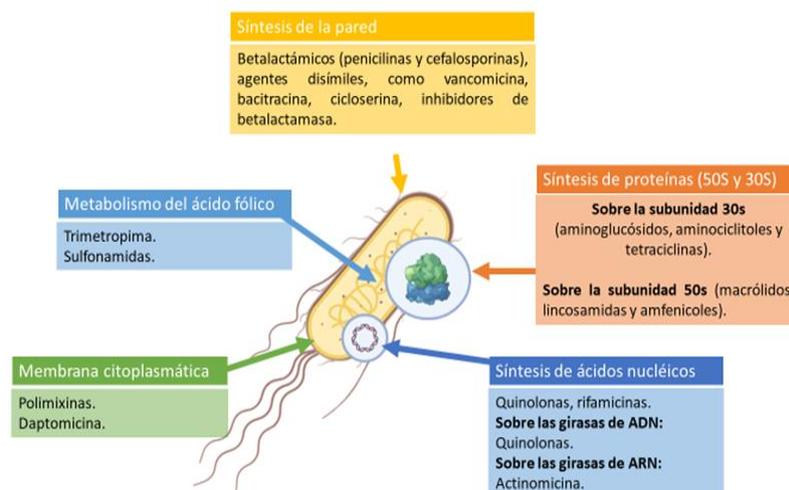
### Clasificación de los antibióticos:

Existen diferentes clasificaciones de los antibióticos dependiendo de su mecanismo de acción o de qué tipo de bacterias atacan.

Según su **mecanismo de acción**, ya sean bactericidas o bacteriostáticos, dependiendo de si matan a la bacteria o de si impiden su multiplicación, respectivamente. A pesar de ser de las clasificaciones más antigua e intuitiva, es bastante inexacta, puesto a que estos términos tienen variaciones dependiendo del tipo de microorganismo o de su concentración.

- Dependiendo de su **vía de actuación** se pueden clasificar en (Bbosa, 2014):
- Agentes que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana, y afectan la formación del peptidoglicano que conforma la estructura de la pared bacteriana.
- Agentes que afectan la síntesis de proteínas a nivel ribosomal, entre los cuales se encuentran los que actúan sobre la subunidad 30S y los que actúan sobre la subunidad 50s.
- Agentes que afectan el metabolismo de los ácidos nucleicos.
- Agentes antimetabolitos que antagonizan los pasos metabólicos en la síntesis de ácido fólico.
- Agentes que actúan en forma directa sobre la membrana celular del microorganismo.

Es probable que surjan categorías adicionales a medida que se diluciden mecanismos más complejos, pues en la actualidad se desconoce el mecanismo de acción preciso de algunos antimicrobianos.



**Figura 4:** Mecanismos de acción de los antibióticos sobre las distintas estructuras de las bacterias. Adaptación de Bbosa, (2014). Infografía creada mediante la herramienta BioRender.com por Esther Pérez Fernández.

## Introducción

---

Clasificación según sus **estructuras químicas**: esta clasificación es la más utilizada y se fundamenta en la similitud molecular de algunos antibióticos, según los núcleos base de sus estructuras, los cuales les confieren cierta semejanza en sus propiedades físico-químicas y farmacológicas (del Arco, 2014).

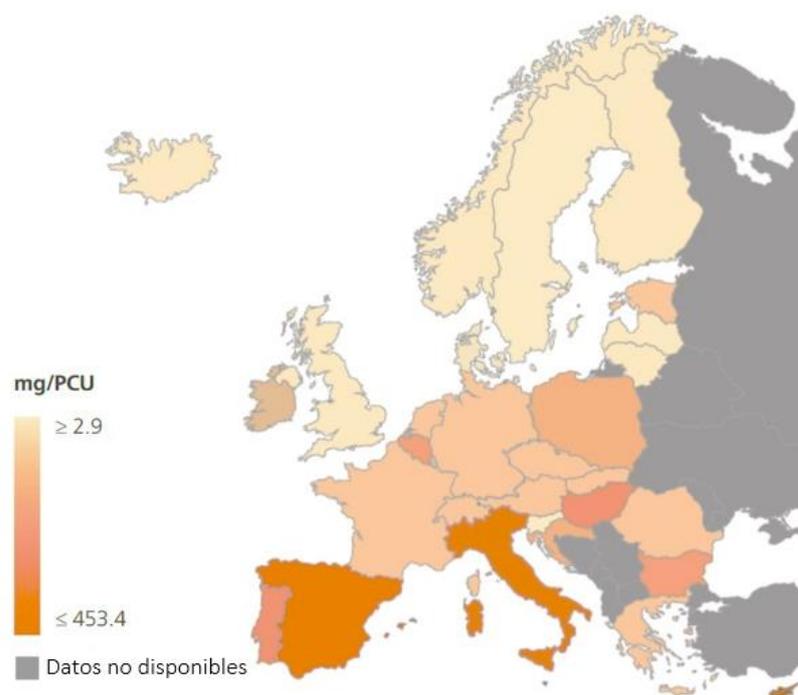
**Tabla 2.** Principales familias de antibióticos según su estructura química. Extraída de del Arco, (2014).

Grupos			
Sulfonamidas y diaminopiridinas	Sulfonamidas Diaminopiridinas	Nitroderivados	
		Anfenicoles	
Betalactámicos	Penicilinas Cefalosporinas Monobactamas Carbapenems	Peptídicos	Polipeptídicos Glucopéptidos Lipopéptidos Polimixinas
Lincosaminas		Oxazolidinonas	
Quinolonas		Fosfonatos	
Macrólidos		Aminoglicósidos	
Fusidanos		Tetraciclinas	
Oxazolidinonas		Pleuromulinas	

### Tendencias de consumo de antibióticos

El consumo de antibióticos es directamente proporcional a la carga de enfermedades infecciosas, los factores económicos, ambientales y estructurales. Los cambios de estación también alteran el consumo de antibióticos, aumentándolo en las estaciones frías, desde diciembre hasta febrero en el hemisferio norte, y desde agosto hasta septiembre en el sur. El estudio llevado a cabo por Van Boeckel (2014), en el que analizó el consumo mundial de antibióticos por los humanos durante 10 años, observó un aumento de un 36 % en los antibióticos totales consumidos, incrementando también el consumo de carbapenémicos en un 45 %, y de polimixinas en un 13 %, estas últimas consideradas como antibióticos de último recurso.

El valor de la resistencia recae en gran medida en los países de ingresos bajos y medianos (PIBM), que suelen tener una alta carga y una rápida propagación de enfermedades infecciosas, mala nutrición y tasas crecientes de consumo de antibióticos en humanos y animales, además de una atención médica más débil. Sistemas y escasos estándares y regulaciones que gobiernan el acceso, uso y calidad de los antibióticos (del Arco, 2014).



**Figura 5:** Mapa que detalla la venta de antibióticos para ganado por país en mg/PCU en 2017. Extraído de la Agencia Europea del Medicamento (AEMA, 2019).

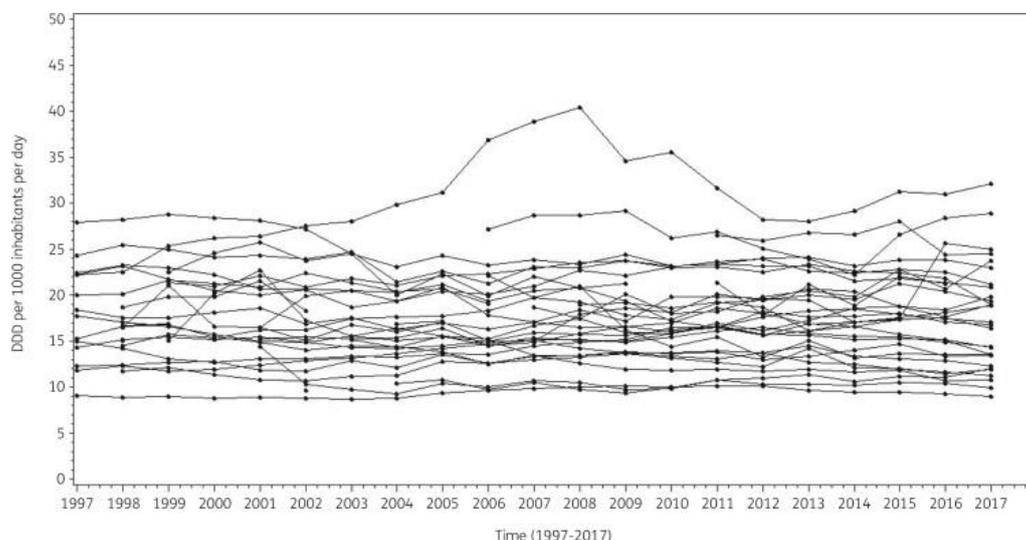
## Introducción

En Europa, el informe emitido por la AEMA “*European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC)*” recoge la venta de antibióticos durante los años 2010-2018 en la Unión Europea, tanto humanos como veterinarios. Este consumo ha disminuido en la mayoría de los países:

- Un 24 % para cefalosporinas de tercera y cuarta generación.
- Un 70 % para polimixinas.
- Un 4 % para fluoroquinolonas.
- Un 74 % para otras quinolonas.

La situación en Europa sigue siendo de contrastes: de los 25 países que proporcionaron datos, 18 observaron una disminución en las ventas de antibióticos veterinarios y las ventas generales se redujeron en más del 5 %. Sin embargo, 5 países registraron un aumento de más del 5 % y otros dos países notaron una pequeña disminución (por debajo del 2 %) en las ventas totales.

La revisión llevada a cabo a cabo por Bruyndonckx, en 2021, abarcó el estudio de las tendencias de consumo de antimicrobianos durante 20 años, desde 1997 hasta 2017 (Bruyndonckx, 2021).



**Figura 6.** Evolución del consumo de antibióticos de uso sistémico expresado en Dosis Diaria Definida (DDD) por 1000 habitantes y día, para 30 países de la UE/EEE, 1997-2017. extraído de Bruyndonckx, (2021).

Dicho estudio relevó que en la CEE-UE la evolución del consumo de tetraciclinas a lo largo del tiempo es específica de cada país. Para la mayoría de los países, la tendencia en el consumo de antibióticos se mantuvo bastante cerca de la tendencia general. Respecto a los macrólidos, la tendencia general es difusa, dependiendo mucho

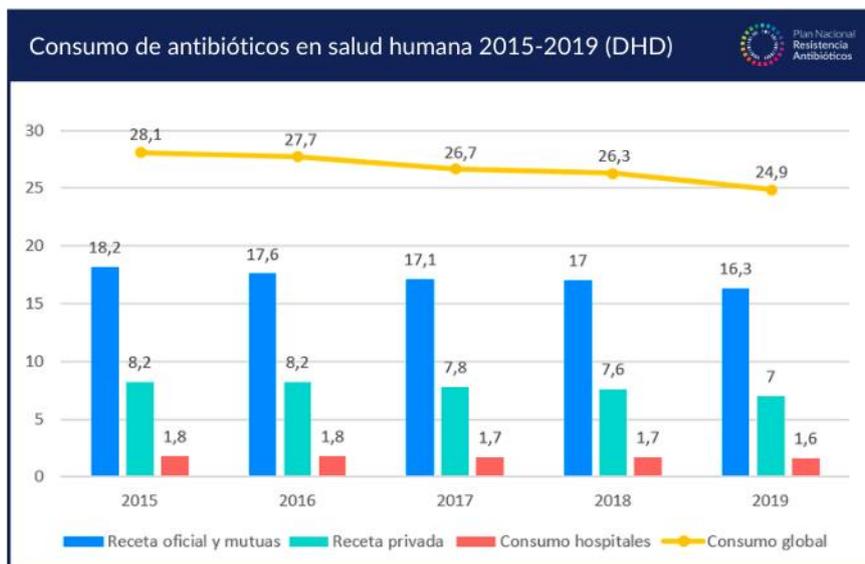
## Introducción

---

del país, se observaron tanto aumentos como disminuciones en el consumo, con el mayor aumento referido a España. De manera similar, para las penicilinas de amplio espectro, las cuales también variaron mucho entre países, observándose la mayor disminución reportada en Luxemburgo. El consumo general de antibióticos tuvo un mayor aumento en España y la mayor disminución sucedió en Finlandia. Para las cefalosporinas, el consumo aumentó en algunos países, mientras que disminuyó en otros. El mayor aumento se registró en Polonia y la mayor disminución en Luxemburgo. Para los derivados del nitrofurano no se observaron cambios significativos en la mayoría de los países. Esto podría estar relacionado con una prescripción más apropiada para las enfermedades del tracto urinario, como recomiendan muchas pautas (Bruyndonckx, 2021).

En nuestro país, la disminución del consumo de antibióticos registrada en los últimos años coincide con el desarrollo del Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN), que funciona desde 2014 bajo la coordinación de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) con el objetivo de combatir la resistencia a los antimicrobianos en España.

Respecto a la estandarización de tendencias de consumo se trata de tener en cuenta la gran variabilidad que pueden presentar los resultados en los niveles de consumos de antibióticos, expresados en miligramos por unidad de población o kilogramo de animal (mg/PCU). Según el PRAN, el sector veterinario en España ha disminuido su venta en un 32,4 %, eliminando por completo la colistina en la producción porcina. Se ha propuesto también una reducción del 80 % del consumo total para 2030 (del Arco, 2014).



**Figura 7.** Consumo de antibióticos en Medicina desde el periodo 2015 hasta 2019. DHD: Dosis Diarias Definidas (DDD) por cada 1.000 habitantes y día. Cedido por PRAN, (2020).



**Figura 8.** Consumo de antibióticos en Veterinaria desde el periodo 2014 hasta 2019. Miligramos de principio activo por Unidad de Corrección de Población (Population Correction Unit). Cedido por PRAN, (2020).

En Medicina, la tendencia hacia la disminución de las tasas de consumo comenzó en 2016, mientras que las ventas de antibióticos veterinarios comenzaron a disminuir en 2014. El consumo de antibióticos en el contexto de la pandemia COVID-19 confirma un aumento destacado en los ambientes hospitalarios, y una disminución evidente en el área comunitaria (PRAN, 2020).

### 1.3. Resistencias frente a los antibióticos

Cuando hablamos de resistencias frente los antibióticos nos referimos a la capacidad de algunas bacterias para sobrevivir frente a estos compuestos. Mediante presión selectiva, una bacteria que sobrevive en un ambiente con un antibiótico determinado puede multiplicarse y transmitir la resistencia a su descendencia. Asimismo, también es posible que tenga la capacidad de transmisión horizontal de sus genes de resistencia hacia otras bacterias. La mala praxis en la salud y la sanidad animal han sido conductas que han contribuido a aumentar las RA (Cantón *et al.*, 2018).

Dicho esto, se define a un aislado bacteriano **sensible** frente a un antibiótico cuando en un ensayo *in vitro* la bacteria deja de multiplicarse o muere ante la presencia del compuesto. Por el contrario, una bacteria se considera **resistente** cuando *in vitro* su crecimiento no es inhibido por el antibiótico (Daza Pérez, 1998).

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es la concentración antimicrobiana mínima necesaria para inhibir la multiplicación de las bacterias *in vitro*. Es necesario disponer de puntos de corte válidos para interpretar correctamente los valores de CMI (Daza Pérez, 1998). Los puntos de corte son zonas de inflexión donde se divide a una bacteria en sensible o resistente (CReSa-MAGRAMA, 2012).

Por otro lado, EUCAST (2020) también ha establecido los puntos de corte epidemiológicos (ECOFF) que separan las poblaciones que carecen o expresan mecanismos de resistencia (denominados tipo salvaje) de aquellas que los presentan y los expresan. Estos puntos no tienen que ser los mismos que los clínicos (Turnidge *et al.*, 2006). Algunos países utilizan puntos de corte clínicos, conforme a lo dispuesto por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, de aquí en adelante CLSI. Para la interpretación de los resultados, en el caso de las pruebas de sensibilidad frente a antibióticos, se realiza una mezcla de los puntos clínicos de dos organismos. Por un lado, el CLSI, y por otro lado EUCAST (Agencia Europea y Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos).

La prohibición de ciertos antibióticos ha ocasionado también el fenómeno denominado en la “*Squeezing the balloon*”, referido al suceso que ocurre tras la prohibición de un antibiótico, cuando instintivamente los profesionales de la salud recomiendan un segundo antibiótico, que en poco tiempo se pasa a consumir masivamente, generando también RA (Burke, 1998).

No existe duda de que se trata de un problema mundial. Hay múltiples causas para la RA, incluido el uso a gran escala de antibióticos en los últimos años, la prevención y el control de enfermedades, el diagnóstico microbiano, la automedicación o el tratamiento incompleto de los pacientes. También cabe destacar la falta de nuevos medicamentos antimicrobianos o la falta de compromiso con la higiene, el saneamiento y la desinfección. La mayor parte de la resistencia a los medicamentos se produce en bacterias de importante importancia médica y veterinaria (Benavides, 2005).

Los mecanismos por los cuales se han diseminado las RA son muy variados. La globalización y el tráfico aéreo también han tenido un impacto negativo en este fenómeno, todo ello sumado a la transmisión de genes de resistencia interespecie y a un mal saneamiento, tanto en granjas como en hospitales (Benavides, 2005).

Las RA han perjudicado en gran medida la medicina moderna. Existen bacterias para las que no existe ninguna, o casi ninguna, opción de tratamiento (Marston *et al.*, 2016). El economista James O'Neill, asesorado por el presidente de la Comisión Mundial de Investigación frente a antibióticos, calculó que el impacto económico por el incremento de los costos se estiman en 10 millones de muertes humanas anuales para el 2050 en y la necesidad de más 40.000 millones de dólares por década para financiar las diferentes acciones para su contención (Jim O'Neil, 2016).

Además, algunos autores como Baquero (2002) afirman que los antibióticos no solo favorecen la selección de bacterias resistentes, sino que incrementan la tasa de mutación, aumentando las posibilidades de adquisición de RA.

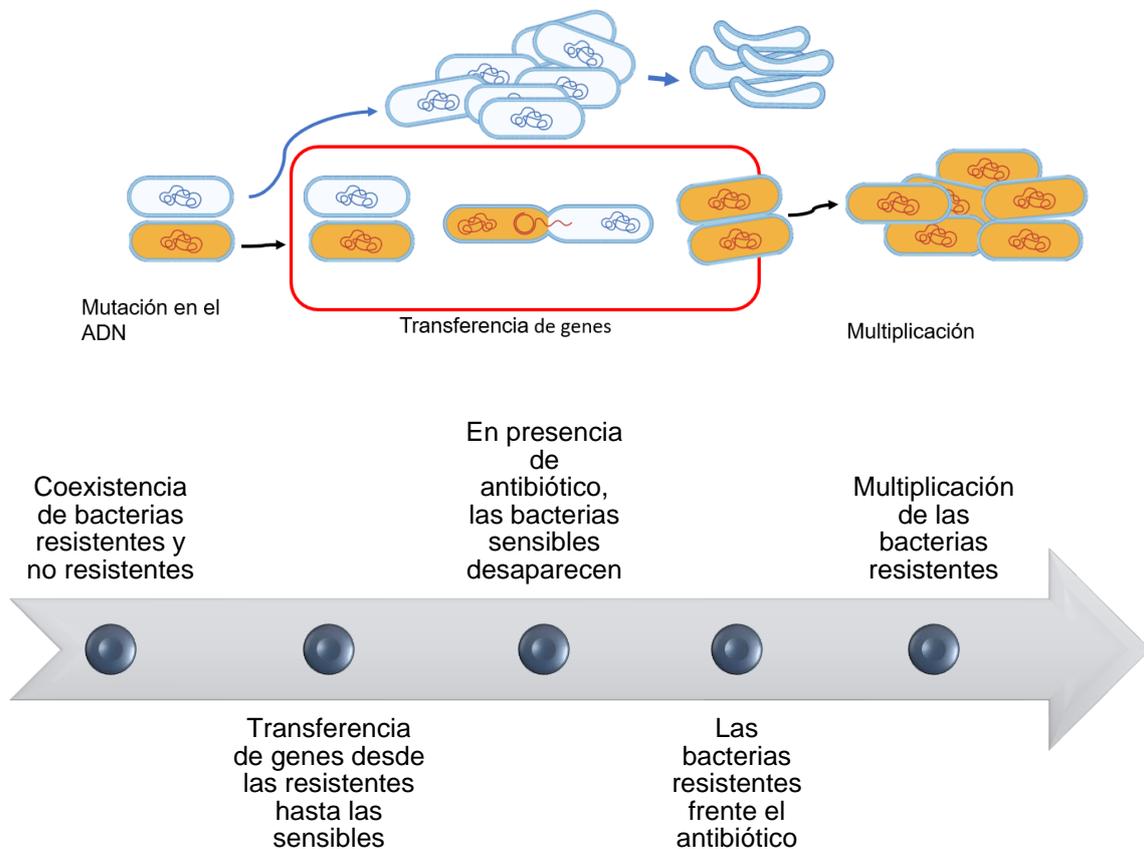
### **Tipos de resistencia**

**Natural o intrínseca.** Se trata de una transmisión vertical (de bacterias madres a las hijas). Las bacterias de la misma especie presentan resistencias frente algunas familias de antibióticos, careciendo de dianas para éstos, lo que les da ventajas respecto a otras especies. Es un aspecto invariable de todas las cepas de una misma especie, y gracias a ello el conocimiento de dichas resistencias nos ayuda en casos de la antibioterapia empírica (Daza-Perez, 1998).

**Adquirida.** Es un tipo de resistencia que afecta a antibióticos de familias diferentes. Inicialmente, la bacteria no la presenta y la obtiene del medio. Se pueden adquirir resistencias del siguiente modo:

## Introducción

1. **Mutaciones cromosómicas.** Debido a una mutación, la bacteria adquiere una nueva resistencia, la cual puede empezar a transmitir a las siguientes generaciones (Sumano, 2006).
2. **Intercambio de genes** entre bacterias de la misma o distintas especies. Pueden realizarla por transferencia horizontal de genes a través de diferentes procesos: conjugación (vía plásmidos u otro material genético móvil, como integrones y transposones), traducción o transformación. De esta forma, una bacteria puede adquirir la resistencia a uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con éstos.



**Figura 9:** Proceso de mutación e intercambio de genes bacterianos representando la transmisión de genes de resistencia frente a antibióticos. En naranja, las bacterias mutantes; en azul, la población inicial. Infografía adaptada de NIAID (2021), mediante la herramienta BioRender.com por Esther Pérez Fernández.

### **Regímenes actuales sobre estrategias frente a resistencias**

Está claro que esta situación ha llevado a las autoridades competentes a tomar medidas al respecto. Una de las estrategias más colaborativas ha sido el enfoque “*One Health*”, que postula tanto la salud humana, como la sanidad animal y el medio ambiente están interrelacionadas. Y para poder obtener beneficios y ventajas en una de ellas hay que progresar y controlar las otras. De nada sirve controlar las resistencias hospitalarias cuando se están vertiendo residuos de antibióticos en el ecosistema, o cuando se están suplementando los piensos con antibiótico (Hernando-Amado *et al.*, 2019).

En este sentido, existe un claro consenso respecto al enorme número de genes asociados a la resistencia a los antibióticos y de bacterias resistentes que está presente en diferentes ecosistemas interconectados: hospitales, granjas, plantas de tratamiento de aguas residuales, ambientes naturales, etc (Allen *et al.*, 2010; Aarestrup, 2015).

Por consiguiente, las acciones específicas de estos planes de acción incluyen tanto el ámbito de la medicina humana y veterinaria como el ámbito medioambiental. Entre sus objetivos destacan el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos, la reducción del uso de los antibióticos y el control o limitación en la propagación de las bacterias resistentes y genes de resistencia, así como la restauración de poblaciones bacterianas sensibles.

### **Europa**

Según el informe emitido por el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades, en 2013, los consumos de antibióticos en diferentes países nos han mostrado que el 30 % de los pacientes hospitalarios europeos consumen, al menos, un antibiótico en su estancia. Y que en España esta cifra aumenta hasta el 46 %, siendo los quintos en Europa (ECDC, 2013).

Apoiando esta tendencia encontramos el estudio publicado por Cassini en 2019, que señala que, en toda Europa alrededor de 33.000 personas mueren cada año como consecuencia de las infecciones hospitalarias causadas por bacterias resistentes (Cassini *et al.*, 2019). Conforme con los datos del Registro del Conjunto Mínimo Básico de Datos (CMBD), en 2016 murieron en España 2.956 personas como consecuencia de estas RA. Según la OPS se estima que para 2050 alrededor de 10 millones de personas morirán al año por bacterias resistentes frente a antibióticos (CMBD, 2017).

## Introducción

---

Si bien es cierto que son numerosos los factores que favorecen las RA no cabe duda de que el uso inapropiado de estos antimicrobianos constituye el factor principal de este problema. Como se verá en el siguiente apartado, la legislación fundamental para el cumplimiento de los programas de disminución de consumo de antibióticos.

En los próximos años, las RA serán una de las principales causas de mortalidad y morbilidad a nivel global, y, además, como se ha descrito anteriormente, esta crisis está en auge tanto en salud humana y como sanidad animal y medio ambiental. Esta situación ha generado una necesidad de vigilancia del consumo de estos antimicrobianos para reducirlos, para poder controlar mejor sus resistencias (Cassini *et al.*, 2019).

La carencia de nuevos antibióticos en el mercado, los cuales permitan luchar contra estas resistencias, es otro factor fundamental que desencadena la situación actual. Por una parte, los laboratorios no siguen invirtiendo en nuevos medicamentos antimicrobianos por falta de rentabilidad, y por otro muchos de los antibióticos actuales se enfrentan a las multiresistencias de numerosas bacterias. Es esencial mantener la efectividad de los antibióticos actuales y buscar alternativas a uso (ECDPC, 2013).

Ante esta situación, varias organizaciones a nivel mundial han identificado la necesidad de establecer estrategias comunes, como, por ejemplo, los Programas de Optimización de Uso de los Antibióticos (PROA), los cuales nos aseguran mejoras en el uso de antimicrobianos, tanto en medicina humana (pacientes hospitalarios) como en medicina veterinaria (Vilaró *et al.*, 2020).

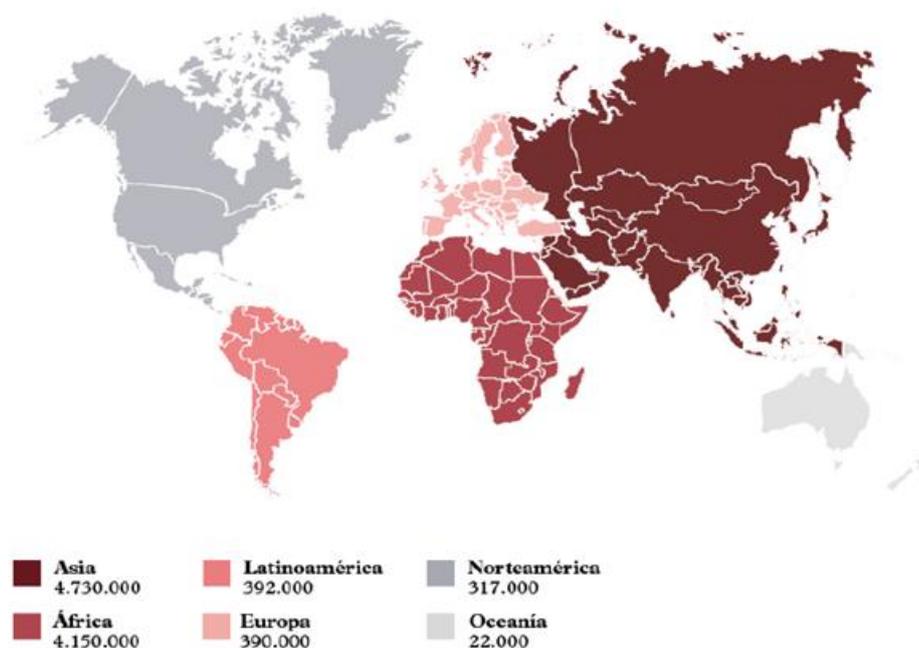
Tanto la OMS como la Comisión Europea coinciden en que para tener éxito en esta batalla la lucha ha de ser global y multidisciplinar, lo cual se ha reflejado en el establecimiento de normativas de organizaciones como la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Creando así medidas de vigilancia e implementación de nuevos protocolos de detección de estas RA, y también medidas para prevenir y controlar las infecciones. Por otro, las otras organizaciones más específicas, como la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS) emiten alertas para frenar este fenómeno, en concreto ha emitido 5 alertas epidemiológicas en la última década. La más reciente sobre la emergente resistencia transferible a colistina con hallazgos en países de la región como Brasil, Colombia, Argentina, Estados Unidos y

## Introducción

---

Canadá. También en Europa se han empezado a aplicar las leyes para la reducción de usos de antimicrobianos, y también en medicina veterinaria (OPS y OMS, 2016).

La concienciación sobre este problema empieza desde la prescripción por los profesionales de la salud hasta la difusión a población de cómo hay que consumirlos. Entre otros Gabriel Levy Hara, experto de la OPS en uso racional de antimicrobianos, considera muy importante el cumplimiento de las guías de uso racional de estos en cada país (OPS, 2014).



**Figura 10.** Distribución geográfica de las muertes estimadas asociadas, a la multirresistencia bacteriana (O'Neill, 2016).

A principios de 2000, en la Unión Europea ya existían conciencia de esta problemática, a pesar de que lo más común fuese la administración de antibióticos sin la realización de ningún tipo de antibiograma, la idea de un estudio específico para cada enfermedad particular aún no estaba contemplada. En 2001, la Comisión Europea invirtió en el proyecto de Vigilancia Europea del Consumo de Antimicrobianos (ESAC) con el objetivo de recopilar datos comparables y fiables sobre el consumo de antibióticos en Europa. Hoy en día, en Europa el Consejo de la Unión Europea, el Parlamento Europeo, la Comisión Europea y sus Agencias (EMA, ECDC, HMA, EFSA) están al frente de los programas de lucha contra la RA (Vander *et al.*, 2004).

Algunos países habían iniciado programas para la monitorización del consumo de antibióticos a nivel de las explotaciones o granjas. Dinamarca es un país pionero en la UE, puesto que desde 2005 clasifica las explotaciones animales en función del uso de antimicrobianos. Por ello, cuando una granja emplea el doble o más antimicrobianos que la media nacional se identifica con una tarjeta amarilla y el propietario está obligado a implantar medidas para reducir el consumo. Gracias a estas medidas se redujo en el consumo de antimicrobianos en un 25 % en las explotaciones porcinas entre 2009 y 2011 (Jensen y Hayes, 2014).

Otros países han imitado sistemas similares de recogida de información a nivel de explotaciones, que abarcan la totalidad o a una parte importante de las granjas, como sucede, por ejemplo, en el caso de Holanda, desde 2010 ,o en Bélgica desde 2014 (Speksnijder *et al.*, 2015).

En Europa existen distintos patrones de consumo de antibióticos, siendo los países del norte los que menor consumo presentan, relacionado también con su menor porcentaje de granjas de porcino. Correlacionando con su consumo de antibióticos, podemos observar que son estos países los que menor tasa de RA presentan (ECD, y EMA, 2021).

El 16 de marzo de 2015, la Comisión Europea adoptó la Decisión de Ejecución de la Comisión C (2015) 1916 final, relativa, en el marco del artículo 35 de la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, a las autorizaciones de comercialización de todos los medicamentos veterinarios que contienen “colistina” para administración por vía oral. El 27 de julio de 2016, la EMA publicó el documento sobre el uso de colistina en la Unión Europea, donde establece un umbral máximo de uso de 5 mg/PCU, que deberán alcanzar los estados miembros en un periodo de tres años.

También la EMA ha establecido categorías para clasificar el uso de los antimicrobianos se según el estado en el que se encuentran frente a RA. Estas categorías son la A (evitar), B (restringir), C (precaución) hasta D (prudencia), como podemos observar en la figura 11. Ante una situación en la que se ha de administrar antibiótico, se utilizarán primero los de la categoría D, posteriormente los de las C y B si los tratamientos anteriores no dan efecto. En Veterinaria promueve la justificación del uso de antibióticos y las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para una buena selección de antibióticos (EMA *et al.*, 2019) .

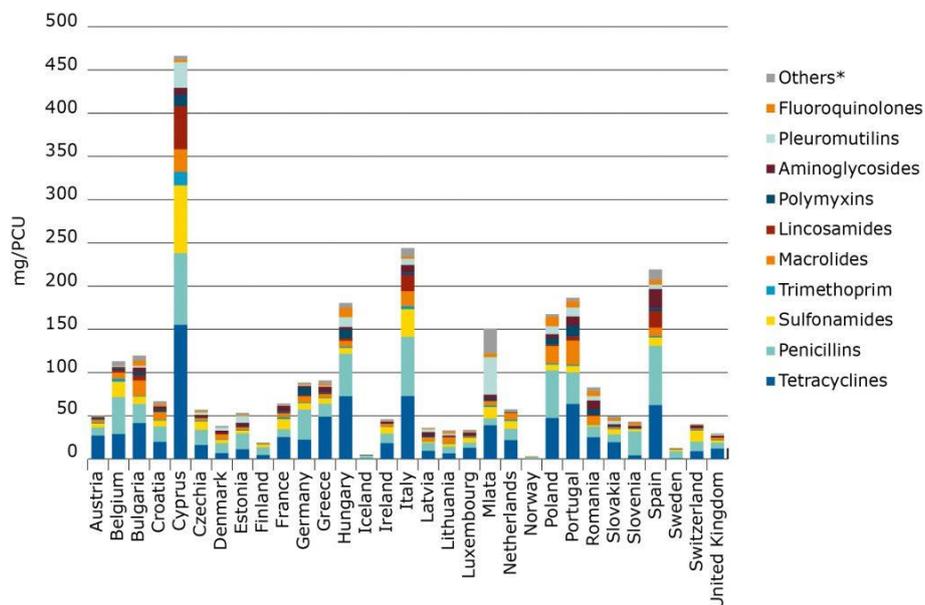
## Introducción

A	<b>Aminopenicilinas</b> mecilina pivmecilina	<b>Carbapenems</b> meropenem doripenem	<b>Fármacos utilizados exclusivamente para tratar la tuberculosis u otras enfermedades micobacterianas.</b>  isoniazida etambutol pirazinamida etionamida	<b>Glucopéptidos</b> vancomicina	EVITAR
	<b>Ketólidos</b> telitromicina	<b>Lipopéptidos</b> daptomicina		<b>Gliciliclinas</b> tigeciclina	
	<b>Monobactámicos</b> aztreonam	<b>Oxazolidinonas</b> linezolid		<b>Derivados del ácido fosfónico</b> fosfomicina	
	<b>Rifamicinas (excepto rifamicina)</b> rifamicina	<b>Riminoferazinas</b> clofazimina		<b>Ácidos pseudomónicos</b> mupirocina	
	<b>Carboxipenicilina y ureidopenicilina, incluidas las combinaciones con inhibidores de beta-lactamasas.</b> piperacilina-tazobactam	<b>Sulfonas</b> dapsona		<b>Sustancias nuevas autorizadas para medicina humana tras la publicación de la clasificación del AMEG.</b> por determinar	
	<b>Estreptograminas</b> pristinamicina virginamicina				
B	<b>Cefalosporinas, de 3ª y 4ª generación, excepto las combinaciones con inhibidores de beta-lactamasas</b> cefoperazona cefovecina cefquinoma ceftiofur	<b>Polimixinas</b> colistina polimixina B	<b>Quinolonas: fluoroquinolonas y otras quinolonas</b>  cinocaxina danofloxacina difloxacina enrofloxacina flumequina ibafloxacina	marbofloxacina norfloxacina orbifloxacina ácido oxolínico pradofloxacina	LIMITAR
C	<b>Aminoalucósidos (excepto espectinomocina)</b> amikacina apramicina dihidroestreptomocina framicina gentamicina kanamicina neomicina paromomicina estreptomocina tobramicina	<b>Aminopenicilinas, en combinación con inhibidores de la beta-lactamasa</b> amoxicilina+ácido clavulánico ampicilina + sulbactam	<b>Anfenicoles</b> cloranfenicol florfenicol tianfenicol	<b>Macrólidos</b> eritromicina gamitromicina oleandomicina espiramicina tildipirosina tilmicosina tulatromicina tilosina tilvalosina	PRECAUCIÓN
		<b>Cefalosporinas, de 1ª y 2ª generación, y cefamicinas</b> cefacetrilo cefadroxilo cefalexina cefalonio cefalotina cefapirina cefazolina	<b>Lincosamidas</b> clindamicina lincamicina pirimicina		
			<b>Pleuromutilinas</b> tiamulina valnemulina		
D	<b>Aminopenicilinas, sin inhibidores de la beta-lactamasa</b> amoxicilina ampicilina metampicilina	<b>Aminoalucósidos, espectinomocina en monoterapia</b> espectinomocina	<b>Sulfonamidas, inhibidores de la dihidrofolato reductasa y combinaciones</b>  formosulfatiazol ftalilsulfatiazol sulfacetamida sulfaclopiridazina sulfaclozina sulfadiazina sulfadimetoxina sulfadimidina sulfadoxina sulfafurazol sulfaguandina  sulfaleno sulfamerazina sulfametizol sulfametoxazol sulfametoxipiridazina sulfamonometoxina sulfanilamida sulfapiridina sulfaguinoxalina sulfatiazol trimetoprima		CAUTELA
	<b>Tetraciclinas</b> clortetraciclina doxiciclina oxitetraciclina tetraciclina	<b>Penicilinas antiestafilocócicas (penicilinas resistentes a beta-lactamasas)</b> cloxacilina dicloxacilina nafciclina oxacilina			
	<b>Penicilinas naturales de espectro reducido (penicilinas sensibles a beta-lactamasas)</b> benzilpenicilina benzatina fenoximetilpenicilina benzatina benzilpenicilina penetamato hidróxido	feneticilina fenoximetilpenicilina benzilpenicilina procaína			
		<b>Polipéptidos cíclicos</b> bacitracina	<b>Nitroimidazoles</b> metronidazol		
		<b>Esteroides antibacterianos</b> ácido fusídico	<b>Derivados de nitrofurano</b> furaltadona furazolidona		

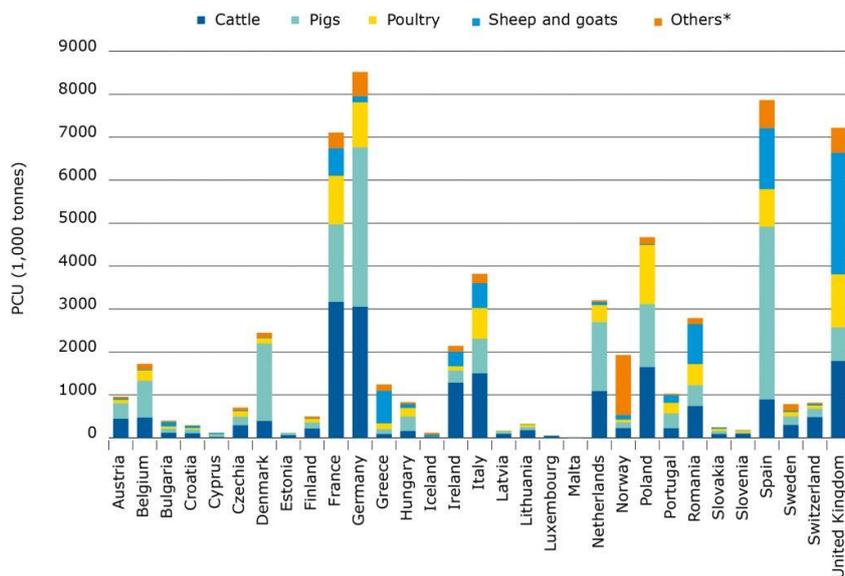
**Figura 11:** Clasificación de los antibióticos de uso veterinario. Extraído de Agencia Europea del Medicamento (EMA, 2019).

Con vistas a las nuevas legislaciones, Europa aplicará una normativa mucho más estricta sobre el uso de antimicrobianos de uso veterinario. El informe publicado en octubre de 2020 por la Agencia Europea del Medicamento recoge las ventas de agentes antimicrobianos en veterinaria en 31 países europeos en 2018 (ver figuras 12 y 13) (EMA, 2020).

**Ventas de clases de antimicrobianos (mg/PCU) en animales productores de alimentos en 31 países europeos en 2018**



**Figura 12:** Ventas de antimicrobianos (mg/PCU) en animales productores de alimentos, en 31 países europeos en 2018 (EMA, 2020).



**Figura 13:** Denominador (PCU) y su distribución por especies animales productoras de alimentos (1 PCU=1 kg). Others incluye caballos, peces de piscifactoría y conejos. En color turquesa se representa el ganado porcino (EMA, 2020).

Especialmente interesante es la evolución del consumo de antibióticos del grupo B (interés crítico en medicina humana) en la UE, del que se ha reducido el consumo un

33 %. Cabe recordar que los antibióticos de este grupo son los que han centrado la presión administrativa sobre la prescripción especialmente en el caso de la colistina, que ha visto reducido su consumo en un 70 %.

### **España**

El Ministerio de Sanidad, la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) han creado el Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN) con período de vigencia de cinco años (2014- 2018) y un dando un enfoque integral a la problemática de las RA.

Además, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) se encarga de ello, informando fuentes, tendencias en microorganismos comensales, zoonóticos y patógenos zoonóticos. Para facilitar esta tarea, el Parlamento Europeo y el Consejo publicaron la Decisión 2013/652/UE, por la que se analizarán los datos de resistencia en cerdos de engorde y bovinos menores de 1 año en "los años impares" (2015, 2017, 2019), mientras que, para aves (pavos y pollos de engorde) se hará en "años pares" (2014, 2016, 2018 y 2020). Todas las organizaciones postulan que el cambio ha de empezar por las personas que legalmente pueden pautar antibióticos (médicos y veterinarios), pasando por farmacéuticos y farmacólogos clínicos, microbiólogos y todos los profesionales dedicados a la vigilancia y estudio de las resistencias antimicrobianas, teniendo siempre en cuenta aquellas entidades que favorezcan las estrategias de concienciación social, y las responsables de las Administraciones.

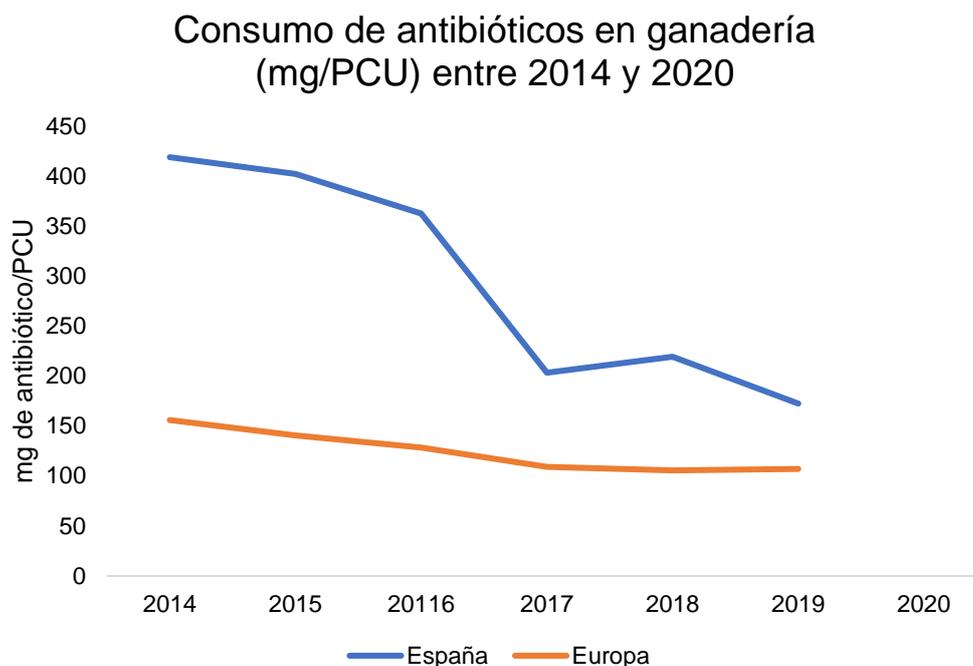
Anualmente, la EMA publica el informe ESVAC relativo a las ventas de antimicrobianos en Veterinaria. EFSA y el ECDC han puesto en marcha programas para el seguimiento de la resistencia en bacterias zoonóticas y en bacterias indicadoras, estableciendo legalmente las especies animales y los alimentos de origen animal que deben monitorizarse anualmente en los países miembros.

Los programas de monitorización actuales presentan ciertas limitaciones; en lo que respecta al consumo de antibióticos en el que no es posible, por el momento, proporcionar datos relativos al consumo en diferentes especies animales, siendo este dato muy necesario para poder distribuir los esfuerzos y concentrar las actuaciones en aquellas producciones ganaderas asociadas a un mayor consumo. En este sentido y a pesar de la falta de información, la mayoría de los trabajos coinciden en señalar a la producción porcina como la responsable de una parte importante del consumo de antibióticos en Veterinaria (Cromwell, 2002; Aarestrup *et al.*, 2008).

## Introducción

La creación del plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de resistencias a los antibióticos, encabezado por la AEMPS convoca a todos los profesionales involucrados para cumplir el requerimiento de la Comisión Europea. Derivado de esta situación nace el PRAN.

En España, todos los medicamentos veterinarios se encuentran bajo preinscripción, otorgando el poder de dispensación únicamente a los veterinarios. Además, cada una de las ventas se registra y monitoriza para poder llevar un control más riguroso del consumo. Los alimentos medicados que contienen premezclas con antibióticos también deben ser recetados por un veterinario, y únicamente pueden ser fabricados por fábricas de piensos aprobadas por las autoridades regionales competentes. Cada una de las ventas se monitorizan para poder llevar un control más riguroso del consumo (EMA y ESVAC, 2018).



**Figura 14:** Adaptación propia de Vigilancia Europea del Consumo de Antimicrobianos Veterinarios (ESVAC, 2021)

Un informe llevado a cabo en 25 países europeos en 2013 mostró que el 44,3 % de los veterinarios llevaban a cabo la prescripción de antibióticos sin haber recogido,

muestras para la identificación del agente patógeno y la realización del perfil de resistencias. (De Briyne *et al.*, 2013)

Según el estudio publicado por Bruyndonckx en 2021, en el que se analizaron datos del consumo de antibióticos en 30 países de la CEE y UE durante dos décadas (desde 2007 hasta 2017), se concluye que el consumo de antibióticos en los países de la UE/CE se modificó a medida que la legislación fue modificándose durante 1997-2017. Dadas las limitaciones de un modelo que contiene puntos de cambio específicos de cada país, las recomendaciones indican que cada país deben llevar a cabo sus propios análisis individualmente, con sus propios datos e información para mejorar el consumo de antibióticos en la comunidad (Bruyndonckx *et al.*, 2021).

Estos cambios en la legislación han hecho posible a una gran disminución del consumo de antibióticos, tanto en España como en Europa, como podemos apreciar en la figura 14.

### **Resistentes en el sector porcino**

El líder en consumo de antibióticos del sector ganadera es el sector porcino, con un consumo muy superior al de otras especies ganaderas, sobre todo en lactación y destete (Lekagul *et al.*, 2019).

### **Programa “REDUCE”**

En 2016 la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, junto con representantes de las asociaciones de profesionales, desde empresarios a veterinarios del sector porcino, se reunieron para firmar junto con el PRAN, un plan adicional y voluntario denominado “Acuerdo para la Reducción Voluntaria del Consumo de Colistina en el Sector del Ganado Porcino de España”, o también “REDUCE porcino”.

El “programa REDUCE porcino” tomó como objetivo reducir el consumo de la colistina, también conocida como polimixina E, a un total de 5 mg/PCU en 3 años, así como tratar de controlar el uso de otros antibióticos alternativos, como la neomicina y la apramicina. Actualmente, más de 100 empresas españolas participan en este programa. Los resultados del programa REDUCE han sido muy favorables, con una reducción del 97,18 % del consumo de este medicamento para el ganado porcino (PRAN, 2020).

### 1.4. Alternativas al uso de antibióticos

Durante los últimos años las alternativas al uso de antibióticos están en auge, así lo informan el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC), la Autoridad Europea de seguridad Alimentaria (EFSA) y la Agencia Europea del Medicamento (EMA) en su revisión de 2017, la cual destaca el uso de alternativas administradas a los animales mediante la alimentación, como pueden ser los probióticos, prebióticos, compuestos derivados de plantas, bacteriófagos, péptidos y agentes inmunomoduladores. Por otro lado, defiende que el estado sanitario de los animales es fundamental para prevenir las patologías que preceden al uso de antibióticas, estas medidas son el manejo, la bioseguridad, la limpieza y la desinfección.

Se observó que a pesar del gran número de artículos en los que se proponen estos agentes como posibles alternativas a los antimicrobianos, sólo una pequeña proporción de estos informes incluyeron estudios *in vivo*. Las alternativas al uso de antibióticos se encuentran fuera del campo de los productos autorizados por la UE como medicamentos veterinarios, que como confirma la directiva Europea 2001/82/EC estos quedarán reservados para ser recetados exclusivamente por el profesional correspondiente. Por otro lado los aditivos para piensos, definidos en el Reglamento (CE) N° 1831/2003 , son productos utilizados en la alimentación animal para mejorar la calidad de los piensos, o también para mejorar el rendimiento y el bienestar de los animales, por ejemplo, proporcionando una mayor digestibilidad de las materias primas. En este apartado podemos encontrar el ácido láurico y su éster derivado. El procedimiento de autorización de los aditivos para piensos en virtud del Reglamento (CE) N° 1831/2003, tal como se define en el Reglamento (CE) N° 429/2008, exige que se demuestre la seguridad para el consumidor de alimentos de origen animal, para la especie animal de destino, para el usuario/trabajador expuesto al aditivo y para el medio ambiente. Además, deberá demostrarse la eficacia del aditivo. La principal diferencia entre los medicamentos veterinarios y los aditivos para piensos radica en el estado de salud del animal (los aditivos para piensos deben utilizarse en animales sanos, mientras que los medicamentos veterinarios en animales enfermos o potencialmente enfermos) (ECDC, EFSA & EMA, 2017).

Para reducir el uso de antimicrobianos en la cría de animales en la UE las recomendaciones se centran en el beneficio previsto para la salud pública mediante la reducción del uso general de antibióticos en la producción ganadera. Esto debe

equilibrarse con la necesidad de proteger la salud y el bienestar de los animales y de garantizar la productividad del ganado. La finalidad estas es adoptar un enfoque integral y multidisciplinar para reducir el uso de antimicrobianos en la industria ganadera.

La mejora de los procedimientos zootécnicos y de gestión para la prevención, el control y la erradicación de las enfermedades infecciosas en la producción ganadera deberían optimizarse con prevención primaria (limitar la entrada de patógenos en una instalación, con especial atención a la bioseguridad externa y otras medidas pertinentes para reducir las principales vías de transmisión) y secundaria (reducir la transmisión dentro de la granja, incluye medidas de bioseguridad interna y procedimientos adecuados de limpieza y desinfección). Cada uno de estos principios de prevención de enfermedades es aplicable tanto en la explotación como dentro de una red de explotaciones, agrupadas geográficamente o basadas en vínculos comerciales, o a lo largo de la cadena de valor de una especie de producción. Los efectos adversos sobre el bienestar de los animales deben ser considerados antes de su aplicación (ECDC, EFSA & EMA, 2017).

### **Bioseguridad**

Cuando hablamos de bioseguridad en granja, hacemos referencia al conjunto de prácticas que minimizan el riesgo de introducción y propagación de los agentes etiológicos de las enfermedades infecciosas. El control de los procesos de bioseguridad sumado a un buen manejo de los animales, hace mucho más difícil los brotes de enfermedades endémicas y epidémicas (Damiaans *et al.*, 2018).

Reduciendo esta presión de contagio también se da tregua al sistema inmune de los animales, suscitando menos brotes y mejorando la sanidad y bienestar de toda la piara. Todo apunta a que una mejora en la bioseguridad estará relacionada con mejores resultados productivos, y con una mejor rentabilidad de las granjas, así como con un menor consumo de antibióticos (Postma *et al.*, 2016; Rojo-Gimeno *et al.*, 2016).

Dentro de la bioseguridad podemos distinguir dos tipos, dependiendo de las zonas de la granja:

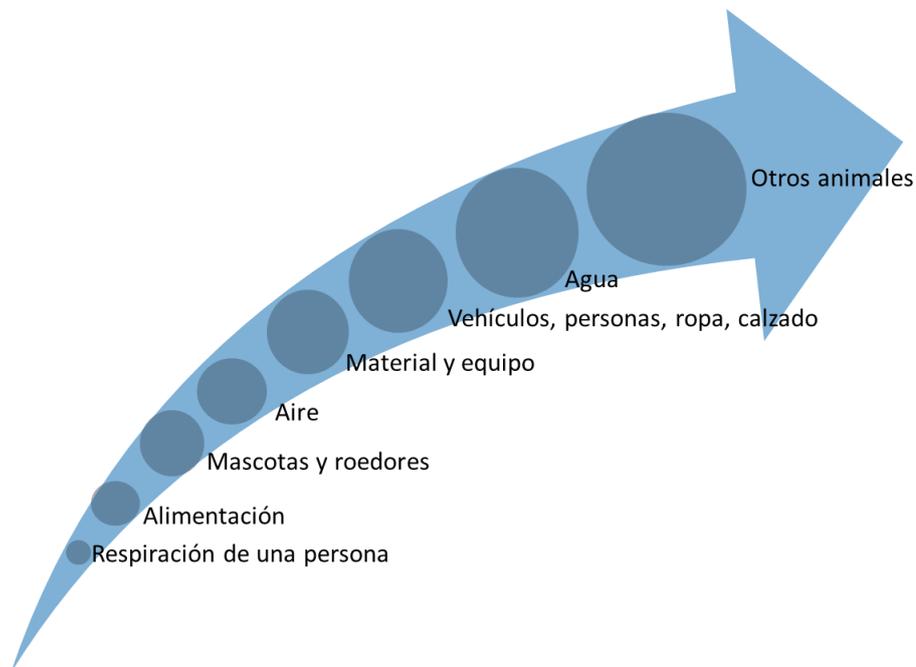
- **Bioseguridad interna**: cualquier medida que contrarreste la propagación de patógenos dentro de una granja (Laanen *et al.*, 2010).
- **Bioseguridad externa**: cualquier medida que conecte la granja con el mundo exterior. Evita que cualquier organismo patógeno entre o salga de la granja (Ribbens *et al.*, 2008).

## Introducción

**Tabla 3.** Aspectos más relevantes de la bioseguridad externa e interna (elaboración propia).

Bioseguridad interna	Bioseguridad externa
Manejo de enfermedades	Compra de cerdos de cría, lechones y semen
Período de parto y amamantamiento	Transporte de animales, eliminación de estiércol y cadáveres
Unidad de cría	Suministro de alimento, agua y materiales
Unidad de engorde	Los visitantes y los trabajadores agrícolas
Medidas entre compartimentos, líneas de trabajo y uso del equipo	Control de plagas y aves
Limpieza y desinfección	Ubicación de la granja

Respecto al control de las enfermedades no todas las vías presentan la misma probabilidad de transmisión. Debido a ello, no todas las medidas de bioseguridad tendrán el mismo peso en la prevención de enfermedades en granja. Como podemos ver en la figura 15, la respiración de una persona dentro de una granja tendrá menor poder de transmisión de una enfermedad que la introducción de agua contaminada o de otros animales que actúen como vectores de transmisión (Dewulf *et al.*, 2018).



**Figura 15:** Importancia relativa de las diferentes vías de transmisión de los patógenos entre granjas (Laanen *et al.*, 2010).

### Higienización

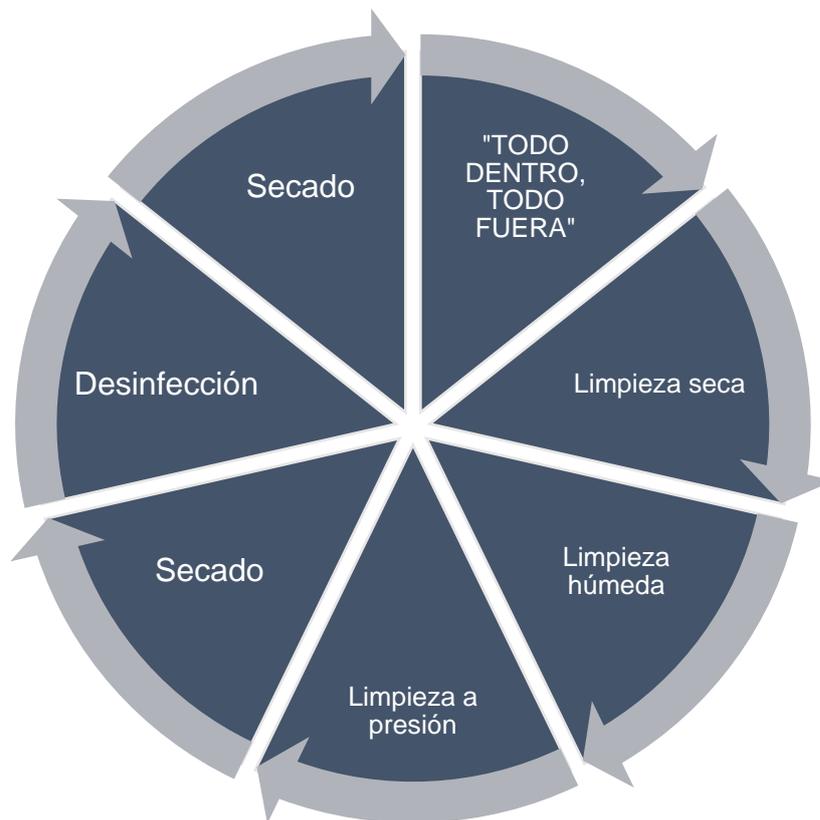
Un buen control de las enfermedades comienza desde la limpieza de las instalaciones. Con una retirada correcta de materia orgánica, seguida de una limpieza, desinfección y secado adecuado conseguiremos que la granja esté menos expuesta a las enfermedades infecciosas. Además, no se transmitirán los microorganismos a la siguiente ronda del ciclo productivo. La limpieza minimiza los agentes infecciosos que pueden afectar a la calidad y seguridad de los animales. Por otro lado, la desinfección reduce la carga de microorganismos (Amass y Clark, 1999; Hurd *et al.*, 2001; Dewulf, 2014).

Tenemos que considerar la limpieza y desinfección como dos fases del proceso de higienización, con sus correspondientes pasos y productos. Los fallos en la retirada de materia orgánica durante el proceso de limpieza harán que el desinfectante no actúe sobre una determinada superficie. Tras cada ciclo productivo se ha de realizar un ciclo de limpieza y desinfección, seguido de un higienograma, o de un periodo antes de la introducción del siguiente lote de cerdos (Böhm, 1998). Diversos autores convergen en que un buen protocolo de limpieza y desinfección ha de tener (De Reu *et al.*, 2016; Reicks, 2019):

1. La retirada de cualquier objeto que pueda entorpecer los procesos de limpieza y desinfección, para evitar cualquier recoveco en el que pudiera aparecer suciedad. Se ha de realizar el sistema “rodo dentro, todo fuera”.
2. Una limpieza en seco, centrada en una buena retirada del material orgánico.
3. Una limpieza húmeda: aplicando agua y detergente en todas las superficies.
4. Una limpieza presión para eliminar toda la suciedad y aclarar las superficies.
5. Secado, para evita la dilución del desinfectante aplicado en el siguiente paso.
6. Una desinfección, aplicación y retirada del producto desinfectante, dejándole actuar el tiempo necesario establecido por el fabricante.
7. Un secado final.
8. Una prueba de la eficacia del procedimiento a través del muestreo de la superficie mediante el método del higienograma. Si el resultado de todos los pasos es favorable, no es necesario esperar un periodo sin cerdos hasta el siguiente lote.

En ganadería se conoce como “todo dentro, todo fuera” un tipo de procedimiento de limpieza y desinfección en el que, para empezar, los diferentes grupos de cerdos no deben mezclarse durante su estancia en la granja, y a que cuando un grupo de cerdos

pasa a la siguiente fase del ciclo de producción, todo el corral se vacía por completo, se limpia y desinfecta para evitar las posibles contaminaciones cruzadas (Dewulf, 2014; Maes *et al.*, 2008, Backhans *et al.*, 2015).



**Figura 16:** Esquema de un buen protocolo de limpieza y desinfección en granja, basado en De Reu *et al.*, (2016) y Reicks (2019).

### **Limpieza:**

Es el pilar fundamental de todo el proceso, la presencia de materia orgánica o, lo que es lo mismo, una mala limpieza de la instalación es un problema a dos escalas: por un lado, el desinfectante no penetrará en la superficie con los microorganismos, haciendo que el proceso de higienización no haya servido de nada. Por otro lado, esa materia orgánica fuente de nutrientes, sumada a las temperaturas que existen en granja, son un perfecto caldo de cultivo para la proliferación de todo tipo de microorganismos. (Stepanovic *et al.* 2003). La clave de una buena limpieza reside en la eliminación de la suciedad orgánica, como mediante la acción mecánica y los detergentes.

### **Desinfección:**

La desinfección es muy necesaria para evitar la proliferación de los microorganismos causantes de transmitir y causar enfermedades infecciosas en granja. (Bragg *et al.*, 2018). Teniendo en cuenta la gran diversidad de superficies donde un desinfectante puede actuar y la variedad de microorganismos que puede eliminar, un desinfectante tiene que reunir ciertos requisitos para ser seguro y eficaz. Las características más deseables a la hora de elegir un desinfectante son (Wildbrett, 2000):

- Gran espectro de acción frente a los microorganismos
- Que no genere resistencias
- Que sea lo más eficaz posible en las aguas duras y con los residuos orgánicos
- Soluble en agua y fácil de limpiar
- Que no transmita olores ni sabores al entorno
- Que no sea irritante ni tóxico para las mucosas durante su empleo
- Que no contamine el medio ambiente

Existe también en el mundo de la desinfección el fenómeno de las resistencias cruzadas, que no ocurre por una resistencia intrínseca, sino por una mala utilización no respetando las concentraciones pautadas por los fabricantes (Bloomfield, 2002, 2003).

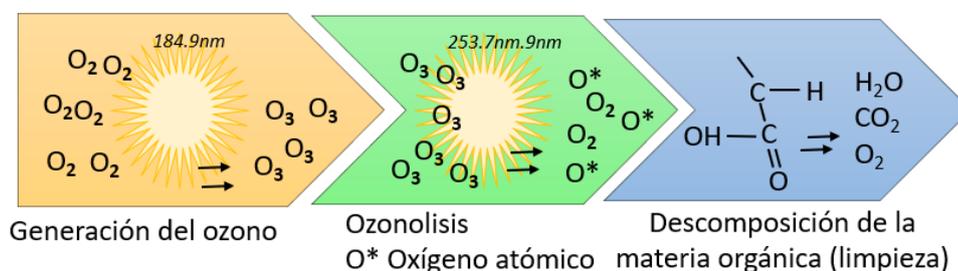
Es interesante una rotación en los desinfectantes en las granjas, como también evitar que los compuestos actúen acabando con las bacterias por la misma vía o sobre mecanismos de acción similares. A continuación figuran los grupos de desinfectantes más utilizados en las granjas (Langsurd *et al.*, 2003; Sci y Burhan, 2018):

- Yodóforos
- Clorados
- Ácidos
- Amonios cuaternarios
- Alcoholes
- Hipocloritos de sodio
- Peróxido de hidrógeno
- Productos reductores
- Productos oxidantes
- Productos tensoactivos
- Productos ácidos
- Fenoles

Tanto las listas de compuestos como las mezclas de productos desinfectantes autorizados varían de forma continua. No obstante, el uso y comercialización de los desinfectantes o de los productos utilizados para la desinfección de materiales y superficies relacionadas con el alojamiento o transporte de animales se regula por el Reglamento CE nº528/2012.

### Desinfección con ozono

El ozono ( $O_3$ ) es un gas formado por tres átomos de oxígeno, que se genera en la naturaleza cuando el oxígeno atmosférico ( $O_2$ ) se eleva a la estratosfera y se expone a los rayos ultravioleta del Sol, formando una capa de protección comúnmente conocida como la "capa de ozono". También se puede generar por dosis fuertes de energías, como cuando cae un rayo o mediante generadores con luz ultravioleta. Al someter al oxígeno a un proceso de alta energía, como puede ser un rayo, el doble enlace del oxígeno se rompe, pudiéndose generar una molécula con tres oxígenos en vez de dos (ver figura 17). Esta característica genera una gran inestabilidad, ya que rápidamente va a tender a la forma de menor gasto energético. Por ello, para ser aplicado para desinfección ha de generarse al momento (Duguet *et al.*, 1985; Von Gunten, 2003; Nahim-Granados *et al.*, 2020).



**Figura 17.** Formación de la molécula de ozono (elaboración propia).

El ozono es un gas incoloro, a temperatura ambiente presenta un olor característico bastante fuerte: a pesar de ello sirve para desodorar agua y aire. Es un oxidante extremadamente potente y en grandes cantidades una sustancia peligrosa con graves efectos para la salud. Esta naturaleza oxidante del ozono lo convierte en una herramienta de especial utilidad en la industria como desinfectante (Von Gunten, 2003; Gray, 2014).

En cuanto al ozono en el agua, es completamente seguro y su uso está regulado. La EPA lo considera un desinfectante habitual en la potabilización del agua (EPA, 1999). También se utiliza en el aire como descontaminante ambiental, a pesar de ser un

compuesto clasificado como irritante por inhalación para el ser humano. Su uso adecuado es seguro tanto por la FDA como por la EPA, por la FDA está considerado como “GRAS”, es decir, una sustancia generalmente reconocida como segura (Prado-Silva *et al.*, 2015; Lim *et al.*, 2022).

El ozono genera menos residuos que un desinfectante convencional, ya que se descompone rápidamente en O<sub>2</sub>, sin dejar subproductos, siendo considerado una tecnología limpia y renovable (Pandiselvam *et al.*, 2017, 2020).

### **Desinfección con luz ultravioleta**

La luz ultravioleta es un tipo de radiación electromagnética de onda corta que se puede encontrar entre los 100 y los 400 nm, siendo invisible para el ojo humano. Dependiendo de su longitud de onda podemos encontrar: luz UV-A, entre los 315-400 nm, luz UV-B, entre los 280-315 nm; luz UV-C entre los 100-280, y luz UV-V, entre los 100-200 nm; aunque este último solo se produce en condiciones de vacío. En la naturaleza encontramos las tres primeras en la luz del Sol. Los efectos de la luz UV-A y B se centran en el bronceado solar y las quemaduras, mientras que los de la luz UV-C generan daños en el ADN, el ARN y las proteínas, que inducen daño celular, mutaciones, cáncer y muerte celular (Gray, 2014).

Por ello, la luz ultravioleta C se conoce también como ultravioleta germicida (UVGI) y ha sido utilizada durante décadas como desinfectante y conservante de alimentos en la industria alimentaria, la acuicultura, la esterilización de los equipos y ambientes hospitalarios y los laboratorios de todo el mundo. Debido a su naturaleza también la podemos encontrar en muchos sistemas para el tratamiento de las aguas. Su modo de actuación consiste en dañar el material genético de los microorganismos, reduciendo así el uso de desinfectantes que generen residuos (Gray, 2014; Thomas *et al.*, 2022).

### **Ácidos grasos**

Los ácidos orgánicos y sus sales se han utilizado en cerdos y aves de corral durante décadas, adicionados en el piensos y agua. Los resultados obtenidos hasta el momento indican que estos compuestos afectan positivamente al rendimiento del crecimiento de los animales, así como mejoran la salud general de los mismos (Broom, 2015; Khan *et al.*, 2016). Los ácidos grasos utilizados durante los últimos años han sido ácidos grasos de cadena corta, ácidos grasos de cadena media y otros ácidos orgánicos

y sus sales (por ejemplo, ácido fórmico o ácido láurico) en la nutrición animal (Rasschaert *et al.*, 2016).

Se han observado efectos en el tracto gastrointestinal, como el aumento de la altura y la anchura de las vellosidades del duodeno y la profundización de las criptas en el yeyuno, en pollos alimentados con ácido fórmico o con ácidos sórbico y cítrico (Khan *et al.*, 2016). Varios autores informaron de una reducción de la prevalencia de algunos patógenos, como *Salmonella*, *Campylobacter*. y *E. coli*, en dietas adicionadas con ácidos orgánicos en granja. Ácidos como el butírico afectan positivamente al metabolismo, la proliferación y la diferenciación de las células epiteliales (Dalmasso *et al.*, 2008). Así como también presentan efectos antiinflamatorios (Hodin, 2000) y refuerzan la barrera de la mucosa intestinal (Mariadason *et al.*, 1997; Schaubert *et al.*, 2003; Bordin *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2007).

Un número limitado de estudios ha abordado el uso de ácidos orgánicos como alternativas a los tratamientos terapéuticos antimicrobianos y su eficacia para reducir las infecciones. En una investigación realizada en 2009 mostró la eficacia del ácido butírico y de los ácidos grasos de cadena media (C6 a C12, principalmente el ácido láurico) para controlar la enteritis necrótica en pollos, en dos ensayos que utilizaron un modelo experimental de enteritis necrótica. Este estudio demostró que el ácido butírico y los ácidos grasos de cadena media, solos o combinados, contribuyen a la prevención de la enteritis necrótica en estos animales de granja (Geier *et al.*, 2010; Timbermont *et al.* 2009).

Los ácidos grasos de cadena media son biomoléculas lipídicas formadas por una cadena de hidrocarburos de 4 a 28 átomos de carbono y con un grupo carboxilo, pueden estar saturadas o no. Son de naturaleza anfipática, lo que significa que su región hidrocarbonada es hidrófoba y su región carboxílica es hidrofílica. Según va creciendo su cadena se van haciendo más hidrofóbicos. Los triglicéridos de cadena media se digieren más rápido y eficientemente que los triglicéridos de cadena larga. Además, se absorben más rápido a través de los enterocitos y pasan directamente del duodeno a la sangre (Kabara *et al.*, 1972; Shilling *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2018a; Matsue *et al.*, 2019).

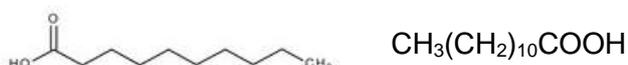
En cuanto a suplementación animal, los ácidos grasos de cadena media más utilizados son el ácido caproico (C6:0), el ácido caprílico (C8:0), el ácido cáprico (C10:0) y ácido láurico (C12:0). Se encuentran en el aceite de coco o palmiste, con más de un 50 % del total de ácidos grasos, o también en productos de origen animal como leche

bovina, constituyendo del 4 al 12 % de los ácidos grasos. La leche de cabra puede contener un 50 % más de ácidos orgánicos de cadena media que la leche de vaca (Sayago-Ayerdi, 2008).

Tanto por su perspectiva legal (clasificados como aditivos alimentarios) como por fácil manejo los ácidos grasos son integrados en la alimentación animal ya que su utilización en piensos es sencilla y segura.

### Ácido láurico

Es el ácido graso mayoritario en el aceite de semillas de palma y de coco, se trata de un ácido graso de cadena media, con 12 carbonos en su estructura. Por si solo y mediante la ingesta no es una sustancia con capacidad de disminuir el pH, pero se ha demostrado que poseen un buen efecto antimicrobiano frente a bacterias Gram positivas (Kabara *et al.*, 1972). Como muchos otros ácidos grasos, el ácido láurico es económico, tiene una vida útil prolongada, no es tóxico y es seguro de manipular. Se utiliza principalmente para la producción de jabones y cosméticos, aunque los últimos años ha ganado popularidad como suplemento alimenticio en dietas de animales monogástricos. Este ácido graso ha demostrado su eficacia en el control de estreptococias, así como en el control de bacterias Gram-positivas (Yang *et al.*, 2018).



**Figura 18:** Estructura molecular del ácido láurico y su fórmula química.

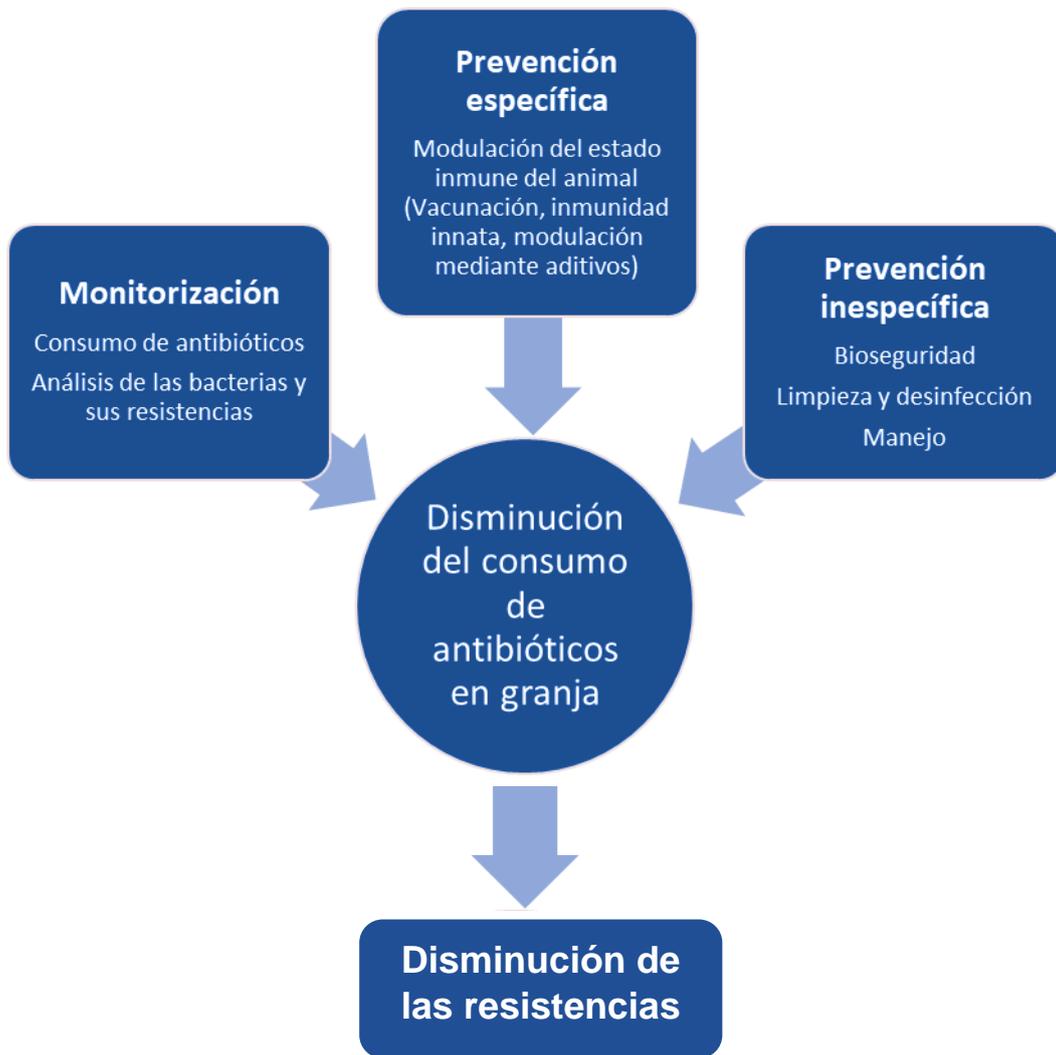
El ácido láurico presenta propiedades comunes a los ácidos grasos de cadena media (AGCM) y a los ácidos grasos de cadena larga (AGCL). Durante los últimos años se ha estudiado la capacidad antimicrobiana de los ácidos grasos de cadena media saturados. Se ha estudiado su efectividad frente a grupos de bacterias y se ha comprobado que es diferente en función de la longitud de sus cadenas. Se admite en la actualidad que el ácido láurico es un potencial antimicrobiano (Rosi *et al.*, 2010).



**Figura 19.** Efectos de la administración de los ácidos orgánicos en el ganado porcino. Infografía adaptada de Pearlín *et al.* (2020) por Esther Pérez Fernández.

Los ácidos orgánicos actúan a tres niveles: *microbiota* intestinal, fisiología intestinal e inmunología, lo que permite hacer el mejor uso de los aceites esenciales en la producción porcina. Se sabe que muchos de los ácidos orgánicos utilizados en la suplementación animal se pueden administrar como sales de sodio, potasio o calcio, al igual que parcialmente esterificados ya que estas sales confieren mejores propiedades a la hora de fabricar el pienso. Desde su efecto en el estómago hasta su efecto en el intestino estos ácidos favorecen una *microbiota* beneficiosa, la cual proporciona una mayor proporción de microvellosidades, lo que favorece la capacidad digestiva y de absorción del intestino. (Yang *et al.*, 2018, 2019; Matsue *et al.*, 201; Pearlín *et al.* 2020).

Como recapitulación de este apartado, con el fin de disminuir el uso de antibióticos en producción animal se deberían implementar medidas sanitarias dentro de la propia explotación. Esto se podría conseguir mejorando la prevención primaria (reducción la entrada de microorganismos patógenos en la granja y de su difusión a otras), la prevención secundaria (mitigación de estos microorganismos dentro de la propia granja) y la prevención terciaria (mejora del sistema inmunitario del animal para minimizar el impacto de los microorganismos patógenos).



**Figura 20.** Esquema de estrategias para la disminución de consumo de antibióticos (elaboración propia).

## 2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS



### PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

En la actualidad, la resistencia frente a los antibióticos en producción animal presenta un grave problema, tanto para la sanidad, como para la economía de las explotaciones porcinas. Estas resistencias han sido fruto de un mal uso de estos antimicrobianos en diferentes escalas. En un sistema de producción intensiva, estas resistencias se ven favorecidas por las condiciones a las que son sometidos los animales: un uso indebido de los antibióticos y una escasa bioseguridad interna y externa.

El control del abuso de estos compuestos se lleva a cabo, principalmente, mediante las nuevas normativas vigentes, pertenecientes a cada país, o a las comunidades autónomas. La necesidad de un manejo, bioseguridad y administración eficaz parece clara, sobre todo si se desea reducir el uso de antibióticos y, por tanto, la aparición de las resistencias consecuentes a su utilización indiscriminada.

Para poder lograr una estrategia eficaz en la reducción del uso de los antibióticos, concretamente en Complejo Respiratorio Porcino, se necesita un conocimiento previo de las bacterias implicadas: aislamiento, identificación, estudio de antibiogramas, genes de factores de virulencia, genes de resistencia frente a antibióticos, resistencia a los desinfectantes, así como el conocimiento de la bioseguridad en las granjas (eficacia de los protocolos de limpieza y desinfección).

Como alternativas al uso de antibióticos cabe destacar la administración de aditivos alimentarios, con el fin de mejorar la inmunidad de los lechones en la fase de transición, del tipo del ácido láurico. Algunos estudios previos hacen suponer que este aditivo ayuda a mejorar la *microbiota*, previniendo las enfermedades causadas por bacterias del complejo respiratorio porcino.

**OBJETIVOS:** En relación con el planteamiento anterior, se han definido los siguientes objetivos generales en esta Tesis Doctoral:

El **objetivo principal** es la disminución y racionalización del uso de antibióticos en la producción porcina de Castilla y León, a través de la caracterización de las principales enfermedades bacterianas asociadas a dicho consumo, y del estudio de la resistencia antimicrobiana en los microorganismos patógenos asociados.

Para este fin, se contó con la participación de las principales empresas productoras de ganado porcino y de carne de cerdo de la Comunidad Autónoma de Castilla y León, localizadas en distintos ámbitos geográficos y con diferentes características que, en su

## Planteamiento y objetivos

---

conjunto, representaron un valor próximo al 90 % del censo porcino en la región. Este objetivo general se puede desglosar en los siguientes objetivos secundarios o parciales:

1. Aislamiento e identificación de los patógenos respiratorios porcinos mediante MALDI-TOF o PCR.
2. Conocimiento del perfil de resistencia y de los principales genes de resistencia antimicrobiana, así como de los factores de virulencia presentes en los aislados de campo de los principales patógenos respiratorios recuperados de explotaciones porcinas de Castilla y León.
3. Diseño y evaluación de la calidad de los desinfectantes utilizados en granja, y realización de higienogramas tras la limpieza y desinfección en granjas de porcino para:
  - a. Conocer la eficacia *in vitro* de los desinfectantes utilizados.
  - b. Conocer el estado de limpieza y desinfección de granjas de Castilla y León.
  - c. Realizar una desinfección experimental con ozono y agua ozonizada.
4. Actividad del ácido láurico: dentro del estudio de las alternativas al uso de antibióticos se ensayó la modulación de la *microbiota*, tanto la respiratoria, como intestinal, ya que la primera afecta directamente a las enfermedades respiratorias y la segunda está relacionada con el estado de salud general de los animales.
  - a. Estudio *in vitro* de este ácido frente a diferentes bacterias respiratorias y ambientales aisladas en las granjas.
  - b. Ensayo *in vivo* en una granja de transición, con animales suplementados con 2 kilogramos de ácido láurico /tonelada de pienso y 4 kilogramos de ácido láurico/tonelada de pienso.

# 3. MATERIAL Y MÉTODOS



### 3.1. Cepas obtenidas mediante necropsia

#### Método

Estas cepas fueron obtenidas a partir de muestras de cerdos con patología respiratoria, mayoritariamente pulmones, encéfalo y líquido articular. Estas muestras fueron acompañadas siempre de un informe por parte del veterinario de la explotación en el que se detallaba la patología del animal antes de la muerte y/o sacrificio.

En algunos casos fueron órganos, en otros cuerpos enteros. Se recogieron muestras en granjas y se recibieron 50 envíos entre diciembre de 2018 y febrero de 2021. Los envíos fueron recibidos como muy tarde 24 horas después de la muerte o sacrificio del animal con patología respiratoria.



**Imagen 2.** Muestras biológicas recibidas en varios envíos. A la izquierda, pulmón derecho de cerdo de cebo, a la derecha dos pulmones de unos lechones

Los órganos se extrajeron y manejaron en condiciones de esterilidad, cauterizando la superficie y haciendo incisiones de 1 - 2 cm con un bisturí estéril. Posteriormente, se procedió a la toma de muestras con un hisopo estéril, y a la posterior siembra en agar sangre (OXOID®) y chocolate (OXOID®).

Por otro lado, las muestras tomadas en las propias granjas fueron recogidas del mismo modo que las anteriores, en las condiciones más asépticas posibles. Se tomaron con un hisopo estéril con medio de transporte Stuart (DELTALAB®), y fueron almacenadas a 4° C hasta la llegada al laboratorio, donde fueron sembradas e incubadas.

Todas las placas se incubaron en condiciones de microaerofilia a 37 °C entre 24-72 horas para un crecimiento bacteriano adecuado, dependiendo de la especie.

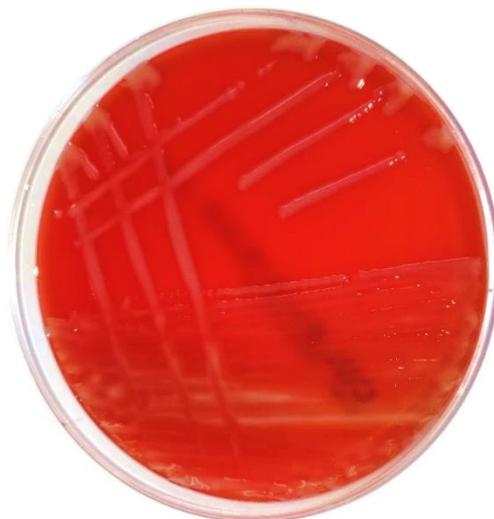
## Material y métodos

---

En algunas ocasiones, cuando en la primera siembra crecía más de una especie bacteriana, ya fuera por contaminación o por crecimiento de especies comensales, se realizó un segundo aislamiento de las bacterias de interés, de origen respiratorio.

Finalmente, se identificaron las bacterias obtenidas del crecimiento de las placas, mediante PCR convencional (*Polymerase Chain Reaction*) y se realizó una segunda comprobación mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*).

Simultáneamente, las cepas se congelaron en un medio de cultivo crioprotector, a -80 °C. La forma en la que se preparó el medio de congelación y su formulación se encuentran en el apartado 3.4 Medio de congelación.



**Imagen 3.** Aislado de *Pasteurella multocida* en una placa de agar sangre.

### **Cepas bacterianas de patología respiratoria obtenidas de las necropsias**

Se muestrearon o recibieron envíos con órganos o lechones enteros, y en algunos casos hisopos procedentes de las siguientes localizaciones geográficas (ver tabla 22 de resultados resultados), de estos órganos o hisopos pudimos realizar los aislamientos de las bacterias *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Glaesserella parasuis*, *Streptococcus suis* y *Pasteurella multocida*.

### 3.2. Cepas ambientales obtenidas en las granjas y los camiones

#### Método

Con el fin de conocer la eficacia de los métodos de limpieza y desinfección de las granjas estudiadas, decidimos realizar muestreos microbiológicos en 35 de las granjas y en tres camiones.

Los métodos empleados para la recogida de las muestras de las superficies fueron distintos para las superficies irregulares que para las superficies planas. En todo caso, se tomaron muestras en los lugares seleccionados, y, posteriormente, se realizaron recuentos e identificaciones de los microorganismos presentes, lo cual nos permitió la valoración de los procesos de vaciado, limpieza y desinfección, y decidir si fueron los más apropiados.

- Superficies planas: se utilizaron las placas de contacto RODAC (Replicate Organism Direct Agar Contac) con el neutralizante *BIOAGAR Tryptone Soya Agar TLHTH (TSA) 0320280*,. *Bioser*.

En las paredes, suelos y superficies lisas se utilizaron estas placas de contacto. El procedimiento fue el descrito por el fabricante: la placa fue colocada sobre la superficie a muestrear de una forma directa, manteniéndola inmóvil y presionando ligeramente. Se cerró e invirtió la placa para su incubación, a 37 °C durante 24 horas.

Para la interpretación de los resultados se realizó un recuento de las colonias crecidas y se expresó el resultado en UFC/placa. Después se transformó a UFC/cm<sup>2</sup> de superficie.

Las colonias que aparecieron en la mayor parte de la placa y/o repetidas en varias placas se aislaron en una placa de TSA, se incubaron durante 24 horas a 37 °C y, una vez obtenido el crecimiento, se identificaron mediante el método MALDI-TOF.

- Superficies irregulares: se emplearon esponjas de toma de muestras con tampón neutralizante “*Esponja hidratada*” 3M™, con 10 ml de solución amortiguadora neutralizante *HS10NB*.

El modo de empleo de estas esponjas fue el siguiente: con los guantes que vienen incluidos, se sacaba con mucho cuidado la esponja de la bolsa de plástico que la envolvía, se pasaba la esponja por una superficie irregular aproximada de 15x15cm<sup>2</sup> y se almacenaba en la bolsa, cerrándola con el cierre incorporado. Se mantenía a 4° C hasta su procesado en el laboratorio. El tratamiento de las

## Material y métodos

---

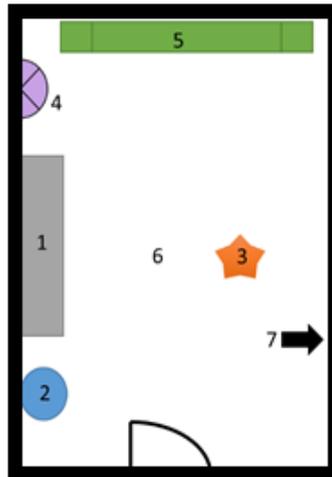
esponjas se realizó embebiéndolas en 40 ml de PBS y manteniendo en agitación ligera durante 5 minutos. De este líquido se procedió a realizar diluciones seriadas, tomando 100  $\mu$ l del líquido en 900  $\mu$ l de solución salina estéril (SSE), desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-15}$ .

De cada una de estas diluciones se tomó una alícuota de 100  $\mu$ l y se extendió con un asa Digrafsky sobre una placa de 9 cm de diámetro en TSA. Se incubaron durante 24 horas a 37° C. Una vez obtenido el crecimiento, se identificaron las bacterias mediante MALDI-TOF.



**Imagen 4.** De izquierda a derecha: placa RODAC para toma de muestras por contacto, placa tomando una muestra, esponja para la toma de muestras y esponja tomando una muestra

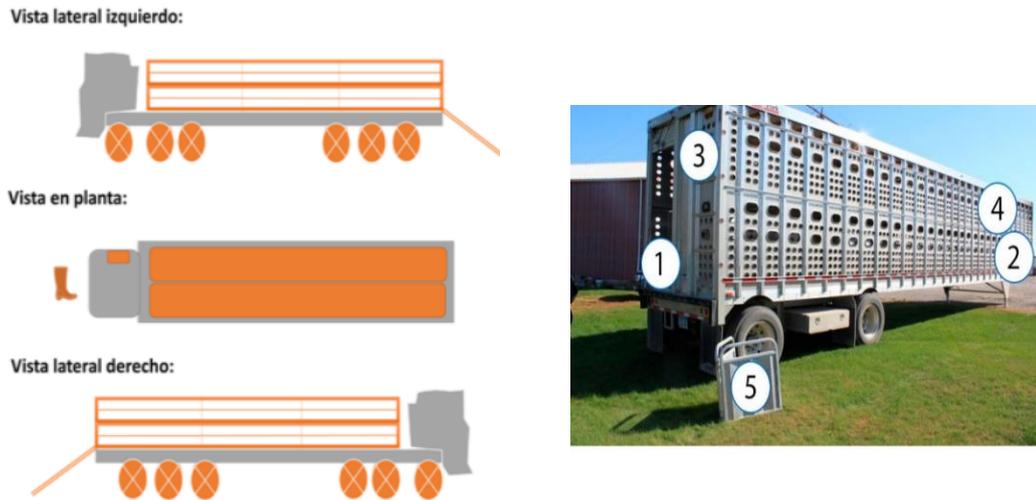
Se muestrearon suelos, paredes, comederos, bebederos, juguetes y conductos de ventilación en todas las granjas, ya fueran de cerdos de cebo, de madres o de transición. En todos los casos, se realizaron dos muestreos: uno después de la limpieza y otro después de la desinfección. Cada muestreo se realizó por triplicado y se tomó siempre como control una sala gemela de la sala a estudiada, en la que no se realizaron los procesos de limpieza ni de desinfección.



**Figura 21:** Plano con los diferentes puntos de muestreo en una de las granjas. El 1 y el 2 representan comederos y bebederos, el 3 juguetes, y el 4, conductos de ventilación, el 5, las placas calefactoras, el 6, los suelos y el 7, las paredes.

- Superficies irregulares: se muestrearon con esponja con neutralizante.
  - Comederos.
  - Bebederos.
  - Juguetes.
  - Conductos de ventilación.
- Superficies planas: se muestrearon con placas Rodac TSA:
  - Suelos de pasillos.
  - Paredes de pasillos.
  - Suelos de cubículos.
  - Paredes de cubículos.
  - Placas calefactoras.

También se realizaron los muestreos microbiológicos de los camiones de transporte de cerdos, con la finalidad de conocer si el lavado del vehículo era el correcto.



**Figura 22:** Lugares a muestrear en camiones, en los que 1 y 3 son los suelos de las diferentes alturas, 4 y 2, las paredes y 5, las ruedas.

- Mediante esponjas con neutralizante 3M™ Hydrated-Sponge with 10 ml D/E Neutralizing Buffer and Gloves HS10DE2G muestreamos por triplicado las superficies irregulares (ver imagen 6):
  - Barandilla del ascensor, parte derecha.
  - Barandilla del ascensor, parte izquierda.
  - Pared del piso 1, parte derecha.
  - Pared del piso 1, parte izquierda.
  - Pared del piso 2, parte izquierda.
  - Pared del piso 2, parte derecha.
- Mediante placas de contacto de microorganismos en superficie Rodac TSA muestreamos por triplicado superficies planas (ver imagen 6):
  - Ascensor suelo, parte derecha.
  - Ascensor suelo, parte izquierda.
  - Suelo piso 1, parte derecha.
  - Suelo piso 1, parte izquierda.
  - Suelo piso 2, parte izquierda.
  - Suelo piso 2, parte derecha.

### **Aislados bacterianos de origen ambiental en granjas y camiones**

Todas las cepas se congelaron en medio de cultivo crioprotector, suplementado con triptona, a -80° C. La composición del medio de congelación se puede leer en el apartado 3.4 Medio de congelación.

### **3.3. Medios de cultivo**

#### **Agar chocolate (BioMérieux)**

Este medio sólido se utilizó en placas comerciales enriquecidas con Polyvitex®. Contenía por litro:

- Biopeptona, 15 g.
- Almidón de maíz, 1 g.
- Fosfato dipotásico, 4 g.
- Fosfato monopotásico, 1 g.
- NaCl, 5 g.
- Hemoglobina, 10 g.
- Agar, 10 g.

#### **Agar sangre (BioMérieux)**

Medio comercial dispensado en placas con agar Columbia (caldo Columbia más 10 % de agar), suplementado con un 5 % de sangre de cordero.

#### **Caldo Soja Trypticaseína (TSB, Condalab)**

Se preparó, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, disolviendo 30 g en 1 litro de agua destilada y mediante esterilización a 121° C, durante 15 minutos en un autoclave. Dicho medio contenía por litro:

- Glucosa monohidratada, 2,5 g.
- Digerido pancreático de caseína, 17 g.
- Cloruro sódico, 5 g.
- Digerido papaico de soja, 3 g.
- Hidrogenofosfato dipotásico, 2,5 g.

#### **Caldo de Triptona y Soja con agar (TSA, Condalab)**

Se preparaba, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, disolviendo 40 g en 1 litro de agua destilada y mediante esterilización a 121° C durante 15 minutos en un autoclave. Dicho medio contenía por litro:

## Material y métodos

---

- Agar bacteriológico, 15 g.
- Digerido pancreático de caseína, 15 g.
- Cloruro sódico, 5 g.
- Digerido papaico de soja, 5 g.

### **Agar con extracto de levadura (YEA, Condalab)**

Se preparaba, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, disolviendo 51 g en 1 litro de agua destilada y mediante esterilización a 121° C durante 15 minutos en el autoclave. Dicho medio contiene por litro:

- Agar bacteriológico, 15 g.
- Triptona, 6 g.
- Extracto de levadura, 3 g.

### **Agar MacConkey Broth (MacConkey, Condalab):**

Se prepara, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, disolviendo 50 g en 1 litro de agua destilada y mediante esterilización a 121 °C durante 15 minutos en el autoclave. Dejamos enfriar hasta 50-45° C, mezclar bien y dispensar en placas. Cuando se solidificaron y se colocaban boca abajo para evitar la humedad excesiva en la superficie del medio. Dicho medio contiene por litro:

- Agar bacteriológico, 15 g.
- Sales biliares, 1,5 g
- Cristal violeta, 0,001g.
- Peptona de gelatina, 17 g.
- Lactosa, 10 g.
- Rojo neutro, 0,03 g.
- Mezcla de peptona, 3 g.
- Cloruro sódico, 5 g.

### **Agar Mueller Hinton**

Se preparaba, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, disolviendo 38 g en 1 litro de agua destilada y mediante esterilización a 121° C, durante 15 minutos en el autoclave. Dicho medio contenía por litro:

- Caldo de carne, 2 g.
- Digestión ácida de caseína, 17,5 g.
- Almidón, 1,5 g.
- Agar, 15 g.

### Agar BD Haemophilus (HTM)

En primer lugar, se preparaba una solución fresca de hematina, disolviendo 50 mg de hematina en polvo en 100 ml de solución NaOH 0,001 N. Este paso se realizaba con calor y agitación hasta su completa disolución. Posteriormente se añadieron 30 ml a 1 litro de medio Mueller-Hinton (previamente preparado con 38 g de Mueller-Hinton y 1 litro de agua destilada) y 5 g de extracto de levadura. Se esterilizaba, al terminar, y sólo cuando la temperatura estaba, a 50 °C se añadió 375 µl de NAD (preparado con 50 mg de NAD disueltos en 10 ml de agua destilada):

- Mueller-Hinton, 38 g.
- Extracto de levadura, 5 g.
- Hematina, 30 ml.
- NAD, 375 µl.

### 3.4. Medio de congelación

Las cepas bacterianas se mantuvieron a -80 °C en este medio de congelación, que se esterilizó a 110 °C durante 10 minutos, repartiendo luego en alícuotas de 1 ml. Para un volumen de 400 ml se añadían:

- Leche descremada, 20 g.
- Triptona, 10 g.
- Glicerol 80, ml.

### 3.5. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

La reacción en cadena de la polimerasa, más conocida por sus siglas en inglés PCR (*polymerase chain reaction*), fue utilizada para realizar la identificación de los aislados de origen respiratorio: Además, en algunas de las especies, se aplicó para conocer sus factores de virulencia y genes de resistencia frente a antibióticos.

Las muestras identificadas mediante PCR fueron aisladas de las necropsias y resembradas las posibles bacterias individualmente.

### Extracción del ADN

En primer lugar, se realizó la extracción del ADN. Se tomaron dos colonias con un asa de siembra y se resuspendieron en 100 µl de agua Mili-Ro y permanecieron durante 10 minutos en un baño a 100 °C. Finalizado este tiempo se centrifugaron en una centrífuga 5415R Eppendorf®, durante 10 minutos a 15.000 g.

## Material y métodos

Se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se desechó el pellet. Los extractos se conservaron a -20 °C y fueron utilizados para todas las reacciones de PCR, que se detallan en los capítulos siguientes. Por otro lado, todos los cebadores fueron sintetizados por Roche Diagnostics.

### Reactivos para la PCR

La mezcla PCR se realizó con un volumen final de 50 µl. Las cantidades utilizadas se detallan en la tabla 4.

**Tabla 4:** Volúmenes de los reactivos de la PCR.

Reactivos	Volumen
Agua libre de nucleasas (Sigma)	38 µl
Tampón 10x con MgCl <sub>2</sub> (Biotools)	6,5 µl
Deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (250 µl/10nM) (Biotools)	1 µl
Cebadores (20 µM)	0,5 µl de cada uno
Taq DNA polimerasa (0,5 U) (Biotools)	0,5 µl
ADN de la muestra	3
<b>Total</b>	<b>50 µl</b>

### PCR específica de especie:

Se realizaron PCRs específicas de especie para las bacterias identificadas como *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*, *Glaesserella parasuis* o *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

#### ***Actinobacillus pleuropneumoniae***

Los cebadores utilizados en el caso de las PCR específicas, así como las condiciones de éstas, fueron las descritas por de la Puente Redondo *et al.*, (2003) y Martínez *et al.*, (2010). Aparecen en la tabla 5:

## Material y métodos

**Tabla 5:** Cebadores de PCR específicos y condiciones de PCR de especie para *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Nombre del cebador		Secuencia (5'-3')	
<b>TbpAF</b>		TGGTGGCTTCTATGGTCCAA	
<b>RTC 33</b>		AAGCTTGAAACTAAGGTA CTCTAA	

Fase		Temperatura	Tiempo
	Desnaturalización inicial	94 °C	5 minutos
Durante 35 ciclos	Desnaturalización	94 °C	1 minuto
	Hibridación	50 °C	1 minuto
	Elongación	72 °C	3 minutos
	Elongación final	72 °C	10 minutos

### *Glaesserella parasuis*

Los cebadores utilizados en el caso de las PCR específicas, así como las condiciones de éstas, fueron las descritas por de la Puente Redondo *et al.*, (2003) y Martínez *et al.*, (2010). Aparecen en la tabla 6:

**Tabla 6:** Cebadores de PCR específicos y condiciones de PCR de especie para *Glaesserella parasuis*.

Nombre del cebador		Secuencia (5'-3')	
<b>TbpAF</b>		TGGTGGCTTCTATGGTCCAA	
<b>RTC 33</b>		AAGCTTGAAACTAAGGTA CTCTAA	

Fase		Temperatura	Tiempo
	Desnaturalización inicial	94 °C	5 minutos
Durante 35 ciclos	Desnaturalización	94 °C	1 minuto
	Hibridación	50 °C	1 minuto
	Elongación	72 °C	3 minutos
	Elongación final	72 °C	10 minutos

## Material y métodos

### *Pasteurella multocida*

Los cebadores utilizados en el caso de las PCR específicas para cada especie, así como las condiciones de éstas, fueron las descritas por Townsend *et al.*, (1998). Figuran en la tabla 7.

**Tabla 7:** Cebadores de PCR específicos y condiciones de PCR de especie para *Pasteurella multocida*.

Nombre del cebador		Secuencia (5'-3')	
KMT1T7		ATCCGCTATTTACCCAGTGG	
KMT1SP6		GCTGTAAACGAACTCGCCAC	

Fase		Temperatura	Tiempo
	Desnaturalización inicial	95 °C	5 minutos
Durante 30 ciclos	Desnaturalización	95 °C	30 segundos
	Hibridación	55 °C	30 segundos
	Elongación	72 °C	30 segundos
	Elongación final	72 °C	10 minutos

### *Streptococcus suis*

Los cebadores utilizados en el caso de las PCR específicas para cada especie, así como las condiciones de estas, fueron las descritas por Kerdsin (2014).

**Tabla 8:** Cebadores de PCR específicos y condiciones de PCR de especie para *Streptococcus suis*.

Nombre del cebador		Secuencia (5'-3')	
JP4		GCAGCGTATTCTGTCAAACG	
JP5		CCATGGACAGATAAAGATGG	

Fase		Temperatura	Tiempo
	Desnaturalización inicial	94 °C	5 minutos
Durante 35 ciclos	Desnaturalización	94 °C	1 minuto
	Hibridación	55 °C	1 minuto
	Elongación	72 °C	1 minuto
	Elongación final	72 °C	7 minutos

### Amplificaciones

Las amplificaciones se realizaron en todos los casos en un termociclador modelo Mastercycler Gradient (*Eppendorf*). La visualización de los productos de PCR se efectuó en geles de agarosa al 1 % (AGAROSE D1 MEDIUM EEO M-9) en TBE 1x con un 0,5 % de agente Red Safe™, en un transiluminador de luz ultravioleta. Como marcadores de peso molecular se utilizaron los de 100 pb y 1Kb (Biotools).

### PCRs de serotipo

Estas PCRs se realizaron en los mismos dispositivos y utilizando los mismos materiales y reactivos que para las PCRs de identificación, a excepción de los cebadores.

#### *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Los cebadores utilizados en el caso de las PCR específicas para *Actinobacillus pleuropneumoniae*, así como las condiciones de éstas fueron las descritas por tres autores diferentes: Gram & Ahrens, 1998; Terry *et al.*, 1998; Angen *et al.*, 2008. Además, se estudiaron los 12 primeros serotipos. Todo ello se recoge en la tabla 9.

**Tabla 9:** Cebadores de PCR de serotipo y condiciones de PCR para *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

SEROTIPO	Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')
1	LPF	AAG GTT GAT ATG TCC GCA CC
2	LPR	CAC CGA TTA CGC CTT GCC A
3	Ap1F	GGG CAA GCC TCT GCT CGT AA
4	Ap1R	GAA AGA ACC AAG CTC CTG CAA T
5a	AD5F (A)*	TTT ATC ACT ATC ACC GTC CAC ACC T
6	ApSR (B)	CAT TCG GGT CTT GTG GCT ACT AAA
7	Ap7F	GGT GAC TGG CGT ACG CCA A
8	Ap7R	GGG CTG CAG ACT GAC GTA A
9	Ap12F alt	GAT GGT TCT CCA GAT GAC TCT GAA A
10	Ap12R alt	TGG CTA TTG GAT GAA GAT GAC TCA T
11	Ap15 cF	GGG GAT CGA AAG GCT ATG G
12	Ap15 eR	CTG CGG TAA TCG CTA CCA TTA TCC

	Fase	Temperatura	Tiempo
	Desnaturalización inicial	95 °C	5 minutos
Durante 30 ciclos	Desnaturalización	95 °C	30 segundos
	Hibridación	55 °C	30 segundos
	Elongación	72 °C	30 segundos
	Elongación final	72 °C	10 minutos

## Material y métodos

### *Glaesserella parasuis*

Los cebadores utilizados en el caso de las PCR específicas para la determinación del serovar, así como las condiciones de éstas, fueron las descritas por Turni *et al.* (2010). Figuran en la tabla 10.

**Tabla 10:** Cebadores de PCR de serotipo y condiciones de PCR para *Glaesserella parasuis*.

SEROVAR	Secuencia (5'-3')
1	CTGTGTATAATCTATCCCCGATCATCAGC GTCCAACAGAATTTGGACCAATTCCTG
2	CTAACAAGTTAGGTATGGAGGGTTTTGGTG GGCACTGAATAAGGGATAATTGTACTG
3	CATGGTGTTTATCCTGACTTGGCTGT TCCACATGAGGCCGCTTCTAATACT
4	GGTTAAGAGGTAGAGCTAAGAATAGAGG CTTCCACAACAGCTCTAGAAACC
5/12	CCACTGGATAGAGAGTGGCAGG CCATACATCTGAATTCCTAAGC
6	GATTCTGATGATTTTTGGCTGACGGAACG CCTATTCTGTCTATAAGCATAGACAGGAC
7	CTCCGATTTTCATCTTTTCTATGTGG CGATAAACCATAACAATTCCTGGCAC
8	GGAAGGGGATTACTACTACCTGAAAG CTCCATAGAACCTGCTGCTTGAG
9	AGCCACATCAATTTTAGCCTCATCA CCTTAAATAGCCTATGTCTGTACC
10	GGTGACATTTATGGGCGAGTAAGTC GCACTGTCATCAATAACAATCTTAAGACG
11	CCATCTCTTTAACTAATGGGACTG GGACGCCAAGGAGTATTATCAAATG
13	GCTGGAGGAGTTGAAAGAGTTAC CAATCAAATGAAACAACAGGAAGC
14	GCTGGTTATGACTATTTCTTTTCGCG GCTCCCAAGATTAACCAAGCAAG
15	CAAGTTCGGATTGGGAGCATATATC CCTATATCATTGTTGGATGTACG

	Fase	Temperatura	Tiempo
	Desnaturalización inicial	95 °C	5 minutos
Durante 30 ciclos	Desnaturalización	95 °C	30 segundos
	Hibridación	55 °C	30 segundos
	Elongación	72 °C	30 segundos
	Elongación final	72 °C	10 minutos

## Material y métodos

### *Pasteurella multocida*

La determinación del tipo capsular (A, B, D E y F) se basó en los estudios de Townsend *et al.* (2001). Se realizaron PCRs independientes para cada tipo capsular. En la tabla 11 se muestran los cebadores y genes utilizados.

Existieron variaciones en la temperatura de hibridación para cada tipo capsular, por lo demás fueron iguales a una PCR de identificación.

**Tabla 11:** Cebadores de PCR de serotipo y condiciones de PCR para *Pasteurella multocida*.

Tipo capsular	Gen	Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')
<b>A</b>	<i>hyaD-hyaC</i>	CAPA-F	TGCCAAAATCGCAGTCAG
		CAPA-R	TTGCCATCATTGTCAGTG
<b>D</b>	<i>bcbD</i>	CAPA-F	TTACAAAAGAAAGACTAGAGACCC
		CAPA-R	CATCTACCCACTCAACCATATCAG
<b>B</b>	<i>dcbF</i>	CAPA-F	CATTTATCCAAGCTCCACC
		CAPA-R	GCCCGAGAGTTTCAATCC
<b>E</b>	<i>ecbJ</i>	CAPA-F	TCCGCAGAAAATTATTGACTC
		CAPA-R	GCTTGCTGCTTGATTTTGTG
<b>F</b>	<i>fc bD</i>	CAPA-F	AATCGGAGAACGCAGAAATCAG
		CAPA-R	TTCCGCCGTCAATTA CTCTG

Fase		Temperatura	Tiempo
Durante 30 ciclos	Desnaturalización inicial	95 °C	5 minutos
	Desnaturalización	95 °C	30 segundos
	Hibridación tipo capsular <b>A</b>	61 °C	
	Hibridación tipo capsular <b>D</b>	59 °C	
	Hibridación tipo capsular <b>B</b>	58 °C	30 segundos
	Hibridación tipo capsular <b>E</b>	55 °C	
	Hibridación tipo capsular <b>F</b>	59 °C	
	Elongación final	72 °C	10 minutos

## Material y métodos

### ***Streptococcus suis***

Los cebadores utilizados en el caso de las PCR específicas para cada especie, así como las condiciones de éstas, fueron las descritas por Kerdsin *et al.* (2014). Tanto la secuencia de nucleótidos como las condiciones en las que se realizaron las PCRs se pueden observar en la tabla 12.

**Tabla 12:** Cebadores de PCR de serotipo y condiciones de PCR para *Streptococcus suis*

Serotipo		Secuencia	Gen
1 y 14	F:	AATCATGGAATAAAGCGGAGTACAG	cps1J, cps14J
	R:	ACAATTGATACGTCAAATCCTCACC	
2 y 1/2	F:	GATTTGTCGGGAGGGTTACTTG	cps2J, cps1/2J
	R:	TAAATAATATGCCACTGTAGCGTCTC	
3	F:	TGGGAGAAGGCAGAAAGTACGAGA	cps3J–cps3K
	R:	ACCCCAGAAGAGCCGAAGGA	
4	F:	ACTTGGAGTTGTTCGGAGTAGTGCT	cps4M–cps4N
	R:	ACCGCGATGGATAGGCCGAC	
5	F:	TGATGGCGGAGTTTGGGTTCGC	cps5N
	R:	CGTAACAACCGCCCCAGCCG	
6	F:	TACGGTCTCCCTTGCTGTA	cps6I
	R:	AACTCAGCTAGTGCTCCACG	
7	F:	GATGATTTATGGCACCCGAGTAAGC	cps7H
	R:	AGTCACAATTGCTGGTCCTGACACC	
8	F:	ATGGGCGTTGGCGGGAGTTT	cps8H
	R:	TTACGGCCCCCATCACGCTG	
9	F:	GGGATGATTGCTCGACAGAT	cps9H
	R:	CCGAAGTATCTGGGCTACTG	
10	F:	TTACGAGGGGATTCTGGGGT	cps10M
	R:	CGGGACAACAGATGGAACCT	
11	F:	TACAGTGCTTGCAGCCCTAC	cps11N
	R:	CGACTTGTCGTGCCCTGAT	
12	F:	TGTGGCGATAGGACAACAGG	cps12J
	R:	ACCAAGAAGTTTCCGCCTGA	
13	F:	CTGGTGCTGCAATTTGCTT	cps13L
	R:	GCAGACTAGCTGCAGTTCCA	
15	F:	GCAAGAAAGCTTCCGGATGGA	cps15K
	R:	CAAGAGAGTGTGCAACCCCA	
16	F:	TGGAGGAGCATCTACAGCTCGGAAT	cps16K
	R:	TTTGTTTGCTGGAATCTCAGGCACC	
17	F:	ACTTGGGTTGGAATGGCGAA	cps17O
	R:	ACCACCGAAAGTCAGGTCAC	
18	F:	CGGGGCAGTCTTACTCATGG	cps18N
	R:	ATGACAGCGAAACGGACAGA	

## Material y métodos

**Tabla 12** (Continuación)

Serotipo		Secuencia	Gen
19	F:	AGCAGGGTTGCGTATGGCGG	cps19L
	R:	ACAAGCACCCAGCAAAGACCGCA	
21	F:	GGTGGCAAGGAGAGCAAAGT	cps21N
	R:	ACATGGTAAGCCATTGCTGGA	
23	F:	TGCTCAACAAACGCAGCAAA	cps23I
	R:	TGACTGGTACATCTGCAGCC	
24	F:	ACCCGGAAAAACCAGGAGTT	cps24L
	R:	ACCAATCAATGCCAAGCGAC	
25	F:	GGAGGAGCTGCGGGCTCATA	cps25M
	R:	TGGCCACAACCTGGATGCGTT	
27	F:	CTACGCCAATCGAAGCCAGA	cps27K
	R:	CCAGTAAGAAGCCTGTGCGCA	
28	F:	GGACTTCGGTACCTTAGCGT	cps28L
	R:	CTCCAGCACATTCCCGTACC	
29	F:	GTGCGGGCGTTATTTTTGGT	cps29L
	R:	AGCCTTGCAACCCATTTCT	
30	F:	CTTTAATTGCTTGCGCCCGT	cps30I
	R:	ATTCGGGCTACCCATTGCAG	
31	F:	GGAGTGCTCTATGCCACCTT	cps31L
	R:	GCATTGCCCTACAGCAAAC	

	Fase	Temperatura	Tiempo
	Desnaturalización inicial	95 °C	2 minutos
Durante 30 ciclos	Desnaturalización	95 °C	20 segundos
	Hibridación	62 °C	90 segundos
	Elongación	72 °C	5 minutos
	Elongación final	95 °C	2 minutos

**PCRs de factores de virulencia**

Se realizaron PCRs de diversos factores de virulencia para *S. suis* y *P. multocida*.

***Pasteurella multocida***

Se seleccionaron los genes de factores de virulencia, basándonos en los estudios anteriores de Ewerst *et al.* (2006) y Dayao *et al.* (2016). Las características de la reacción se detallan en la tabla 13.

**Tabla 13:** Cebadores de PCR de factores de virulencia y condiciones de PCR para *Pasteurella multocida*

Gen	Secuencia (5'-3')
hgbA	TGGCGGATAGTCATCAAG CCAAAGAACCACTACCCA
nanH	ATCCGCTATTTACCCAGTGG GCTGTAAACGAACTCGCCAC
oma87	ATGAAAAAACTTTTAATTGCGAGC TGACTTGCGCAGTTGCATAAC
ompH	ATGAAAAAACTITTAATTGCGAGC TGACTTGCGCAGTTGCATAAC
pfhA	TGTGGAATTCAGCATTTTAGTGTGTC TCATGAATTCTTATGCGCAAAA
sodA	TACCAGAATTAGGCTACGC GAAACCOGTTCTCCCGCT
tbpA	TTGGTTGGAAACGGTAAAGC TAACGTGTACGGAAAAGCCC
tonB	GGTGGTGATATTGATGOGGC GCATCATGCGTGACGGIT
toxA	CGTGAAGTGCCTACTCAA AAGAGGAGGCATGAAGAG

Fase		Temperatura	Tiempo
Durante 30 ciclos	Desnaturalización inicial	95 °C	5 minutos
	Desnaturalización	95 °C	30 segundos
	Hibridación <i>hgbA</i>	61 °C	30 segundos
	Hibridación <i>nanH</i>	59 °C	
	Hibridación <i>oma87</i>	58 °C	
	Hibridación <i>ompH</i>	55 °C	
	Hibridación <i>ptfA</i>	61 °C	
	Hibridación <i>sodA</i>	59 °C	
	Hibridación <i>tbpA</i>	58 °C	
	Hibridación <i>tonB</i>	55 °C	
	Hibridación <i>toxA</i>	59 °C	
Elongación final	72 °C	10 minutos	

## Material y métodos

### *Streptococcus suis*

Se seleccionaron los genes de factores de virulencia basándose en los estudios de Wang *et al.*, (2011), Teles *et al.* (2012), Kerdsin *et al.* (2014) y Huang *et al.* (2019). Las características de la reacción se detallan en la tabla 14.

**Tabla 14:** Cebadores de PCR de factores de los virulencia y condiciones de PCR para *Streptococcus suis*

Gen	Secuencia (5'-3')
<i>epf</i>	CGCAGACAACGAAAGATTGA AAGAATGTCTTTGGCGATGG
<i>mrp</i>	ATTGCTCCACAAGAGGATGG TGAGCTTTACCTGAAGCGGT
<i>sly</i>	AAGTCGACATGAGAAAAAGTTTCGCAC AACTGCAGGATTACTCTATCACCTCA
<i>luxS</i>	CCGGAATTCGCAGTTACAAGAAACCAAG CGCGGATCCCTAATCCTTTCTCAGGGAA
<i>GAPDH</i>	ATGGTAGTTAAAGTTGGTATTAACG ATTATTTAGCAATTTTTGCG

	Fase	Temperatura	Tiempo
Durante 35 ciclos	Desnaturalización inicial	95 °C	5 minutos
	Desnaturalización	94 °C	30 segundos
	Hibridación <i>epf</i>	58 °C	1 minuto
	Hibridación <i>mrp</i>	63 °C	
	Hibridación <i>sly</i>	56 °C	
	Hibridación <i>luxS</i>	55 °C	
	Hibridación <i>GAPDH</i>	72 °C	
Elongación final	72 °C	10 minutos	

### PCRs de genes de resistencia frente a antibióticos:

#### *Pasteurella multocida*:

Se seleccionaron los genes de resistencia frente a antibióticos de acuerdo con en Dayao *et al.* (2016). Los genes estudiados fueron de resistencia para las tetraciclinas (*tetA*, *tetB*), para los  $\beta$ -lactámicos (*bla<sub>ROB1</sub>* y *bla<sub>TEM</sub>*) y para los macrólidos (*ermA*, *ermC*, *msrE* y *mphE*). Las condiciones aparecen en la tabla 15.

## Material y métodos

**Tabla 15:** Cebadores de PCR de factores de virulencia y condiciones de PCR para *P. multocida*

Gen	Secuencia (5'-3')	
<i>tetA</i>	GTA ATT CTG AGC ACT GTC GC	
	CTG CCT GGA CAA CAT TGT TT	
<i>tetB</i>	CCT TAT CAT GCC AGT CTT GC	
	ACT GCC GTT TTT TTC GCC	
<i>bla<sub>ROB1</sub></i>	CAT TAA CGG CTT GTT CGC	
	CTT GCT TTG CTG CAT CTT	
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	GAG TAT TCA ACA TTT TCG T	
	ACC AAT GCT TAA TCA GTG A	
<i>ermA</i>	ACG ATA TTC ACG GTT TAC CCA CTT A	
	AAC CAG AAA AAC CCT AAA GAC ACG	
<i>ermC</i>	AAT CGG CTC AGG AAA AGG	
	ATC GTC ATT TCC TGC ATG	
<i>msrE</i>	TAT AGC GAC TTT AGC GCC AA	
	GCC GTA GAA TAT GAG CTG AT	
<i>mphE</i>	ATG CCC AGC ATA TAA ATC GC	
	ATA TGG ACA AAG ATAGCC CG	

Fase		Temperatura	Tiempo
Durante 30 ciclos	Desnaturalización inicial	95 °C	5 minutos
	Desnaturalización	95 °C	30 segundos
	Hibridación <i>tetA</i>	61 °C	30 segundos
	Hibridación <i>tetB</i>	59 °C	
	Hibridación <i>bla<sub>ROB1</sub></i>	58 °C	
	Hibridación <i>bla<sub>TEM</sub></i>	55 °C	
	Hibridación <i>ermA</i>	59 °C	
	Hibridación <i>ermC</i>	61 °C	
	Hibridación <i>msrE</i>	59 °C	
	Hibridación <i>mphE</i>	58 °C	
Elongación	72 °C		
Elongación final	72 °C	10 minutos	

### ***Streptococcus suis***

Se seleccionaron los genes de resistencia frente a antibióticos de acuerdo con en Malhotra *et al*, (2005). Se trató de genes implicados en resistencias frente a las tetraciclinas (*tetM*, *tetO*), y frente a macrólidos (*ermB* y *mefA/E*). La secuencia de los genes y las condiciones de la PCR multiplex se detallan en la tabla 16.

## Material y métodos

**Tabla 16:** Cebadores de PCR de factores de virulencia y condiciones de PCR para *Streptococcus suis*

Gen	Secuencia (5'-3')
<i>ermB</i>	TGGTATTCCAAATGCGTAATG CTGTGGTATGGCGGGTAAGT
<i>mefA/E</i>	CAATATGGGCAGGGCAAG AAGCTGTTCCAATGCTACGG
<i>tetM</i>	GTGGACAAAGGTACAACGAG CGGTAAAGTTCGTCACACAC
<i>tetO</i>	AACTTAGGCATTCTGGCTCAC TCCCACTGTTCCATATCGTCA

Fase		Temperatura	Tiempo
	Desnaturalización inicial	93 °C	3 minutos
Durante 30 ciclos	Desnaturalización	93 °C	1 minuto
	Hibridación	45 °C	1 minuto
	Elongación	62 °C	4 minutos
	Elongación final	65 °C	3 minutos

### Electroforesis en gel de agarosa

Una vez finalizado el programa de termociclación, las muestras se transfirieron a un gel de agarosa.

### Tampón TBE 10x para 1L

- 49,4 g de Trizma® base (Sigma-Aldrich, T1503)
- 11,42 ml de ácido acético glacial (Sigma-Aldrich, A6283)
- 20 ml de solución preparada con EDTA (Panreac, 131669) 0,5 M y pH = 8
- Agua MilliQ hasta 1 litro

Para su uso se preparó TBE 1x, diluyendo 1:9 en agua Milli-Ro.

### Geles de agarosa

Se prepararon al 1 %, disolviendo en ebullición 0,5 g de agarosa (Laboratorios Conda, 8014) en 50 ml de tampón TBE 1x y añadiendo 3 µl de RedSafe™. La mezcla se vertió en el molde correspondiente y se dejó solidificar.

### Tampón de carga del ADN

Se utilizó el "6x DNA Loading Dye" (Thermo Scientific, R0611). Se añadieron 1,3 µl por cada 10 µl de muestra. Se homogenizó y cargo en el carril correspondiente.

### Marcador de peso molecular del ADN

Se utilizó el "GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder" (Thermo Fisher, SM0321).

### 3.6. MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo)

Esta metodología se basa en la utilización de la espectrometría de masas para identificar proteínas, en su mayoría ribosomales, ofreciendo así una identificación y clasificación de los microorganismos basada en su perfil.

#### Material y equipamiento

- Placa MALDI-TOF Bruker Daltonik, Bremen, Alemania.
- Matriz REF. Para prepararla se añadían:
  - Acetonitrilo 50 %
  - Agua 47,5 %
- Ácido trifluoracético Sigma Aldrich.
- Espectrómetro de masas *Microflex LT*.

#### Procedimiento

Se empleaba una punta de micropipeta para tomar una pequeña cantidad de crecimiento microbiano, la cual se aplicaba sobre el "pocillo" de la placa conductora.

Se repartía homogéneamente el crecimiento con ayuda de la punta. Se repetía la operación una vez más con cada aislado, de forma que cada muestra fue colocada por duplicado.

Se esperaba entre 1 y 3 minutos a que el inóculo bacteriano estuviera seco, tiempo que fue aprovechado para agitar la matriz. Transcurrido este tiempo, se añadía

## Material y métodos

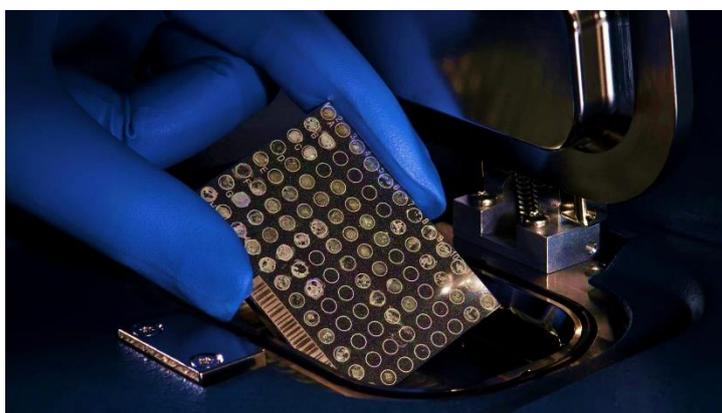
---

1  $\mu$ l sobre cada pocillo, cambiando siempre la punta de la micropipeta. Se esperaba entre 1 y 5 minutos a que sucediera la cristalización de la matriz con las bacterias.

Se utilizó como control positivo un extracto de proteínas de *Escherichia coli* (Bruker Bacterial Test Standard).

Se introdujo la placa y se iniciaron los programas MALDI Biotyper Compass (MBT Compass).

(a)



(b)



**Imagen 5:** (a) Fotografía de la placa del MALDI-TOF entrando en el espectrómetro de masas Microflex LT para ser analizada. (b) Espectrómetro de masas.

Se accedió a nuestro número de usuario y se introdujo el número de placa, se seleccionaron los pocillos que debían analizarse, y se nombraron las muestras. La lectura de los resultados corrió a cargo del programa Flex Control (versión 3.0, Bruker Daltonics). Este programa analizó pocillo a pocillo las muestras bacterianas.

Se generaron resultados con distintos valores o puntuaciones, que se utilizaron según los siguientes criterios impuestos por el programa:

- Identificación de especie:  $>2$
- Identificación de género: entre 1,7 y 1,9.
- Sin identificación:  $< 1,7$ , falta de identificación.

En todo caso, se tomaron como válidas las identificaciones de especie, en ambas muestras. Se utilizó este método para la identificación de algunos de los aislados respiratorios, así como de todos los aislados de origen ambiental.

### 3.7. Determinación de resistencias frente a antibióticos mediante un método comercial (Sensititre®)

Para *S. suis* y *P. multocida* el nivel de resistencia frente a los antibióticos se evaluó mediante ensayos de concentración mínima inhibitoria, utilizando placas comerciales Sensititre® BOPO6F (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE. UU.). Los resultados fueron interpretados de acuerdo con las pautas del CLSI y los estándares EUCAST CLSI, 2019; EUCAST, 2020. El procedimiento fue el siguiente:

#### Material

- 1 tubo de ensayo con rosca y agua MilliQ (alícuotados volúmenes de 5 ml)
- 1 tubo con el medio líquido de cultivo CAMHB (*Cation-Adjusted Mueller Hinton Broth*; 11 ml) Thermo Scientific™.
- Complementos correspondientes para el CAMHB según la bacteria problema. (Ver tabla 18).
- 1 cultivo con la bacteria problema sembrada en el medio correspondiente, en nuestro caso, TSA suplementado al 5 % con suero fetal bovino (*Gibco Fetal Bovine Serum A4766801*).
- 1-3 asas de siembra.
- 1 placa de microtitulación de 96 pocillos BOPO6F (*Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE. UU*)
- 1 papel adhesivo de sellado de la microplaca.
- 1 cabezal.

#### Instrumental

- Nefelómetro (*Thermo Scientific™ V3011*).
- Estándar de McFarland 0,5 (*0.5 Polymer McFarland Standard Thermo Scientific™ E1041*).
- Sistema de dosificación de inóculo automatizado (*Thermo Scientific Sensititre AIM™ V3020*).
- Agitador Vortex.
- Incubador.

## Material y métodos

(a)



(b)



**Imagen 6. (a)** El dosificador Sensititre® automatizado con el que se añadía el volumen exacto de bacteria en el medio de crecimiento, sobre la placa de 96 pocillos. **(b)** Nefelómetro para la evaluación de la densidad óptica del crecimiento bacteriano.

### Método

Se partió de un cultivo de las bacterias en medio sólido, en TSA para *P. multocida*, y en TSA+SFB para *S. suis*. Se calibró el nefelómetro introduciendo el tubo del estándar de McFarland 0,5. Por otro lado, de las placas sólidas se añadieron 3 colonias en 5 ml de agua Milli-Ro y se agitó hasta quedara una solución homogénea. Se comprobó con ayuda del nefelómetro que la concentración bacteriana era la adecuada. Se pipeteó el volumen de la suspensión bacteriana indicado en la tabla 17 en el tubo de medio de cultivo CAMHB y se repitió la agitación.

**Tabla 17:** Volúmenes y medios utilizados para las diferentes bacterias durante el desarrollo de la técnica

	Volumen de suspensión bacteriana	Medio de cultivo	Volumen final
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	50 µl	M-H + NAD (2 µl NAD/ml M-H)	50µl/pocillo
<i>Glaesserella parasuis</i>	100 µl	M-H + NAD (2 µl NAD/ml M-H)	100µl/pocillo
<i>Pasteurella multocida</i>	10 µl	Mueller Hinton	50 µl/pocillo
<i>Streptococcus suis</i>	50 µl	M-H + 5 % SFB	100 µl /pocillo

Se cambió el tapón del tubo por un cabezal de dosificación y se colocó en su lugar correspondiente, también se ubicó en su lugar la microplaca (previamente rotulada). Se seleccionó y ajustó el volumen a dispensar, dependiendo de la especie bacteriana (tabla 17). Una vez terminó la dosificación, se retiró la microplaca, se selló con la pegatina y se incubó a 37 °C durante 24 horas. Pasado ese tiempo se procedió a la lectura. Se comprobó en primer lugar la existencia de depósito en los controles positivos y que no había crecimiento el control negativo. Si se cumplían ambos requisitos, se prosiguió la lectura de los resultados.

Para estos productos antibacterianos se calculó su concentración mínima inhibitoria (CMI) o concentración mínima de cada uno de ellos que era capaz de inhibir el crecimiento bacteriano en un caldo de cultivo adecuado, en su totalidad. Además, se calcularon los valores de la CMI<sub>50</sub>, o concentración de producto que inhibía el crecimiento del 50 % de los aislados estudiados, y de la CMI<sub>90</sub> o concentración que inhibía el 90 % de esos aislados. Con el fin de obtener el porcentaje de aislados sensibles a cada antibiótico y, por tanto, el porcentaje de los resistentes se recurrió a los puntos de corte (o *break points*) de cada uno, a partir de estudios previos o de los datos existentes en la bibliografía acerca de las especies próximas. En aquellos casos en los que no se contó con este valor, únicamente se determinaron las CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub>, así como el rango de acción del antibiótico en cuestión.

### **3.8. Discos de antimicrobianos para determinación de resistencias frente a antibióticos.**

Por otro lado, en *G. parasuis* y *A. pleuropneumoniae*, debido a sus requerimientos y dificultad para crecer tuvieron también dificultades para ser reproducibles en placas Sensititre®, por ello, la sensibilidad fue evaluada mediante discos de antibiogramas; tal y como se indica en la tabla 18.

Los resultados fueron interpretados de acuerdo con las pautas de CLSI y los estándares EUCAST CLSI (2018) y EUCAST (2019).

## Material y métodos

**Tabla 18.** Referencias de los discos de antibióticos usados para este procedimiento experimental

REFERENCIA DE OXOID™	ANTIBIÓTICO
CT0003B	AMPICILINA 10 UG
CT0794B	GENTAMICINA 120 UG
CT0026B	KANAMICINA 30 UG
CT0048B	ESTREPTOMICINA 15 UG
CT0054B	TETRACICLINA 30 UG
CT0425B	CIPROFLOXACINO 5 UG
CT0065B	COLISTINA 50 UG
CT0183B	FOSFOMICINA 50 UG
CT0020B	ERITROMICINA 15 UG
CT1751B	CEFTIOFUR 30 UG
CT0052B	TRIMETOPRIMA/ SULFAMETOXAZOL 25 UG
CT0639B	ENROFLOXACINO 5 UG
CT0161B	AMOXICILINA 10 UG

### Material (por muestra)

- 1 tubo de ensayo de cristal con rosca, con Agua MilliQ (alícuotados 5 ml)
- 1 cultivo con una bacteria problema sembrada en el medio correspondiente.
- 1-3 asas de siembra.
- 1 hisopo estéril.

### Instrumental

- Nefelómetro (*Thermo Scientific™ V3011*).
- Estándar de McFarland 0,5 (*0.5 Polymer McFarland Standard Thermo Scientific™ E1041*).
- Agitador Vortex.
- Incubador.

### Método

La preparación del inóculo se llevó a cabo de la misma forma que en el apartado anterior. Una vez obtenida la turbidez deseada, se sumergió un hisopo estéril en el tubo, y se eliminó el exceso de suspensión rotándolo firmemente contra la pared interna del mismo. Se deslizó el hisopo sobre la superficie del medio de cultivo y, con unas pintas esterilizadas al fuego se añadieron los discos de antibióticos, presionando ligeramente

para asegurar un contacto uniforme. Las placas se incubaron 24-48 horas a 37 °C en microaerofilia.

### 3.9. Ácidos grasos de cadena media

El ácido láurico que fue utilizado para todos estos experimentos fue el comercializado por Sigma® (*Lauric acid W261416-1 KG-K -K SIGMA-ALDRICH®*). También se realizaron los mismos experimentos con un éster derivado de este ácido: el glicerol monolaurato, también conocido como  $\alpha$ -monolaurina. (*1-Lauroyl-rac-glycerol M1765-100MG SIGMA-ALDRICH®*). El disolvente polar utilizado en ambos casos fue el DMSO (dimetilsulfóxido) (*Fisher Bioreagents BP231-100*). Las especies bacterianas seleccionadas para estos ensayos fueron las tres Gram-negativas respiratorias (*P. multocida*, *G. parasuis* y *A. pleuropneumoniae*) y una Gram-positiva (*S. suis*).

Para alcanzar un contraste en los resultados de los distintos métodos y poder dar resultados más fiables, se realizaron diversos experimentos con distintas concentraciones del ácido láurico.

#### Experimentos basados en difusión

Se conocen como técnicas de difusión los ensayos utilizados para evaluar la actividad antimicrobiana de un compuesto sobre las bacterias cultivadas en un cultivo sólido (Salie *et al.*, 1996; Diallo *et al.*, 2001). Se realizaron dos procedimientos experimentales para cuantificar la actividad antimicrobiana del ácido láurico y también del éster derivado la monolaurina sobre las bacterias mencionadas anteriormente.

Para todas las bacterias estudiadas se partió de un punto común: una suspensión 0,5 en la escala McFarland, equivalente a  $1 \times 10^6$  UFC/ml. (Bernal & Guzmán, 1984). Para ello, se tomaron entre 1 y 3 colonias en cultivo sólido, añadiéndolas con cuidado a agua destilada, agitando y midiendo con ayuda del nefelómetro en todos los casos.

#### Método por difusión en placa

El primer experimento se realizó mediante difusión directa en placa. En el centro de la placa de agar Müller-Hinton se realizó una perforación con ayuda de un sacabocados, de aproximadamente 5 mm. En cada una de las placas, se añadió en el pocillo una de las siguientes concentraciones de ácido láurico o monolaurina disuelta en DMSO: 50 mg/ml, 100 mg/ml, 200 mg/ml, 500 mg/ml, 900 mg/ml, 1200 mg/ml y 1500 mg/ml y se selló con 10  $\mu$ L de agar. Una vez solidificado el agar, se sembraron 100  $\mu$ L en cada placa de una suspensión bacteriana 0,5 McFarland con ayuda de un asa de

## Material y métodos

---

Digralsky desechable. Se incubaron de 24 a 48 horas en microaerofilia, y se midieron los diámetros del halo de inhibición, contando también el troquelado. Como control positivo se utilizó una dilución que no presentó ácido láurico ni monolaurina, únicamente DMSO. Como control negativo, se utilizaron ampicilina y gentamicina a razón de 10 µL/ml. Todo el procedimiento experimental se realizó por triplicado.

### Método de difusión en disco

El segundo experimento consistió en una aplicación del método de Kirby-Bauer. Para evaluar la actividad antimicrobiana del ácido láurico y la monolaurina, se estudió la concentración mínima inhibitoria. Las recomendaciones y utilizadas fueron las estandarizadas por el CLSI (2019). Se probaron diferentes concentraciones ácido láurico y monolaurina disueltas en DMSO: 50 mg/ml, 100 mg/ml, 200 mg/ml, 500 mg/ml, 900 mg/ml, 1200 mg/ml y 1500 mg/ml. Se impregnaron discos blancos estériles de 6 mm de diámetro (*Thermo Scientific™* Discos para antibiogramas en blanco *Oxoid™*) con 15 µL de las anteriores concentraciones. El cultivo bacteriano se sembró en césped, con ayuda de un hisopo estéril, el inóculo fue equivalente a 10<sup>6</sup> UFC/ml. Inmediatamente, y con pinzas estériles, se colocó el disco impregnado con la solución del ácido orgánico en el centro de la placa. Las placas fueron incubadas de 24 a 48 horas en microaerofilia, y se midieron los diámetros del halo de inhibición, contando también el diámetro del disco. Este experimento se realizó por triplicado. Como control positivo se utilizó una dilución sin ácido láurico ni monolaurina, únicamente con DMSO. Como control negativo se utilizaron discos de ampicilina y gentamicina a razón de 10 µL/ml, según la metodología descrita por Fratini *et al.* (2014).

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\text{Diámetro del extracto} - \text{Diámetro del halo del blanco})}{(\text{Diámetro del control positivo} - \text{Diámetro del halo blanco})} \times 100$$

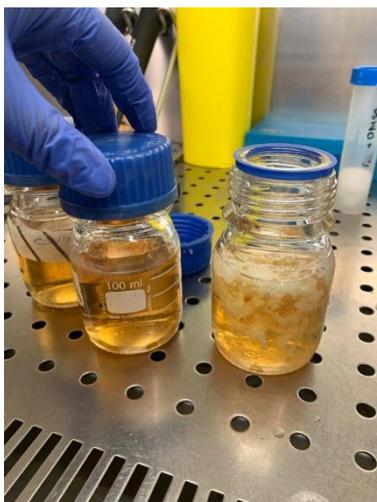
### Método basado en el recuento bacteriano

No se puede cuantificar el crecimiento bacteriano mediante los métodos de espectrofotometría debido a la turbidez del ácido láurico en contacto con medio líquido de cultivo (ver imagen 7). Por ello, se decidió realizar diluciones seriadas de un cultivo líquido, con siembra posterior en un cultivo sólido.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la prueba de Kirby-Bauer, se seleccionó la concentración mínima en la que el halo de inhibición fue el mayor posible. En el caso del ácido láurico fue de 900 mg/ml. Se utilizaron TSA y TSB, con o sin un 5 % de SFB o NAD dependiendo de la especie bacteriana. Se adaptaron los mismos requerimientos reflejados anteriormente en el apartado Medio cultivo de la tabla 17.

## Material y métodos

---



**Imagen 7.** Bacterias en crecimiento en un cultivo líquido con adición de ácido láurico. Detalle de la turbidez generada al añadir el ácido.

Partiendo del mismo inóculo inicial que en los anteriores experimentos se añadieron 100  $\mu$ L de inóculo a 150 ml de TSB + 5% de SFB o TSB. Se incubaron a 37 °C y 150 rpm en un agitador. Para todas las incubaciones se utilizaron botellas de cristal con tapón *Botella Laboratorio 250ml Schott - Duran Cristal W 5526250*. Para el experimento se mantuvieron las siguientes condiciones:

- En uno de los recipientes se mantuvo un crecimiento bacteriano control, sin añadir de ningún tipo de ácido.
- En el segundo de los tubos se realizó el mismo experimento, pero adicionando DMSO, para comprobar que este disolvente no afectaba al crecimiento bacteriano.
- En el tercero de ellos se adicionó el ácido láurico al principio de la incubación, es decir, antes de que comenzara el crecimiento.
- En el cuarto tubo se adicionó el ácido láurico una vez que el crecimiento hubo llegado a la fase exponencial, y se dejó actuar durante 1,5 horas a temperatura ambiente.
- En el último caso, la incubación fue únicamente con ácido láurico disuelto.

Utilizando el espectrofotómetro modelo *Eppendorf BioPhotometer® D30*, y a una longitud de onda de 600 nm, se realizaron mediciones cada 20 minutos del crecimiento control (usando como blanco TSB + 5 % de SFB) hasta que se alcanzó a su fase exponencial (en torno a las 3 horas).

En el frasco correspondiente fue el momento de añadir el ácido láurico y se dejó actuar durante 1 hora y media. En los otros casos se realizaron 8 diluciones seriadas

1:10, con sus respectivas siembras de 100  $\mu$ L (Hoben & Somasegaran, 1982) sobre placas de TSA o TSA+ 5 % de SFB, e incubación posterior en microaerofilia durante 24 horas, a 37° C. Al día siguiente se procedió al recuento.

### **3.10. Estudio de la actividad del ácido láurico sobre *Streptococcus suis* mediante microscopía electrónica**

Se realizó un ensayo de microscopía electrónica con *S. suis* para observar el efecto que el ácido láurico ejercía sobre su estructura y/o capacidad de multiplicación. Como primer paso se realizó el mismo procedimiento que en el apartado anterior “experimento basado en cultivo líquido”, y después se realizaron los protocolos para la observación de las muestras mediante microscopía de barrido y transmisión.

#### **Barrido**

El microscopio electrónico de barrido (MEB) proporciona imágenes de las superficies con alta plasticidad tridimensional. Debe tenerse en cuenta el hecho de que la información microscópica va a obtenerse de la superficie de la muestra: tanto durante la manipulación, de cara a evitar posibles alteraciones, como en la limpieza previa de todos los artefactos que pudiera haber sobre la misma. Es importante tener cuidado de que la muestra esté siempre cubierta por medio líquido, ya que las superficies sensibles se dañan fácilmente si se exponen momentáneamente al aire. Se realizó el siguiente procedimiento de preparación de las muestras:

#### **Fijación de la muestra**

Es de primordial importancia para una buena conservación de la ultraestructura morfológica celular y resulta una condición indispensable para lograr una buena resolución de la imagen. El protocolo convencional es la fijación química. Las bacterias se fijaron, en primer lugar, con glutaraldehído al 2,5 % en PBS durante 2 horas a 4 °C, obtenido a partir de una solución comercial al 25 % de glutaraldehído grado microscopía electrónica (TAAB Laboratories England, Reino Unido) en solución salina tamponada con fosfatos, pH 7,4, de SIGMA (St. Louis, USA). Se lavaron tres veces con el mismo tampón durante 30 minutos cada lavado. A continuación, se postfijaron en oscuridad y a temperatura ambiente con tetróxido de osmio al 2 % (TAAB Laboratories England, Reino Unido) en PBS durante dos horas. Para finalizar, se realizaron tres lavados de 30 minutos con el mismo PBS.

### **Deshidratación de la muestra**

Consistió en la sustitución del agua de la muestra por un solvente orgánico. Se deshidrataron las muestras en una cadena de etanol acuoso a concentraciones crecientes durante 30 minutos cada paso (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 3 x 96 % y 3 x 100 %), de Panreac Química (Barcelona, España).

### **Secado de la muestra**

Las condiciones de alto vacío a que se someten las muestras en el interior del MEB hacen necesario su secado completo. Se requiere un método que permita la eliminación del líquido deshidratante de la muestra, a la vez que preserve su estructura. Esto se consigue mediante el método del punto crítico, valores de presión y temperatura de todo elemento o compuesto a partir de los cuales la densidad del gas es la misma que la del líquido, es decir, se pasa de fase líquida a gaseosa sin límites visibles y sin fuerzas de distorsión. Para ello, se requiere intercambiar el etanol absoluto por un líquido en el que se alcance fácilmente el punto crítico: el CO<sub>2</sub> (31 °C y 73,8 bares). Se realizó utilizando un desecador de punto crítico modelo CPD 030 de BAL-TEC Inc. (Liechtenstein).

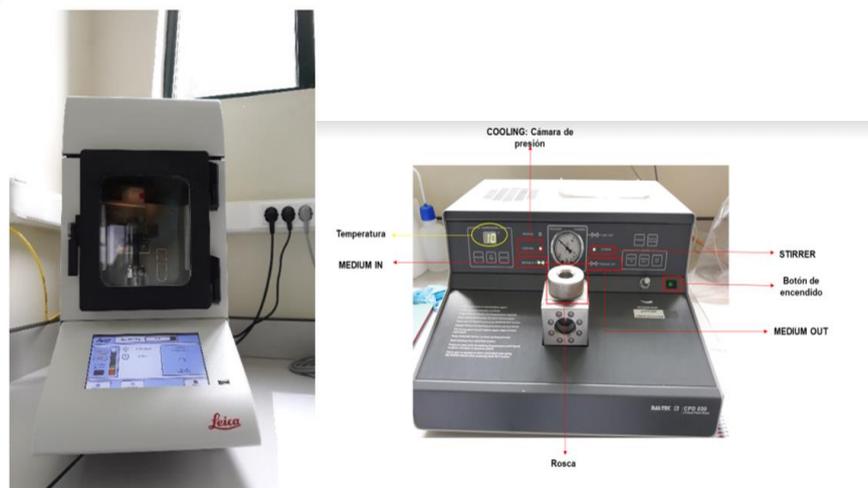
Estas muestras desecadas son muy higroscópicas, por lo que se realizó su recubrimiento metálico inmediatamente.

### **Recubrimiento metálico**

La superficie de las muestras que se van a observar en el MEB deben ser conductoras de la electricidad, a fin de evitar la formación de cargas que perturben la imagen y obtener así una mejor emisión de electrones secundarios, fundamentales en la formación de las características imágenes con alta plasticidad tridimensional. Para ello, se montaron previamente las piezas con una cola conductora sobre soportes cilíndricos metálicos adecuados para introducir en el MEB. Se creó una superficie conductora utilizando un aparato de pulverización modelo *SCD 004* de *BALZERS Union Limited* (Principado de Liechtenstein).

### **Obtención de las imágenes**

Las muestras así preparadas pueden introducirse en el MEB. Las imágenes digitales se obtuvieron a distintos aumentos utilizando un microscopio electrónico de barrido modelo *JSM-6480 LV* de *JEOL* (Tokio, Japón).



**Imagen 8.** De izquierda a derecha: pulverizador de oro SCD 004 de BALZERS Union Limited y desecador de punto crítico.

### Transmisión

#### Fijación

Las muestras se fijaron durante 4 horas en un frigorífico, en una solución de glutaraldehído al 2,5 % en PBS, obtenida a partir de una solución comercial al 25 % de glutaraldehído grado microscopía electrónica (TAAB Laboratories, England, UK), en solución salina tamponada con fosfatos a pH 7,4 (SIGMA, St. Louis, USA). Se efectuaron tres lavados mediante tres cambios de media hora en el frigorífico, en el mismo PBS. Se post fijó durante 2 horas, en oscuridad y a temperatura ambiente, en una solución de tetróxido de osmio al 2 % (TAAB Laboratories, England, UK) en PBS. Para finalizar, se realizaron tres lavados de 30 minutos con el mismo PBS.

#### Deshidratación

Los bloques se deshidrataron en soluciones acuosas de etanol en concentraciones crecientes durante 30 minutos cada paso: 30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 3 x 96 % y 3 x 100 % (Panreac Química, Barcelona, España).



**Imagen 9.** Realización de la deshidratación en alcohol.

### **Inclusión**

Se lavaron los bloques en óxido de propileno (SERVA Electrophoresis GmbH, Heilderberg, Alemania), mediante tres pases de una hora a temperatura ambiente. Para la infiltración de la resina epoxy, se tuvieron las muestras durante 12-18 horas, en una solución de óxido de propileno y resina Epon 812 (Tousimis Research Corporation, Rockville, USA) al 50 % en viales destapados y, posteriormente, se dejaron en la resina al 100 % de 18 a 24 horas. Por último, se polimerizaron las muestras embebidas en la resina, correctamente orientadas en moldes de silicona, en estufa (Selecta, Barcelona, España), a 60 °C durante 24 a 36 horas.

### **Ultramicrotomía**

Se obtuvieron, en primer lugar, secciones semifinas de 0,5 – 1 micras de grosor sobre portaobjetos y se contrastaron con azul de toluidina (0,2 g en 50 ml) (Panreac Química, Barcelona, España). Se observaron en un microscopio óptico modelo E600 Nikon (Tokyo, Japón) y se realizaron fotografías con el programa NIS Elements (Nikon, Tokyo, Japón).

Se obtuvieron secciones ultrafinas con una cuchilla de diamante (DIATOME, Suiza) en un Ultratome V (LKB, Bromma, (Suecia), que fueron recogidas en rejillas de 3,05 mm de diámetro (Gilder Grids Ltd., Grantham, Inglaterra). Las secciones se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo (Panreac Química, Barcelona, España).

## Material y métodos

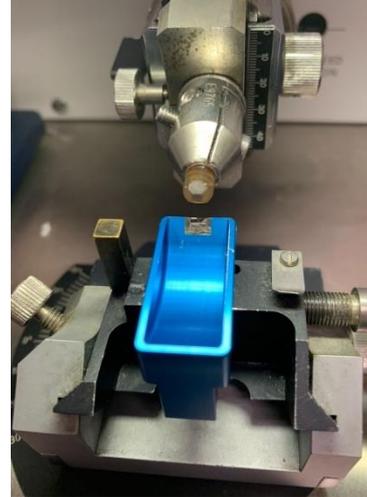
---

Se realizaron imágenes digitales con un microscopio electrónico de transmisión, modelo JEM-1010 (JEOL, Tokyo, Japón).



(a)

(b)



**Imagen 10.** (a) Ultramicrotomo con el que se realizaron los cortes. (b) Detalle del ultramicrotomo.

### 3.11. Desinfectantes

Tras los muestreos en granja se realizó un listado de los desinfectantes que se utilizaron de manera rutinaria en el total de las granjas de Castilla y León objeto de estudio. Con estos compuestos se pudieron realizar los ensayos *in vitro* sobre las bacterias del Complejo Respiratorio Porcino, y también sobre cuatro bacterias ambientales muy prevalentes en los muestreos (*S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* y *P. fluorescens*). Además de los desinfectantes utilizados en las granjas, se probó la eficacia del alcohol etílico al 70 % y de la yodermina, por representar dos de los antisépticos más utilizados.

## Material y métodos

**Tabla 19:** Nombres comerciales y composición de los desinfectantes utilizados durante este experimento. Se corresponden con los más utilizados en las explotaciones porcinas estudiadas.

Nombre comercial	Composición	Dosis
Limoseptic	Glutaraldehído 5 %, cloruro de didecil dimetilamonio 4,5 %, coadyuvantes, inertes y agua c.s.p. 100 %.	1 % en agua
Poliformo	Paraclorometacresol 10 %, alcohol isopropílico 10 %, perfume, detergente, disolvente y secuestrantes c.s.p. 100%.	1-2 % en agua
CR-36	Acción sinérgica en medio alcohólico de: 0,256 % de bronopol y 0,08 % de cloruro de benzalconio, 41 % alcohol isopropílico. Excipientes, c.s.p. 100 %.	Sin diluir
Virkon S	Bis (peroximonosulfato) bis (sulfato) de pentapotasio 497 g/kg. Compuestos peroxidados, tensioactivos y ácidos orgánicos.	0,5 %
Megades Novo	Glutaraldehído: 150 g/l Amonio cuaternario: 100 g/l	0,75 % en agua
Megades Oxi	Ácido acético (15-30 %), peróxido de hidrógeno en disolución (5-10 %), ácido peracético (<3 %), aminas, alquilos en C12-14, óxidos de N (> 5 %)	0,5 % en agua
Sanitas Forte	Por 100 g: Glutaraldehído 14 g; didecil dimetil cloruro de amonio 10 g; excipiente c.s.p. 100 g.	1:4000 en agua
Meviforte Plus	Hidróxido de sodio, ATP CLP00, aminas, C12-14-alquildimetil, N-óxidos ,2-metil-2,4-pentanodiol, ATP CLP00	1-4 % en agua
Despadac	Cloruro de didecil dimetil amonio (Bardac 22®) 10 %, glutaraldehído 4 %, formaldehído 3,15 %, glioxal 3,2 %	0,4 % en agua
Bioplaquen Perox	Peróxido de hidrógeno 25%, ácido acético 8 % y ácido peracético 5 %	0,5-2 % en agua
Virobacter	Peróxido de hidrógeno, ácido acético, ácido peracético, tensioactivos, estabilizantes y excipientes.	0,30 % en agua
Hyprelva net PLUS	Agentes secuestrantes. Tensioactivos, estabilizantes. Quelantes, adyuvantes e inhibidores de la corrosión.	0,5-2 % en agua
Etanol 70 %	Etanol 70%, agua destilada 30%.	Sin diluir

### 3.12. Evaluación *in vitro* de desinfectantes sobre diferentes aislados del CRP y bacterias de origen ambiental

Tras conocer los desinfectantes utilizados en las granjas estudiadas, y basándonos en los ensayos de Rodríguez Ferri *et al.* (2010), se realizaron los experimentos *in vitro* para evaluar la capacidad de los diferentes desinfectantes.

### **Bacterias y desinfectantes**

Los aislados fueron cultivados 24 horas a 37 °C en agar chocolate en condiciones de microaerofilia, salvo los aislados ambientales, los cuales se incubaron en TSA durante 24 horas, a 37 °C, en anaerobiosis.

Las bacterias se suspendieron en solución salina estéril con Tween 20 al 0,05 % hasta obtener 10<sup>9</sup> UFC/ml. Estas suspensiones se utilizaron como inóculo inicial para la prueba (Gutiérrez *et al.*, 1995).

Para este estudio fueron se utilizaron un agente químico activo y 12 formulaciones comerciales (sus marcas, fuentes e ingredientes activos están enumerados en la tabla 19 del apartado desinfectantes). Estos productos se diluyeron con agua estéril, de acuerdo con las instrucciones de los fabricante. La concentración en uso de cada desinfectante aparece en la misma tabla.

### **Procedimiento**

Se añadieron 100 µl de la suspensión bacteriana (10<sup>9</sup> UFC/ml de solución salina estéril) a 900 µl de cada desinfectante. Se dejó actuar durante un minuto (elegimos ese tiempo por ser el más utilizado de forma rutinaria en estos estudios *in vitro* basados para Gutiérrez *et al.*, (1995). Pasado el minuto se diluyó en 900 µl de solución salina estéril para detener la acción desinfectante. Se realizaron diluciones seriadas hasta 10<sup>-7</sup>.

Los controles para cada suspensión de prueba se mezclaron con 900 µl de solución estéril de agua, en lugar de desinfectante.

De cada dilución se sembraron 100 µl en TSA suplementado con 5 % de SFB o TSA, dependiendo de la especie bacteriana. Se incubaron 24-48 horas a 37° C.

La actividad desinfectante fue determinada comparando el crecimiento del control y el del desinfectante, y se expresó como la media ± desviación estándar (DE) de la reducción de UFC/ml.

### **3.13. Estudio *in vivo* de la acción de los desinfectantes en las granjas**

Se diseñó un programa de muestreo en las granjas, con el fin de evaluar la eficacia de los protocolos de limpieza y desinfección. Para ello, se decidió muestrear en dos momentos clave: después de la limpieza y después de la desinfección. Los muestreos fueron realizados siguiendo las recomendaciones del fabricante de los productos utilizados.

## Material y métodos

---

Todos los estudios se realizaron en granjas de Castilla y León. Las muestras obtenidas se refrigeraron hasta llegar al laboratorio para su procesado.

Por otro lado, y debido a las restricciones que la COVID-19 supuso en el transporte entre municipios y provincias, se realizó un vídeo explicativo de cómo deberían tomarse las muestras, el cual recibió el veterinario de la granja. Junto con de la información detallada de cada caso particular y asistencia telefónica durante todo el proceso. Una vez que el veterinario responsable de la explotación realizó la toma de muestras, fueron enviadas refrigeradas a la Universidad de León para su posterior análisis. En todo caso, las muestras fueron procesadas en menos de 24 horas, desde el momento de la toma de muestras.

(a)



(b)



**Imagen 11. (a)** Ejemplo de granja vaciada y limpia para el muestreo. **(b)** Material con el que se realizó el muestreo.

### Granjas para la prueba de desinfectantes

Se analizaron muestreos de un total de 35 granjas de las cuales:

- 10 fueron granjas de cebo
- 15 fueron granjas de transición
- 15 fueron granjas de madres

El porcentaje de eficacia de cada una de las pruebas se obtuvo de acuerdo con publicaciones previas (Best *et al.*, 1988, 1990; Gutiérrez *et al.*, 1995; Rodríguez Ferri *et al.*, 2010).

La fórmula para el cálculo de la reducción logarítmica fue:

$$\log \frac{n^{\circ} \text{UFC por ml del CONTROL}}{n^{\circ} \text{UFC por ml del TRATAMIENTO}}$$

A partir de esos datos, y siguiendo lo expuesto por las publicaciones anteriores, el porcentaje de eficacia se consideró tal y como está expuesto en la tabla 20.

**Tabla 20:** Rangos de porcentajes de eficacia de los desinfectantes probados.

Reducción logarítmica obtenida	% de eficacia
<0,999...	El porcentaje derivado de la reducción logarítmica obtenida no se considera suficientemente eficaz.
1 – 1,999...	90 %
>2 – 2,999...	99 %
>3 – 3,999...	99,9 %

### 3.14. Estudio *in vitro* de la desinfección mediante radiación ultravioleta sobre diferentes aislados ambientales

Se realizó un estudio de las bacterias encontradas comúnmente en el ambiente de las granjas. Las bacterias seleccionadas fueron las más prevalentes en los muestreos:

Gram positivas

- *Staphylococcus aureus*
- *Bacillus subtilis*

Gram negativas

- *Escherichia coli*
- *Pseudomonas fluorescens*

Se valoró su capacidad de supervivencia después de verse sometidas a la acción de una lámpara de 60W dotada de 195 LEDS que emitían luz UV.

En primer lugar, se trabajó con suspensiones de estos microorganismos, de aproximadamente una densidad óptica de 1 a 540 nm de longitud de onda. Se analizó la actividad de la lámpara “*UV Germicidal Lamp*” (Valencia, España) durante distintos tiempos sobre el cultivo bacteriano: 15 minutos, 2, 4 y 8 horas, por medio de la comparación del crecimiento de estos microorganismos antes y después de su exposición a estos periodos de tiempo.

Se procedió a realizar diluciones seriadas en base 10 (100 µL de microorganismos por 900 µL de solución salina estéril). Se estudió la reducción logarítmica y el porcentaje de eficacia.

### **3.15. Estudio *in vitro* de la desinfección mediante ozono sobre diferentes aislados ambientales**

Con el fin de conocer el efecto del ozono como alternativa a la desinfección convencional se realizaron dos experimentos *in vitro*:

#### **Primera y segunda prueba**

El aparato generador de ozono fue el “*Total Clean TCL-OZ100UV60*”, el cual generaba 5 g/hora, ionizador de aire y dotado de una lámpara de UV de 60W. (Valencia, España). Se utilizó un aparato muestreador de aire, sobre placas con medios de cultivo, con una capacidad de muestreo de 100 litros de aire por cada 60 segundos. Se valoró la presencia de bacterias en el aire del laboratorio. Para las bacterias se utilizó agar TSA. El volumen del laboratorio fue de aproximadamente 105 m<sup>3</sup>.

Dentro de esta prueba se valoraron a su vez dos concentraciones diferentes de ozono: 1 y 1,5 ppm. En ambos casos, se tomaron 100 litros de aire tanto antes como después de utilizar el equipo biocida.

Las placas de TSA se incubaron durante 24 horas a 37° C. Al día siguiente se realizó el recuento.

#### **Tercera prueba prueba**

Para este ensayo se prepararon suspensiones de estos microorganismos, de aproximadamente una densidad óptica de 1 a 540 nm de longitud de onda. Se dispensaron 1 ml sobre placas de cultivo celular de 24 pocillos *Thermo Scientific Nunc Cell Culture Plastics (Nunc, Denmark)* y se evaluó el crecimiento de estos microorganismos antes y después de su exposición a las dos concentraciones de ozono generadas por el aparato “*Total Clean TCL-OZ100UV60*”.

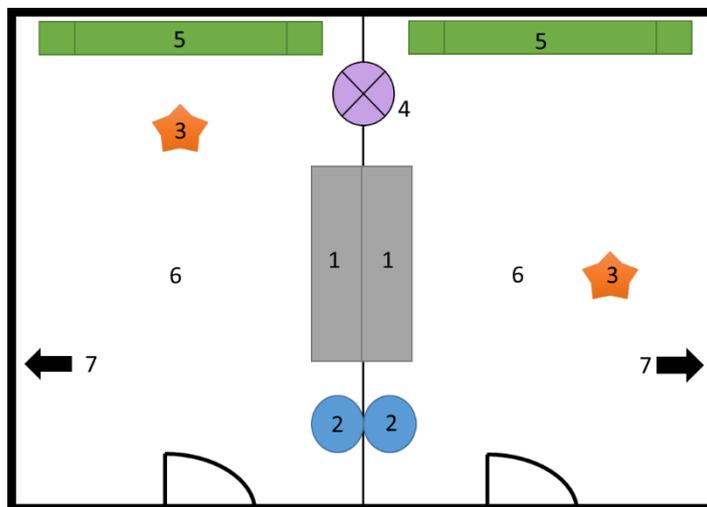
También se utilizaron placas de TSA para los recuentos efectuados para cada una de las cuatro bacterias.

### 3.16. Estudio *in vivo* de la desinfección con ozono y agua ozonizada en las granjas

Se sometieron a estudio tres estancias diferentes. En todos los casos se seleccionaron dos salas prácticamente iguales, denominadas “sala A” y “sala B”. En la “sala A” se procedió a un protocolo de limpieza, secado y desinfección con desinfectante utilizado convencionalmente en cada granja, y se tomaron muestras para el estudio microbiológico, después de la limpieza y de la desinfección.

En la “sala B” se realizó una limpieza convencional, pero después del secado la desinfección se realizó con ozono y en dos de las tres granjas la desinfección de comederos, bebederos y juguetes se realizó con agua ozonizada. En este caso, también se realizó un muestreo antes y otro después de la desinfección.

Para poder realizar este estudio experimental se tuvo que conocer con exactitud el volumen total del cubículo, para calcular el volumen de ozono que debía producir el generador.



**Figura 23.** Plano de las dos salas gemelas en las que se realizó el experimento y lugares donde se muestrearon. 1 Comederos. 2 Bebederos. 3 Juguetes. 4 Conductos de ventilación. 5 Mantas calefactoras. 6 Suelos. 7 Paredes.

Se dispuso de dos bombas de ozono y cuatro medidores de ozono para poder saber en todo momento la cantidad de ozono presente en la granja. También de ventiladores para que el ozono se repartiese homogéneamente por todo el espacio. Una vez

## Material y métodos

---

alcanzado el nivel de ozono deseado, se apagaron los generadores y, cuando se llegó a una concentración inocua para el ser humano (menor de 0,1 ppm), se procedió a la realización del muestreo.



**Imagen 12.** Aparatos utilizados para generación y medición del ozono generado en la granja. De arriba izquierda hasta abajo derecha: lámpara de ozono, equipo home, lampara de ozono, sensor y cañón de ozono.

Para la toma de muestras en superficies lisas (suelos, paredes y placas calefactoras) se utilizaron placas de contacto RODAC. Para muestras en superficies irregulares (comederos, bebederos, juguetes, ...), se utilizaron esponjas de muestreo microbiológico con neutralizante. Las muestras obtenidas, refrigeradas, fueron remitidas al laboratorio, donde se procesaron, incubaron y realizaron los contajes e identificaciones.

### Primer muestreo

Se realizó en Guardo, Palencia, en una granja de transición, en la se llegó a 1 ppm de ozono, y sin aplicarse agua ozonizada.

La sala tenía un volumen de 350 m<sup>3</sup>. Se utilizaron 3 equipos Home, 2 sensores, 2 lámparas de ozono y ventiladores para que el ozono se distribuyese homogéneamente por toda la sala.

### **Segundo muestreo**

El segundo muestreo se realizó en Peleas de Abajo, Zamora, en una granja de cebo, en la que se llegó a 1,2 ppm de ozono. Se aplicó agua ozonizada en comederos y bebederos.

La sala tuvo un volumen de 400 m<sup>3</sup>. Se utilizaron 2 lámparas de ozono, 2 sensores, 4 lámparas de ozono, 4 cañones de ozono y ventiladores para que el ozono se distribuyese homogéneamente por toda la sala. También se rociaron comederos y bebederos con agua ozonizada.

### **Tercer muestreo**

El tercer muestreo se realizó en Guardo, Palencia, en una granja de transición, en la que se llegó a 1,5 ppm de ozono y se aplicó agua ozonizada en comederos y bebederos. La sala tenía un volumen de 400 m<sup>3</sup>.

Se utilizaron 2 lámparas de ozono, 2 sensores, 4 lámparas de ozono, 4 cañones de ozono y ventiladores para que el ozono se distribuyese homogéneamente por toda la sala. También se rociaron comederos y bebederos con agua ozonizada

Tuvimos que repetir este experimento debido a que la humedad ambiental fue excesiva en el primer intento y las máquinas generadoras de ozono no pudieron llegar a la cantidad de 1,5 ppm. La segunda vez que fue repetido existía una menor humedad en el aire y se pudo llegar a la cantidad de ozono deseada.

### 3.17. Estudio *in vivo* de la actividad del ácido láurico sobre la microbiota porcina intestinal y nasal e índices de conversión

Se valoró en un ensayo experimental en una granja el efecto de la suplementación de la dieta con dos dosis diferentes de ácido láurico. Se llevó a cabo en la etapa de transición sobre un total de 144 lechones destetados (25 días de edad) que se distribuyeron en 6 corrales (24 lechones por corral). Para el cálculo del tamaño muestral se empleó el programa ENE 2.0, determinado el tamaño necesario para comparar dos medias, en este caso de los índices de conversión de los animales, entre los grupos de animales con nivel de confianza del 95% y una potencia del 80% (nivel de significación de 0,05). La comparación entre los grupos experimentales se realizará mediante ANOVA, tras comprobar que los datos siguen una distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

El muestreo de lechones se realizó bajo autorización institucional y siguiendo buenas prácticas veterinarias. Según la normativa europea (Directiva 2010/63/UE) y española (Real Decreto 53/2013), este procedimiento no requería la aprobación específica de un Comité de Ética (Capítulo I, Artículo 1, 5 (f) de 2010/63/UE).

El experimento presentó tres grupos: un primer grupo control, al que se le administró pienso sin ningún tipo de aditivo, un segundo grupo en el cual el pienso presentaba una concentración de 2 kilos de ácido láurico por tonelada de pienso, y un último grupo el cual el pienso poseía una concentración de 4 kilos de ácido láurico por tonelada de pienso. La composición de los piensos *pre-starter* y *starter* se pueden ver en los anexos 1 y 2.

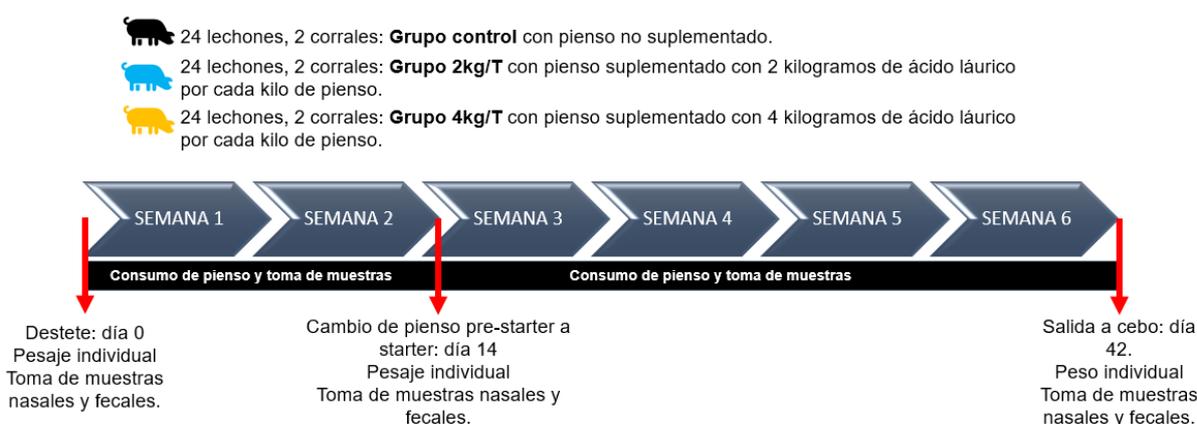
Los animales de todos los grupos experimentales fueron pesados individualmente al inicio del seguimiento, al cambio de pienso *pre-starter* a *starter* (y antes de pasar al cebadero (Figura 24). Adicionalmente, se anotó el consumo de pienso en cada uno de los corrales en las fechas en que se realizaron los muestreos y se tomaron muestras de heces e hisopos nasales de 10 lechones elegidos al azar de cada grupo, con el fin de llevar a cabo un seguimiento del microbiota, tanto digestiva como nasal.

Los muestreos nasales se realizaron por la metodología descrita por Blanco-Fuertes *et al.* (2021) para los estudios de *microbiota* nasal. Las tomas de muestras se realizaron siempre con guantes y con ayuda de hisopos flexibles, inmediatamente después de la toma de muestra en cada animal los hisopos flexibles se embebieron en

## Material y métodos

500 µl de tampón fosfato salino y se agitaron vigorosamente durante 30 segundos, posteriormente fueron refrigerados en hielo seco hasta su llegada al laboratorio, donde empezó el proceso de extracción del ADN.

Por otro lado la extracción de las muestras de heces se realizó directamente de la ampolla rectal de los lechones con ayuda de guantes y bolsas de plástico, para evitar contaminaciones ambientales se descartaron las partes de la muestra coprológica más expuestas al medio ambiente. En cuanto se obtuvieron se guardaron en bolsas estériles herméticas previamente etiquetadas, se mantuvieron en las mejores condiciones de asepsia posibles teniendo en cuenta el ambiente de la granja. Las muestras de la *microbiota* fecal se mantuvieron también en refrigeración hasta su llegada al laboratorio.



**Figura 24.** Diseño experimental del estudio para determinar la actividad del ácido láurico suplementado en el pienso durante la fase de destete, en parámetros productivos y sanitarios.

Figura diseñada mediante la herramienta BioRender.com por Esther Pérez Fernández.

El mismo día que se obtuvieron las muestras se realizó la extracción del ADN a de la *microbiota*, se emplearon los siguientes equipos de extracción:

- **QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit** para las muestras nasales. Se realizó el procedimiento según las instrucciones del fabricante, pero con la modificación en el último paso de realizar la elución con 50 µl con el fin de obtener una mayor concentración de ADN.
- **EURX GeneMATRIX Stool DNA Purification Kit** para las muestras fecales. Se realizó según las instrucciones del fabricante.

De las 180 muestras (90 fecales y 90 nasales) se seleccionaron las 108 que tuvieron una mejor concentración de ácidos nucleicos, para lo que se determinó la concentración de cada una mediante el sistema Qubit™ dsDNA BR (Invitrogen, Eugene, Oregon, Estados Unidos de América). La secuenciación se llevó a cabo por **Macrogen Inc.**

**(Headquarter)** World Meridian Venture Center, 10F, 254 Beotkkot-ro, Geumcheon-gu, Seoul, 08511, Corea.

### **Construcción de bibliotecas y secuenciación *shotgun***

El ADN fue utilizado para preparar bibliotecas de secuenciación de 150 pb utilizando el kit de preparación de bibliotecas NovaSeq XT de Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA). La secuenciación se realizó en la plataforma Illumina NovaSeq 6000 system (Macrogen Inc., Korea).

### **Filtrado de calidad de las lecturas y anotación**

El filtrado de calidad de las lecturas en bruto se realizó con trim galore (<https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>) utilizando los parámetros por defecto. Las lecturas que coincidían con el genoma porcino de referencia (GCF\_000003025.6) se eliminaron, utilizando una combinación de bowtie2 v2.3.4.126, samtools v1.927 y bedtools v2.29.0 (<https://bedtools.readthedocs.io/en/latest/#>), de acuerdo con una línea de trabajo publicada previamente (<http://www.metagenomics.wiki/tools/short-read/remove-host-sequences>). La asignación taxonómica de las lecturas filtradas se realizó utilizando Kraken2 v2.0.8-beta28 con la base de datos maxikraken2-1903\_140GB ([https://lomanlab.github.io/mockcommunity/mc\\_databases.html](https://lomanlab.github.io/mockcommunity/mc_databases.html)).

### **Ensamblaje de lecturas y agrupación de MAGs**

Cada muestra fue sometida a un ensamblaje metagenómico *de novo* de forma independiente mediante metaSPAdes v3.1329, utilizando los parámetros por defecto. Las lecturas filtradas fueron mapeadas contra contiguos mayores de 1000 bp obtenidos de la misma muestra usando bowtie2 v2.3.4.126 con el parámetro *--very-sensitive-local*. Se utilizó el script `jgi_summarize_bam_contig_depths`, de MetaBAT2 v2.12.130, para calcular los valores de profundidad de los contiguos, obligatorio para el agrupamiento de contiguos, por muestra basado en la frecuencia de tetranucleótidos y el protocolo de abundancia de contigs, que se realizó utilizando MetaBAT2 y la opción `'-m 1500' 30`.

La calidad de los MAG se estimó utilizando el flujo de trabajo lineal de CheckM (v1.1.3)<sup>31</sup> y cmseq (<https://github.com/SegataLab/cmseq>), para clasificar los MAG como de alta calidad (>90% de integridad, <5% de contaminación, <0,5% de mutaciones no sinónimas) y de calidad media (>50 de integridad, <5% de contaminación), para su posterior análisis.

### Gráficos de diversidad y taxonomía y análisis estadístico

Se utilizaron taxones pertenecientes al reino Bacteria. La  $\beta$ -diversidad se estimó mediante un análisis de coordenadas principales, utilizando la disimilitud de Bray-Curtis y la función `vegdist`. La dispersión dentro del grupo se evaluó mediante la función `betadisper`. Ambas funciones se encuentran en el paquete R `vegan` (<https://github.com/vegandevs/vegan>). Las disimilitudes de las muestras se determinaron mediante un análisis multivariante permutado de la varianza, utilizando matrices de distancia (PERMANOVA) con la función `adonis` en el paquete R `vegan` (<https://github.com/vegandevs/vegan>). Se utilizó la función `compare_means` del paquete R `ggpubr` para incluir las diferencias estadísticamente significativas en las figuras `boxplot`, que se trazaron utilizando el paquete R `ggplot2` (<https://github.com/tidyverse/ggplot2>).

Las comparaciones entre múltiples grupos de muestras para la taxonomía se realizaron mediante la prueba de Kruskal Wallis y la prueba de rango con signo de Wilcoxon post hoc. Los valores P se ajustaron mediante el método de Benjamini y Hochberg<sup>37</sup> y la significación se estableció en  $p < 0,05$ .

Los análisis de correlación se realizaron mediante el coeficiente de correlación de Spearman, calculado con la función `rcorr` del paquete R `Hmisc` (<https://hbiostat.org/R/Hmisc/>).

Todos los análisis se realizaron con la versión 3.6.2 de R (<https://cran.r-project.org/>).

### 3.18. Instalaciones utilizadas

La mayoría de los trabajos experimentales se realizaron en la Unidad de Microbiología e Inmunología, del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de León. Sin embargo, tanto la identificación mediante MALDI-TOF como las pruebas de microscopía electrónica se realizaron en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León. Las necropsias de los animales se realizaron en la sala de necropsias del Hospital Veterinario de la Universidad de León, a excepción de una de ellas que se realizó en las instalaciones del centro de porcino del ITACyL, en Hontalbilla (Segovia).

Las pruebas con ozono y agua ozonizada en granja, y los muestreos tras la limpieza y desinfección se realizaron en 3 granjas diferentes de Castilla y León, dos de ellas en Guardo (Palencia), y la tercera en Peleas de Arriba (Zamora).

Por último, el experimental *in vivo* con cerdos suplementados con ácido láurico se realizó en una granja de porcino en Mayorga (Castilla y León).

(a)



(b)



**Imagen 13.** (a) Necropsia en sala de necropsias. (b) Muestras obtenidas para posterior aislamiento bacteriano

# 4. RESULTADOS



### 4.1. Cepas obtenidas

Se obtuvieron y analizaron un total de 189 muestras procedentes de diversas localizaciones, durante el periodo 2018-2020, como se describe en “*Material y Métodos*”, procedentes de diferentes localidades de Castilla y León.

Las muestras fueron enviadas por las integradoras o recogidas directamente por nuestro equipo. Se lograron aislar e identificar mediante PCR y/o MALDI-TOF 60 cepas de *Streptococcus suis*, 48 de *Pasteurella multocida*, 18 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, y 5 de *Glaesserella parasuis* pertenecientes a CRP, y de las localizaciones anatómicas correspondientes con la tabla 21. En su mayoría fueron pulmones o hisopos articulares, y no de todas las muestras obtenidas se pudo realizar aislamiento bacteriano.

**Tabla 21:** Localización anatómica de las muestras recibidas, de las cuales se realizaron los aislados bacterianos.

Nº de muestras recibidas		
<b>Pulmones</b>	128	67,7 %
<b>Cráneos con encéfalos</b>	10	5,3 %
<b>Hisopos articulares</b>	22	11,6 %
<b>Lechones enteros</b>	20	10,6 %
<b>Hisopos de líquido cefalorraquídeo</b>	2	1,1 %
<b>Articulaciones completas</b>	7	3,7 %
<b>TOTAL</b>	189	

### Cepas bacterianas obtenidas de las necropsias

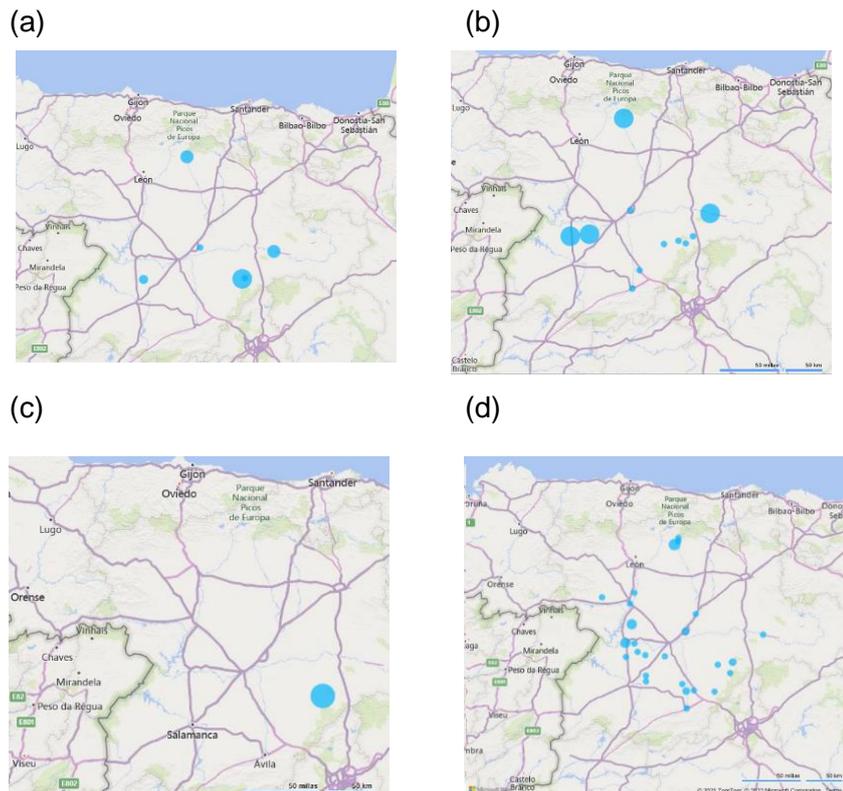
Mediante aislamiento se obtuvieron un total de 18 cepas de *A. pleuropneumoniae*, el 100% de las bacterias se consiguieron aislar de pulmón. En cuanto a la localización geográfica 9 de ellas fueron obtenidas de explotaciones en Segovia, 3 de ellas en Palencia, 3 en Soria, 2 en Zamora y 1 de las muestras de Valladolid.

Respecto a *G. parasuis* obtuvimos 5 aislados, todos ellos aislados de pulmón y de origen en Segovia.

## Resultados

Se consiguieron aislar 48 cepas de *P. multocida*. De los cuales en un 100 % de los casos presentaron tipo capsular A. Casi la mitad de los aislados se obtuvieron en Segovia (22 aislados) 10 de en Valladolid, 8 en Ávila, y los restantes 4 en Soria, 2 en Zamora y 2 Palencia. En este caso todas las muestras fueron aisladas de pulmón.

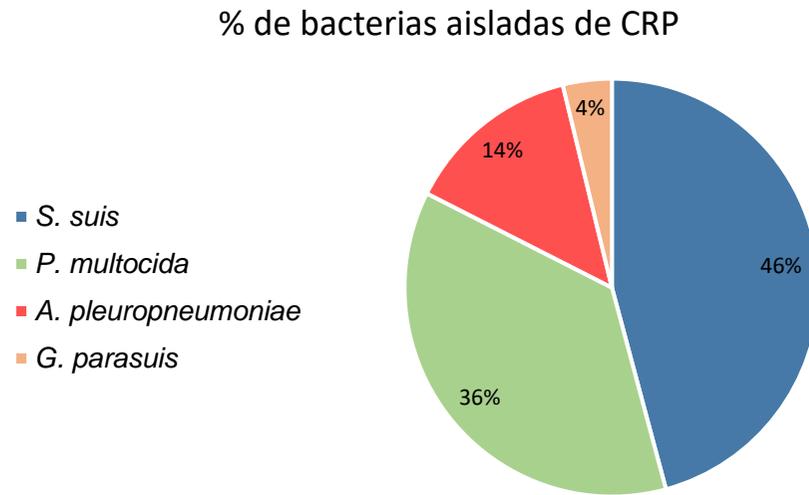
Se obtuvieron un total de 60 aislados de *S. suis*. El serotipo más comúnmente encontrado fue el 9, con 15 aislados (25 % del total), seguido del serotipo 2, con 8 aislados y del serotipo 7, con 8 aislados, representando casi el otro 25 % de la muestra entre ambos. Los serotipos 4 y 8 presentaron 2 aislados cada uno. Los menos comunes fueron los serotipos 16, 18 y 19 con un único aislado. Además, 11 de los aislados fueron catalogados como no tipificables. En cuanto a su localización geográfica más de un tercio de los *S. suis* fueron de Zamora (22 aislados), 9 de Palencia, 8 de Segovia, 5 de Ávila, otros 5 de Valladolid, 4 de León, 3 de Salamanca y 2 de Soria.



**Figura 25:** Mapa de procedencia de los aislados de las diferentes bacterias del CRP. **(a)** *Actinobacillus pleuropneumoniae*, **(b)** *Pasteurella multocida*, **(c)** *Glaesserella parasuis* y **(d)** *Streptococcus suis*

## Resultados

(a)



(b)



**Figura 26. (a)** Porcentaje de bacterias del complejo respiratorio porcino aisladas. **(b).** Mapa donde se localizaron los aislados. En azul oscuro, *S. suis*; en verde, *P. multocida*; en rojo, *A. pleuropneumoniae*, y en naranja, *G. parasuis*

## Resultados

**Tabla 22:** Localización geográfica de las muestras obtenidas.

Especie	Localidad de Origen	Provincia	Muestras	Total
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Sebulcor	Segovia	1	18
	Villamor de los Escuderos	Zamora	2	
	Langa de Duero	Soria	3	
	Renedo	Valladolid	1	
	Cantalejo	Segovia	7	
	Guardo	Palencia	4	
<i>Glaesserella parasuis</i>	Cantalejo	Segovia	5	5
<i>Pasteurella multocida</i>	Valladolid	Valladolid	10	48
	Fuentepelayo	Segovia	3	
	Langa de Duero	Soria	4	
	La Bóveda de Toro	Zamora	1	
	Peleas de Arriba	Zamora	1	
	El Olmillo	Segovia	5	
	San Pedro de Gáillos	Segovia	7	
	Sanchidrián	Ávila	4	
	Cantalejo	Segovia	7	
	Ávila	Ávila	4	
	Guardo	Palencia	2	
<i>Streptococcus suis</i>	Benavente	Zamora	1	60
	Caballar	Segovia	2	
	Cantalejo	Segovia	1	
	Dueñas	Palencia	1	
	Fuentemilanos	Segovia	1	
	Fuentepelayo	Segovia	2	
	Guardo	Palencia	14	
	Intorcisa de la Peña	Palencia	1	
	La Bóveda de Toro	Zamora	3	
	Langa de Duero	Soria	2	
	Nava de Arévalo	Ávila	2	
	Pedroso de la Armuña	Salamanca	1	

## Resultados

**Tabla 22** (continuación)

Especie	Localidad de Origen	Provincia	Muestras	Total
<i>Streptococcus suis</i>	Peleas de Arriba	Zamora	2	60
	Pollos	Valladolid	2	
	San Pedro de Cansoles	Palencia	1	
	Sanchidrián	Ávila	1	
	Uña de Quintana	Zamora	1	
	Valladolid	Valladolid	1	
	Venialbo	Zamora	7	
	Villalazán	Zamora	1	
	Villalba de la Lampreana	Zamora	2	
	Villanueva de Gómez	Ávila	1	
	Villaquejida	León	3	
	Villoruela	Salamanca	2	
	Zamora	Zamora	2	

### Factores de virulencia

Las bacterias más prevalentes fueron *S. suis* y *P. multocida.*, por ello de ambas se estudiaron mediante PCR diferentes genes asociados a la virulencia, mediante PCR.

Respecto a los factores de virulencia analizados en *S. suis*, como podemos observar en la tabla 23, podemos afirmar que el 6,7 % de los aislados presentaron el gen *epf*; un 58,3 % fueron positivos para el gen *mrp*, un 43,3 % para el factor *sly*, un 76,7 % para el gen *luxS* y un 53,3 % para el gen *gapd*. El gen más encontrado en estos aislados ha sido aislado es *luxS* con un 76,6 % de los aislados positivos.

**Tabla 23:** Porcentaje de la prevalencia de cada gen de factores de virulencia presente en el total de aislados de *Streptococcus suis*.

Genes de factores de virulencia de <i>Streptococcus suis</i>					
	<i>epf</i>	<i>mrp</i>	<i>sly</i>	<i>luxS</i>	<i>gapdh</i>
Positivos	6,7 %	58,3 %	43,3 %	76,7 %	53,3 %

## Resultados

Por otro lado, para *Pasteurella multocida* el total de los aislados fueron positivos para el gen *oma87*, (48 aislados). Los genes *hgbA*, *nanH*, *ompH*, *ptfA* y *sodA* tuvieron una positividad del 95,8, seguidos del gen *tonB* con un 83,3 % de casos positivos.

Los genes menos prevalentes fueron el *toxA*, con un 27,1% de los aislados, el *pfhA*, con un 10,4%, y por último el *tbpA* con un 4,1 % (1 aislado).

**Tabla 24:** Porcentaje de la prevalencia de cada gen de factores de virulencia presente en el total de aislados de *Pasteurella multocida*.

	Genes de factores de virulencia de <i>Pasteurella multocida</i>				
	<i>hgbA</i>	<i>nanH</i>	<i>Oma 87</i>	<i>ompH</i>	<i>pfhA</i>
Positivos	95,8 %	95,8 %	100%	95,8 %	10,4 %
	<i>ptfA</i>	<i>sodA</i>	<i>tbpA</i>	<i>tonB</i>	<i>toxA</i>
Positivos	95,8 %	95,8 %	4,1 %	83,3%	27,1%

### PCRs de genes de resistencia frente a antibióticos

Respecto a los genes de resistencia frente a antibióticos analizados en *S. suis*, de los cuatro genes de resistencia estudiados, para las tetraciclinas el gen *tetO* estuvo presente en un 68,3 % de las bacterias, frente al *tetM*, presente únicamente en el 1,7 %. Para el estudio de los genes de resistencia frente a macrólidos *ermB* se encontró en un 46,7 % de los aislados, del total, *MefA/E* estuvo presente en un 8,3 de los aislados.

**Tabla 25:** Porcentaje de la prevalencia de cada gen de resistencia frente a antibióticos presente en el total de aislados de *Streptococcus suis*.

Genes de resistencia frente a antibióticos para <i>Streptococcus suis</i>				
	<i>ermB</i>	<i>MefA/E</i>	<i>tetM</i>	<i>tetO</i>
Positivos	46,7 %	8,3 %	1,7 %	68,3 %

Para *P. multocida*, se han obtenido en general un menor porcentaje de genes de resistencia como podemos observar en la tabla 26. Para las resistencias frente a tetraciclinas un 12,5 % de aislados positivos frente al gen *tetA*, y un 39,6 % para *tetB*. Para la resistencia frente a  $\beta$ -lactámicos el 27,1 % de los aislados presentaron el gen *bla<sub>ROB1</sub>* frente al 8,3 % de los aislados con *bla<sub>TEM</sub>*. Respecto a los macrólidos presentaron una resistencia de un 16,7 % para el gen *ermA*, 41,7 % para *ermC*, 22,9 % para *msrE* y un 0 % para *mphE*.

## Resultados

**Tabla 26:** porcentaje de la prevalencia de cada gen de resistencia de genes de resistencia frente a antibióticos presente en el total de aislados de *Pasteurella multocida*.

Genes de resistencia frente a antibióticos de <i>Pasteurella multocida</i>								
	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>bla<sub>ROB1</sub></i>	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	<i>ermA</i>	<i>ermC</i>	<i>msrE</i>	<i>mphE</i>
Positivos	12,5 %	39,6 %	27,1 %	8,3 %	16,7 %	41,7 %	22,9 %	0 %

### Cepas ambientales obtenidas en las granjas y en camión

#### Aislados bacterianos de origen ambiental en granja

Tras el proceso de toma de muestras, aislamiento e identificación (mejor detallado en el apartado “3.2. Cepas ambientales obtenidas en las granjas y los camiones” de material y métodos) las bacterias encontradas después de los procesos de limpieza y desinfección fueron las siguientes:

- *Acinetobacter johnsonii*
- *Acinetobacter* sp.
- *Alcaligenes faecalis*
- *Arthrobacter polychromogenes*
- *Bacillus subtilis*
- *Corinebacteria falsenia*
- *Escherichia coli*
- *Klebsiella oxytoca*
- *Providencia rettgeri*
- *Pseudomonas fluorescens*
- *Pseudomonas monteilii*
- *Serratia marcescens*
- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus sciuri*
- *Staphylococcus xylosus*

Todas ellas presentaron una puntuación igual o superior a 1,7 mediante la técnica MALDI-TOF, lo que significa una identificación fiable.

### **Aislados bacterianos de origen ambiental en camión**

Tras el proceso de toma de muestras, aislamiento e identificación (mejor detallado en el apartado “3.2. Cepas ambientales obtenidas en las granjas y los camiones” de material y métodos) las cepas obtenidas fueron las siguientes:

- *Acinetobacter schindleri*
- *Aeromona hydrophila*
- *Bacillus cereus*
- *Pseudomonas fluorescens*

Todas ellas presentaron una puntuación igual o superior a 1,7 mediante la técnica MALDI-TOF, lo que significa una identificación fiable.

### **4.2. Resistencias frente a antibióticos**

#### **Determinación de resistencias frente a antibióticos mediante un método comercial (Sensititre®)**

Se decidió utilizar el método Sensititre® por su precisión para la detección de resistencias y sensibilidades frente a antibióticos en estas dos bacterias debido a que los requerimientos para su crecimiento en la placa de 96 pocillos resultaron replicables. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

#### ***Pasteurella multocida***

Se tomaron los puntos de corte establecidos por el CLSI (CLSI VETOS ,2018; CLSI M100, 2018) y con las modificaciones de Vilaró, Novell *et al.* (2020) (ver tabla 27). Los aislados de *P. multocida* fueron en su gran mayoría resistentes a las lincosamidas, en concreto presentaron un 91,6 % de resistencia frente a la clindamicina.

Mostraron también resistencia frente a las sulfamidas, un 55,5 % de aislados resistentes frente al trimetoprima/sulfametazol y un 44,4 % frente a la sulfadimetoxina. La tiamulina, representante de las pleuromutilinas, presentó resistencia en el 35,4 % de los aislados. Para las tetraciclinas se obtuvieron resistencias frente a la clortetraciclina en un 8,33 % de los casos y frente a la oxitetraciclina en un 29,17 %.

Frente al resto de antibióticos a los que fueron resistentes cabe destacar que sus resistencias aparecieron en menos de un 20 % de los aislados. En el caso de los macrólidos se obtuvieron resistencias el 11 % de los aislados para tilosin-tartato, 6,25 %

## Resultados

---

y 0 % para la tilmicosina. Los  $\beta$ -lactámicos obtuvieron bajas resistencias, con ninguna resistencia para el ceftiofur, 12,5 % para la penicilina, y 6,25 % para la ampicilina.

Las familias más sensibles fueron los fenicoles y aminoglucósidos, con un 2 % de resistencias en todos los casos y ninguna resistencia en el caso de la espectinomicina. El enrofloxacino y la tularomicina presentaron un 100% de sensibilidad.

### ***Streptococcus suis***

Se tomaron los puntos de corte establecidos por el CLSI y diversos autores. (CLSI VETOS, 2018; CLSI MIOO, 2018; Vela *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2012; Van Hout *et al.*, 2016; Niemann *et al.*, 2018; Ichikawa *et al.*, 2019; Werinder *et al.*, 2020) (ver tabla 28). Los resultados para todas las muestras se pueden observar mejor en la tabla 28.

Las proporciones más elevadas de resistencia entre los aislados de *S. suis* se han observado para las tetraciclinas con un 95 % y 93,3 % para clortetraciclina y oxitetraciclina, respectivamente.

Dentro de las sulfamidas la sulfadimetoxina presentó un 100% de resistencia, y trimetoprima/sulfametazol con un 38,3 % de bacterias resistentes.

La clindamicina, representante de las lincosamidas, presentó un 60 % de los aislados resistentes.

Para los  $\beta$ -lactámicos obtuvimos resistencias más moderadas, 15 %, 38,3 % y 38,6 % para ceftiofur, penicilina y ampicilina, respectivamente.

Por último, los fenicoles obtuvieron bajas resistencias, con un 16,6% para el florfenicol.

## Resultados

**Tabla 27:** Rango de susceptibilidad a los diferentes antibióticos, CMI<sub>50</sub>, CMI<sub>90</sub> y porcentaje de resistencia de los aislados de *P. multocida*.

		Concentración a la que son sensibles (µg/ml)												256	512	CMI		% resistencia	
		≤ 0,12	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	≥ 64			CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>		
tiamulina	pleuromutilinas				1		4	4	1	25	12						32	64	25,00%
tilosin-tartrato	macrólidos				39	1	4			1	3						16	64	6,25%
tulatromicina							2	9	29	2	6						0,5	8	0,00%
tilmicosina								40			1	2	5				2	64	14,58%
dortetraciclina	tetraciclinas				11	11	6	11	5	4							4	16	8,33%
oxitetraciclina						7	7	1		33							4	16	68,70%
gentamicina	aminoglucosidos				30	14	1	2	1								0,5	2	2,08%
neomicina							44	3	1								2	2	2,08%
espectomicina									36	9	1	1	1				4	16	0,00%
florfenicol	fenicoles		17	21	5	3	1	1									0,5	2	2,08%
ceftiofur	betalactamicos		48														0,12	0,12	0,00%
penicilina			34	8			6										≤ 0,12	16	12,50%
ampicilina				43			2	1			3						0,12	2	6,25%
danofloxacino	quinolonas		38	4	4	1	2										≤ 0,12	0,25	--
enrofloxacino				40	3	4	1										≤ 0,12	0,25	2,08%
sulfadimetoxina	sulfamidas						27	21									29	19	44,40%
trimetoprima/sulfametazol								1	3	12	23	9					2	4	43,70%
clindamicina	lincosamidas																16	32	91,67%

La línea gruesa representa los puntos de corte para cada antimicrobiano, las áreas grises representan los valores fuera de las concentraciones incluidas dentro del método de microdilución en caldo Sensititre®

## Resultados

**Tabla 28:** Rango de susceptibilidad a los diferentes antibióticos, CMI<sub>50</sub>, CMI<sub>90</sub> y porcentaje de resistencia de los aislados de *Streptococcus suis*.

		Concentración a la que son resistentes (µg/ml)											256	512	CMI		% resistencia		
		≤ 0,12	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64			≥ 64	CMI <sub>50</sub>		CMI <sub>90</sub>	
tiamulina	pleuromutilinas			1	6	3	3	12	6	1	29								-
tilosin-tartrato	macrólidos					7	4	2			47								-
tulatromicina						11	2	3			1	4	39						-
tilmicosina								1	1	8	5	1	44						-
clortetraciclina	tetraciclinas					2	1	1	56								8	8	95
oxitetraciclina						1	3	2	54								8	8	93,3
gentamicina	aminoglucosidos			3	6	12	16	20	3	3							>2	16	-
neomicina							5	8	19	6	4	18							-
espectomicina									1	9	9	25	16						
florfenicol	fenicoles			2	1	2	12	33	8	2							>2	>4	16,6
ceftiofur	betalactamicos		34	3	4	6	8	4	1								0,25	>2	15
penicilina			32	5	4	3	7	9									0,25	>4	38,3
ampicilina				38	1	3	3	15									0,25	4	36,6
dano floxacino	quinolonas		3	9	48												1	1	-
enrofloxacino				3	3	37	10										1	2	16,6
sulfadimetoxina	sulfamidas												4	56			256	>256	100
trimetoprima/sulfametazol							37	23									2 / 38	20/60	38,3
clindamicina	lincosamidas			19	5	1	1	8	26								>8	16	60

La línea gruesa representa los puntos de corte para cada antimicrobiano, las áreas grises representan los valores fuera de las concentraciones incluidas dentro del método de microdilución en caldo Sensititre®

### Discos de antimicrobianos para la determinación de resistencias

Para *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Glaesseurella parasuis* se realizó el método de los antibiogramas de disco, ya que los requerimientos en el medio de cultivo y las condiciones de crecimiento en microaerofilia dificultaron la reproductibilidad mediante el método Sensititre.

#### *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Se tomaron los puntos de corte establecidos por el CLSI y EUCAST (CLSI VETOS, 2018; CLSI MIOO, 2018; EUCAST, 2018).

Los aislados de *A. pleuropneumoniae* fueron frecuentemente sensibles para enrofloxacino, con 100 % de los aislados sensibles. Un 77,8 % de los aislados de *A. pleuropneumoniae* fue sensible frente a la colistina. Un 66,7 % de los aislados fueron sensibles a la gentamicina como se puede observar en la tabla 29.

Por otro lado, un 61,1 % fueron sensibles frente a ampicilina y tetraciclina. Un 55,5 % fue sensible al ceftiofur, seguido de un 44,4 % de los aislados sensibles a ciprofloxacino. Por último, un 38,9 % de los aislados fueron sensibles a trimetoprima-sulfametoxazol y eritromicina.

**Tabla 29:** Porcentaje de sensibilidad por los discos de antibiogramas para *A. pleuropneumoniae*.

Antibiótico	Porcentaje de sensibilidad
Ciprofloxacino 5 µg	44,4 %
Ceftiofur 30 µg	55,5 %
Enrofloxacino 5 µg	100 %
Tetraciclina 30 µg	61,1 %
Ampicilina 10 µg	61,1 %
Gentamicina 120 µg	66,7 %
Trimetoprima-sulfametoxazol 25 µg	38,9 %
Eritromicina 15 µg	38,9 %
Colistina 50 µg	77,8 %

## Resultados

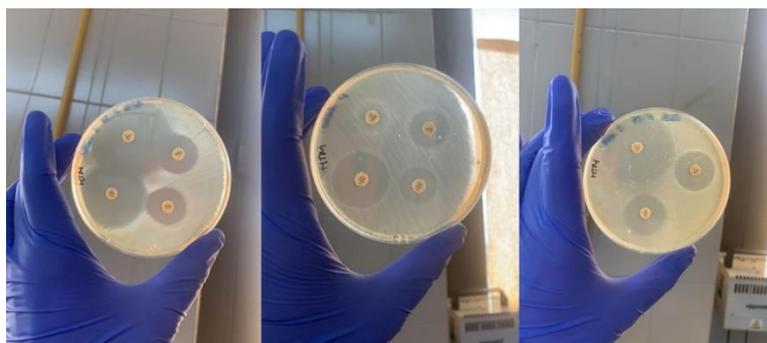
### *Glaesseurella parasuis*

Se tomaron los puntos de corte establecidos por el CLSI y EUCAST (CLSI VETOS, 2018; CLSI MIOO, 2018; EUCAST, 2018). Los porcentajes de las sensibilidades se muestran en la tabla 30.

Finalmente, se determinó la resistencia en los aislados de *Glaesserella parasuis*. El 80 % de los aislados fueron sensibles a ceftiofur, colistina y eritromicina, el 60 % de los aislados fueron sensibles a ceftiofur, ciprofloxacino, gentamicina y trimetroprima-sulfametoxazol. Por último, los aislados obtuvieron un 60 % de resistencias frente a tetraciclina y ampicilina.

**Tabla 30:** Rango de sensibilidad por los discos de antibiogramas para *G. parasuis*.

Antibiótico	Porcentaje de sensibilidad
Ciprofloxacino 5 µg	60 %
Ceftiofur 30 µg	60 %
Enrofloxacin 5 µg	80 %
Tetraciclina 30 µg	40 %
Ampicilina 10 µg	40 %
Gentamicina 120 µg	60 %
Trimetroprima-sulfametoxazol 25 µg	60 %
Eritromicina 15 µg	80 %
Colistina 50 µg	80 %



**Imagen 14:** Discos de antibiograma en *Glaesserella parasuis* mostrando los característicos halos de inhibición, que ponen de manifiesto la sensibilidad frente a los antibióticos probados.

4.3. Resultados frente a los desinfectantes

Ensayos *in vitro*

La actividad desinfectante fue determinada calculando la reducción logarítmica de UFC por ml, tal y como se describió en estudios previos (Best *et al.*, 1988, 1990; Gutiérrez *et al.*, 1995).

Desinfectantes

Estudiando las reducciones logarítmicas pudimos observar que en el 99,999 % de los casos los desinfectantes *CR-36*, *Virkon*, *Yodermina*, *Etanol 70 %*, *Medades Oxi*, *Megades Novo*, *Sanitas Forte*, *Meviforte Plus*, *Despadac*, *Bioplaquen Perox*, *Virobacter*, *Hyprelva net*, *Limoseptic* y *Poliformo* fueron eficaces frente a *G. parasuis* y *A. pleuroneumoniae*. Todos los desinfectantes comerciales mencionadas anteriormente fueron eficaces frente a *S. suis*, y *P. multocida*, a excepción de *Limoseptic* y *Poliformo*, que no funcionaron con tanta eficacia

**Tabla 31.** Capacidad bactericida de los desinfectantes utilizados en granja sobre bacterias del complejo respiratorio porcino. Se toma la solución salina estéril como control positivo.

Desinfectante (Nombre comercial)	UFC después de 1 minuto en contacto con el desinfectante para las siguientes bacterias			
	<i>S. suis</i>	<i>P. multocida</i>	<i>G. parasuis</i>	<i>A. pleuroneumoniae</i>
Limoseptic	2,3 x 10 <sup>3</sup>	5,1 x 10 <sup>2</sup>	0	0
Poliformo	5,7 x 10 <sup>2</sup>	7 x 10 <sup>2</sup>	0	0
Cr-36	0	0	0	0
Virkon	0	0	0	0
Yodermina	0	0	0	0
Etanol 70 %	0	0	0	0
Medades Oxi	0	0	0	0
Megades Novo	0	0	0	0
Sanitas Forte	0	0	0	0
Meviforte Plus	0	0	0	0
Despadac	0	0	0	0
Bioplaquen Perox	0	0	0	0
Virobacter	0	0	0	0
Hyprelva Net	0	0	0	0
Control	2,86 x 10 <sup>8</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>	4,9 x 10 <sup>6</sup>	8,1 x 10 <sup>6</sup>

## Resultados

### Bacterias ambientales

Se realizó el mismo procedimiento experimental que para las bacterias aisladas del complejo respiratorio porcino. Se incluyeron las 4 bacterias ambientales más prevalentes en los aislados de granja y muy comunes en el medio ambiente: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis*.

**Tabla 32.** Capacidad de los desinfectantes utilizados en granja sobre bacterias ambientales fácilmente encontradas en granja. Se toma la solución salina estéril como control positivo.

Desinfectante (Nombre comercial)	UFC después de 1 minuto en contacto con el desinfectante para las siguientes bacterias			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>B. subtilis</i>
Limoseptic	3,1x10 <sup>2</sup>	0	0	0
Poliformo	0	0	0	0
Cr-36	0	0	0	0
Virkon	0	0	0	0
Yodermina	0	0	0	0
Etanol 70 %	0	0	0	0
Medades Oxi	0	0	0	0
Megades Novo	0	0	0	0
Sanitas Forte	0	0	0	0
Meviforte Plus	0	0	0	0
Despadac	0	0	0	0
Bioplaquen Perox	0	0	0	0
Virobacter	0	0	0	0
Hyprelva Net	0	0	0	0
Control	5x10 <sup>7</sup>	2,1x10 <sup>8</sup>	7x10 <sup>7</sup>	4,6x10 <sup>7</sup>

Estudiando las reducciones logarítmicas pudimos observar que en el 99,999 % de los casos los desinfectantes *CR-36*, *Virkon*, *Yodermina*, *Etanol 70 %*, *Medades Oxi*, *Megades Novo*, *Sanitas Forte*, *Meviforte Plus*, *Despadac*, *Bioplaquen Perox*, *Virobacter* e *Hyprelva net* fueron eficaces frente a *E. coli*, *S. aureus*, *P. fluorescens*, ni *B. subtilis*.

Por ello todos los desinfectantes comerciales evaluados fueron eficaces frente a *S. aureus*, *P. fluorescens*, y *B. subtilis*. Frente a *E. coli* el de *Limoseptic* no funcionó en todos los casos, presentando una eficacia inferior a la de los demás comúnmente utilizados en granja.

## Resultados

### Estudio *in vitro* de la desinfección mediante radiación ultravioleta sobre diferentes aislados ambientales.

Los resultados presentados son la capacidad de supervivencia después de exponer a las bacterias a la acción de una lámpara de 60W dotada de 195 LEDs que emitían luz UV. La actividad desinfectante de la radiación ultravioleta fue determinada comparando el crecimiento en el grupo control con los grupos tratados, tal y como describen trabajos anteriores, (Best *et al.*, 1988, 1990; Gutiérrez *et al.*, 1995).

**Tabla 33.** Resultados de la radiación ultravioleta frente a diferentes aislados ambientales.

Microorganismo	Tiempo de exposición	nº de UFC/ml antes	nº de UFC/ml después	Reducción logarítmica	Porcentaje de eficacia
<i>Escherichia coli</i>	15'	1,2 x 10 <sup>9</sup>	6,0 x 10 <sup>8</sup>	0,30	---*
	2 horas	1,3 x 10 <sup>9</sup>	2,1 x 10 <sup>8</sup>	0,79	90,0 %
	4 horas	2,5 x 10 <sup>9</sup>	1,6 x 10 <sup>8</sup>	1,19	90,0 %
	8 horas	1,6 x 10 <sup>9</sup>	1,4 x 10 <sup>9</sup>	0,06	---*
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	15'	1,3 x 10 <sup>8</sup>	1,3 x 10 <sup>8</sup>	0	---*
	2 horas	1,5 x 10 <sup>8</sup>	5,1 x 10 <sup>7</sup>	0,47	---*
	4 horas	3,6 x 10 <sup>8</sup>	3,5 x 10 <sup>8</sup>	0,01	---*
	8 horas	2,25 x 10 <sup>8</sup>	5,0 x 10 <sup>7</sup>	0,65	90,0 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	15'	3,0 x 10 <sup>9</sup>	6,6 x 10 <sup>8</sup>	0,66	90,0 %
	2 horas	5,4 x 10 <sup>9</sup>	3,0 x 10 <sup>8</sup>	1,26	90,0 %
	4 horas	1,0 x 10 <sup>9</sup>	2,1 x 10 <sup>7</sup>	1,68	99,0 %
	8 horas	7,6 x 10 <sup>8</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>	1,80	99,0 %
<i>Bacillus subtilis</i>	15'	2,0 x 10 <sup>8</sup>	1,7 x 10 <sup>8</sup>	0,07	---*
	2 horas	1,2 x 10 <sup>9</sup>	1,2 x 10 <sup>9</sup>	0	---*
	4 horas	4,0 x 10 <sup>8</sup>	2,9 x 10 <sup>8</sup>	0,14	---*
	8 horas	2,2 x 10 <sup>8</sup>	1,6 x 10 <sup>8</sup>	0,14	---*

\*el porcentaje derivado de la reducción logarítmica obtenida no se considera suficientemente eficaz

En las condiciones probadas, con la suspensión salina de las bacterias y posterior tratamiento entre 15 minutos y 8 horas, únicamente se observó una eficacia digna de mención en la reducción bacteriana para el caso de *S. aureus*. En el caso de la bacteria *E. coli* solo se produce algún tipo de reducción destacable después de 2 y 4 horas. Para

## Resultados

*P. fluorescens* se empieza a encontrar eficacia después de 8 horas, existiendo crecimiento bacteriano para 15 minutos, dos horas y cuatro horas. Por último, en el caso de *B. subtilis* en ninguno de los cuatro periodos de tiempo valorados se ha encontrado eficacia.

### Estudio *in vitro* de la desinfección mediante agua ionizada 160 ppm nebulizada sobre diferentes aislados ambientales

Se estudiaron las bacterias Gram positivas *S. aureus* y *B. subtilis*, las bacterias Gram negativas *E. coli* y *P. fluorescens* tratadas con agua ionizada a 160 ppm.

**Tabla 34.** Resultados del agua ozonizada frente a diferentes aislados ambientales.

Bacteria	UFCs antes de la exposición	UFCs después de la exposición	Reducción logarítmica	Eficacia
<i>Escherichia coli</i>	$6,8 \times 10^7$	$5,9 \times 10^5$	2,06	99,0 %
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	$4,2 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	0,04	---*
<i>Staphylococcus aureus</i>	$1,4 \times 10^6$	$2,3 \times 10^5$	0,78	---*
<i>Bacillus subtilis</i>	$3,1 \times 10^6$	$2,7 \times 10^5$	1,06	90,0 %

\*el porcentaje derivado de la reducción logarítmica obtenida no se considera suficientemente eficaz

Respecto a su capacidad de supervivencia después de haberse sometidos a la acción de agua ionizada (160 ppm) nebulizada tres veces a unos 5 cm de distancia y aplicada durante 30 segundo los microorganismos presentaron diversos resultados.

En el caso de *E. coli* se obtuvo un 99 % de eficacia, con una reducción de 2,06 unidades logarítmicas. Para la bacteria *B. subtilis* se obtuvo una eficacia menor, siendo del 90 % y con una reducción logarítmica de 1,06. En el caso de *S. aureus* y *P. fluorescens* la supervivencia de los microorganismos fue mayor, ya que la eficacia no se consideró suficiente para acabar con las poblaciones bacterianas de estos dos microorganismos, aunque en el caso de *S. aureus* a pesar de no obtener la eficacia requerida existió una reducción logarítmica más considerable (0,78) frente a la de *P. fluorescens* (0,04).

## Resultados

### Estudio *in vitro* de la desinfección mediante ozono sobre aislados ambientales

Dentro de esta prueba se valoraron dos concentraciones diferentes de ozono: 1 y 1,5 ppm. En ambos casos, se tomaron 100 litros de aire tanto antes como después de utilizar el equipo biocida “*Total Clean TCL-OZ100UV60*”.

Para el caso de la generación de **1 ppm de ozono**, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- Recuento de bacterias en los 100 litros de aire, antes de la utilización del aparato: 23 colonias en TSA.
- Recuento de bacterias en los 100 litros de aire, después de la utilización del aparato: 16 colonias en TSA.

Existió una reducción de casi el 70 % en el número de colonias en los 100 litros de aire.

En el caso de las bacterias ambientales expuestas a desinfección con ozono a una concentración de 1 ppm de ozono únicamente han existido resultados eficaces para a la bacteria *E. coli*, con un 90 % de eficacia. Para los microorganismos *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* la concentración 1 ppm no fue suficiente como para reducir las colonias bacteriana, por ello la reducción en estos tres casos no fue considerada eficaz, como podemos observar en la tabla 35.

**Tabla 35.** Reducción logarítmica para concentración de 1 ppm.

Bacteria	nº de UFC/ml antes	Nº de UFC/ml después	Reducción logarítmica	Porcentaje de eficacia
<i>Escherichia coli</i>	$2,8 \times 10^7$	$1,0 \times 10^6$	1,45	90,0 %
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	$8,2 \times 10^7$	$5,5 \times 10^7$	0,7	---*
<i>Staphylococcus aureus</i>	$2,5 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$	0	---*
<i>Bacillus subtilis</i>	$9,7 \times 10^7$	$4,9 \times 10^7$	0,30	---*

\*el porcentaje derivado de la reducción logarítmica obtenida no se considera suficientemente eficaz

## Resultados

Para el caso de la generación de **1,5 ppm de ozono**, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- Recuento de bacterias en los 100 litros de aire, antes de la utilización del aparato: 35 colonias en TSA.
- Recuento de bacterias en los 100 litros de aire, después de la utilización del aparato: ninguna colonia en TSA.

Existió una reducción del 100 % en el número de colonias en los 100 litros de aire a 1,5 ppm de ozono, por ello para las bacterias presentes en el aire ha resultado muy eficaz.

**Tabla 36.** Reducción logarítmica para concentración de 1,5 ppm.

Bacteria	UFC/ml antes	UFC/ml después	Reducción logarítmica	Porcentaje deeficacia
<i>Escherichia coli</i>	$9,8 \times 10^7$	$1,7 \times 10^3$	4,76	99,999 %
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	$1,8 \times 10^6$	$2,1 \times 10^2$	3,93	99,99 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	$7,5 \times 10^7$	$2,1 \times 10^2$	5,55	99,9999 %
<i>Bacillus subtilis</i>	$2,3 \times 10^6$	$3,7 \times 10^2$	3,79	99,99 %

\*el porcentaje derivado de la reducción logarítmica obtenida no se considera suficientemente eficaz

En el caso de 1,5 ppm de ozono, para la bacteria *S. aureus* funcionó como un buen desinfectante, con una gran reducción de las colonias y con una eficacia del 99,9999 %.

Para *E. coli* la eficacia de también fue alta, con una reducción de 4,76 unidades logarítmicas, obteniendo un 99,999 % de eficacia.

Para los microorganismos *P. fluorescens* y *B. subtilis* la eficacia fue menor en comparación, pero también fue muy fuerte, obteniendo un 99,99 % de eficacia en ambos casos.

## Resultados

---

### **Estudio *in vivo* de la acción de los desinfectantes en las granjas.**

Según los criterios establecidos por Maertens *et al.* (2018) para muestras obtenidas después de la limpieza y la desinfección se tomando recuentos de 0 UFC como “score” 0, de 1 a 40 UFC como “score” 1, de 41 a 120 UFC como “score” 2, de 121 a 400 UFC como “score” 3, más de 400 UFC como “score” 4, y placas no contables como “score” 5., siendo el “score” 0 muy bueno y el “score” 5 muy malo.

Para cuantificar la puntuación final de higienograma para cada muestreo se realizó una media aritmética para la expresión de los resultados, la cual podemos observar en la tabla 37.

Para las granjas de madres los resultados o “scores” obtenidos después de la limpieza y antes de la desinfección para superficies planas fueron de  $2,3 \pm 0,6$  para suelos, y de  $1,7 \pm 0,7$  para paredes. Los “scores” fueron de  $2,7 \pm 0,7$  en el caso de superficies irregulares en comederos, de  $2 \pm 0,8$  para bebederos y de  $2,7 \pm 0,6$  para las granjas que tuvieron juguetes. Los recuentos después de la desinfección mejoraron, siendo de  $1,7 \pm 0,5$  para suelos y  $1,1 \pm 0,8$  para paredes, respecto a las superficies irregulares también se observaron disminuciones en las UFC, para comederos y bebederos  $1,1 \pm 0,8$  y  $1,2 \pm 0,7$  respectivamente, y  $1,5 \pm 1,2$  en los juguetes.

Observando las medias después de la limpieza obtuvimos  $2,3 \pm 0,6$  para los “scores” de las superficies planas y de  $2,5 \pm 0,8$  para las superficies irregulares, frente a los resultados obtenidos después de la desinfección que fueron de  $1,4 \pm 0,7$  para superficies planas y  $1,1 \pm 0,7$  para las superficies irregulares.

En las 10 granjas de cebo los “scores” obtenidos después de la limpieza y antes de la desinfección para superficies planas fueron de  $3,9 \pm 0,6$  para suelos, y de  $2,8 \pm 0,8$  para paredes. Los “scores” fueron de  $2,8 \pm 0,6$  en el caso de superficies irregulares en comederos, de  $1,9 \pm 0,6$  para bebederos y de  $3,4 \pm 0,6$  para juguetes. Los recuentos después de la desinfección en este caso también mejoraron, siendo de  $2,2 \pm 0,4$  para suelos y  $1,8 \pm 0,8$  para paredes, respecto a las superficies irregulares también se observaron disminuciones en las UFC, para comederos y bebederos  $2,8 \pm 0,8$  y  $2 \pm 0,9$  respectivamente, y  $2,7 \pm 0,5$  en los juguetes.

Observando las medias después de la limpieza obtuvimos  $3,4 \pm 0,9$  para los “scores” de las superficies planas y de  $2,7 \pm 0,8$  para las superficies irregulares, frente a los resultados obtenidos después de la desinfección que fueron de  $2 \pm 0,6$  para superficies planas y  $2,31 \pm 0,9$  para las superficies irregulares.

## Resultados

---

Para las 15 granjas de transición los resultados o “scores” obtenidos después de la limpieza y antes de la desinfección para superficies planas fueron de  $2,7 \pm 1,2$  para suelos, de  $2,2 \pm 1$  para paredes y de  $1,7 \pm 0,5$  para placas calefactoras. Los “scores” fueron de  $1,9 \pm 0,7$  en el caso de superficies irregulares en comederos, de  $1,6 \pm 0,5$  para bebederos y de  $2,6 \pm 0,8$  para las granjas que tuvieron juguetes. Los recuentos después de la desinfección mejoraron, siendo de  $1,9 \pm 0,6$  para suelos, de  $2,2 \pm 1$  para paredes y de  $1,7 \pm 0,5$  para placas calefactoras. Respecto a las superficies irregulares también se observaron disminuciones en las UFC, para comederos y bebederos  $1,4 \pm 0,5$  y  $1,1 \pm 0,8$  respectivamente, y  $1,9 \pm 1$  en los juguetes.

Observando las medias después de la limpieza obtuvimos  $2,2 \pm 1$  para los “scores” de las superficies planas y de  $2 \pm 0,8$  para las superficies irregulares, frente a los resultados obtenidos después de la desinfección que fueron de  $1,9 \pm 0,8$  para superficies planas y  $1,5 \pm 0,7$  para las superficies irregulares.

En el caso de los 3 camiones muestreados se registraron “scores” superiores a 3 para los suelos y barandillas. Las ruedas y las rampas obtuvieron “scores” de entre 1 y 2 en los tres casos. Las mejores desinfecciones estuvieron registradas para las ruedas, con scores de 1, y para las botas con “scores” de entre 0 y 1.

## Resultados

**Tabla 37.** Resultados de los muestreos ambientales en granja.

			GRANJAS de madres	GRANJAS de cebo	GRANJAS de transición
<b>Total</b>			15	10	15
Tras la limpieza y antes de la desinfección (DL)	Corrales muestreados	<i>“score”</i> del muestreo de las superficies planas	$2 \pm 0,7$	$3,4 \pm 0,9$	$2,2 \pm 1$
		<i>“score”</i> del muestreo de las superficies irregulares	$2,5 \pm 0,8$	$2,7 \pm 0,8$	$2 \pm 0,8$
Tras la desinfección (DD)	Corrales muestreados	<i>“score”</i> del muestreo de las superficies planas	$1,4 \pm 0,7$	$2 \pm 0,6$	$1,9 \pm 0,8$
		<i>“score”</i> del muestreo de las superficies irregulares	$1,1 \pm 1$	$2,1 \pm 0,9$	$1,5 \pm 0,7$

#### 4.4. Estudio *in vivo* de la desinfección con ozono y agua ozonizada en las granjas

##### Primer muestreo:

Se valoró la eficacia de **1,2 ppm** de ozono en una superficie de 350 m<sup>3</sup>, sin generación de agua ozonizada, en una granja de transición.

**Tabla 38.** Valoración de 1 ppm de ozono sobre granja.

	Reducción logarítmica	% de eficacia
<b>SALA A</b> desinfección convencional		
COMEDERO	1,280	90 %
BEBEDERO	0,842	---*
SUELO	2,554	99 %
PARED	1,731	90 %
JUGUETE	1,536	90 %
PLACA	1,048	90 %
<b>SALA B</b> desinfección con ozono		
COMEDERO	0,866	---*
BEBEDERO	0,350	---*
SUELO	2,086	99 %
PARED	2,424	99 %
JUGUETE	2,010	99 %
PLACA	1,089	90 %

\*el porcentaje derivado de la reducción logarítmica obtenida no se considera suficientemente eficaz.

Con el desinfectante convencional (SALA A) obtuvimos desinfecciones eficaces al 90 % en comederos, paredes, juguetes y placas calefactoras. Desinfecciones del 99 % de eficacia fueron obtenidas para el caso del suelo. Y desinfecciones que no llegaron a ser significativas para el caso de los bebederos. Por otro lado, para la desinfección con 1,2 ppm de ozono (SALA B) obtuvimos peores resultados en comederos y bebederos, no llegando a un porcentaje de eficacia significativo. Por otro lado, para suelos, paredes, juguetes y la eficacia fue en todos los casos mayor al 99 %, y para la placa calefactora fue del 90 %.

## Resultados

### Segundo muestreo:

Se valoró la eficacia de **1,2 ppm** de ozono en una superficie de 400 m<sup>3</sup>, se generó agua ozonizada y se roció sobre comederos, bebederos y juguetes. En granja de madres.

Se utilizaron 2 lámparas de ozono, 2 sensores, 4 lámparas de ozono, 4 cañones de ozono y ventiladores para que el ozono se distribuyese homogéneamente por toda la sala. También se rociaron comederos y bebederos con agua ozonizada. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

**Tabla 39.** Valoración de 1,2 ppm de ozono y agua ozonizada sobre granja.

	<b>Reducción logarítmica</b>	<b>% de eficacia</b>
<b>SALA A</b> desinfección convencional		
COMEDERO- BEBEDERO	1,797	90 %
SUELO	2,602	99 %
PARED	2,212	99 %
PLACA	1,237	90 %
<b>SALA B</b> desinfección con ozono		
COMEDERO- BEBEDERO	1,603	90 %
SUELO	0,476	---*
PARED	0,490	---*
PLACA	2,576	99 %

\*el porcentaje derivado de la reducción logarítmica obtenida no se considera suficientemente eficaz.

Con el desinfectante convencional (SALA A) se obtuvo una eficacia del 90 % para comederos-bebederos y placas calefactoras, y aún superior (del 99 %) para suelos y paredes. Respecto a la desinfección con ozono a 1,2 ppm y agua ozonizada en comederos y bebederos (SALA B) obtuvimos un 90 % de eficacia en estos mismos, y un 99 % para la placa calefactora. En este caso no funcionó en suelos y paredes, por lo que la reducción logarítmica de las colonias bacterianas no fue lo suficiente como para llegar a una eficacia mínima.

## Resultados

### Tercer muestreo:

Se valoró la eficacia de **1,5 ppm** de ozono en una superficie de 400 m<sup>3</sup>, se generó agua ozonizada y se roció sobre comederos, bebederos y juguetes. En una sala de transición. Se valoró la eficacia de **1,5 ppm** de ozono en una superficie de 360 m<sup>3</sup>, se generó agua ozonizada y se roció sobre comederos, bebederos y juguetes. Se utilizaron 2 lámparas de ozono, 2 sensores, 4 lámparas de ozono, 4 cañones de ozono y ventiladores para que el ozono se distribuyese homogéneamente por toda la sala.

**Tabla 40.** Valoración de 1,5 ppm de ozono y agua ozonizada sobre granja.

	Reducción logarítmica	% de eficacia
<b>SALA A</b> desinfección convencional		
COMEDERO	1,985	90 %
BEBEDERO	2,880	99 %
SUELO	0,113	---*
PARED	2,471	99 %
JUGUETE	0,899	---*
PLACA	1,059	90 %
<b>SALA B</b> desinfección con ozono		
COMEDERO	1,805	90 %
BEBEDERO	2,451	99 %
SUELO	1,884	90 %
PARED	2,660	99 %
JUGUETE	2,598	99 %
PLACA	2,312	99 %

\*el porcentaje derivado de la reducción logarítmica obtenida no se considera suficientemente eficaz.

Con el desinfectante convencional (SALA A) se obtuvo un 90 % de eficacia en comederos y placa calefactora, y un 99 % de eficacia en bebederos y pared. Por otro lado, no se obtuvo una disminución de la carga microbiológica reseñable para suelos y juguetes. En el caso de la desinfección con 1,5 ppm de ozono y agua ozonizada se obtuvieron por lo general mejores resultados, con una eficacia del 90 % para comederos y suelos, y del 99 % para bebederos, paredes juguetes y placas.

## Resultados

### 4.5. Resultados frente a ácidos grasos de cadena media

#### Experimentos basados en difusión

##### Método por difusión en placa

Debido a las características físico-químicas de los ácidos orgánicos existieron problemas con la homogeneidad del medio de cultivo. No se pudieron llevar a cabo dichos experimentos.

##### Método de difusión por disco

Se obtuvieron resultados similares con el ácido láurico para ambas bacterias estudiadas. Cabe destacar que a concentraciones intermedias existe en ambas bacterias una bajada en el halo de inhibición, subiendo a partir de la concentración 700mg/ml.

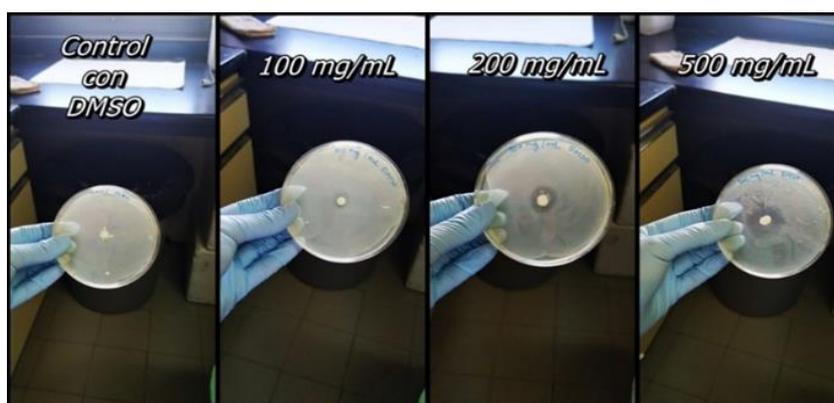
**Tabla 41.** Resultados de ácido láurico en disco de difusión sobre las bacterias *Streptococcus suis* y *Pasteurella multocida*.

Concentración del ácido graso (en mg/ml) al 5 %		Halo de inhibición ± desviación típica (en cm)		Halo de inhibición ± desviación típica (en cm)	
Ácido láurico	50	<i>Streptococcus suis</i>	2,5 ± 0,21	<i>Pasteurella multocida</i>	1,8 ± 0,08
	100		1,5 ± 0,19		1,8 ± 0,11
	200		2 ± 0,12		1,9 ± 0,11
	500		1,4 ± 0,07		1,6 ± 0,12
	700		2 ± 0,11		2 ± 0,09
	900		2 ± 0,13		2,1 ± 0,13
	1500		3 ± 0,13		2,5 ± 0,17
Monolaurina	50	<i>Streptococcus suis</i>	2 ± 0,11	<i>Pasteurella multocida</i>	1,2 ± 0,18
	100		2,5 ± 0,58		1,5 ± 0,16
	200		2,1 ± 0,16		1 ± 0,08
	500		2,8 ± 0,25		1 ± 0,07
	700		2,9 ± 0,12		1,1 ± 0,05
	900		3,2 ± 0,21		1 ± 0,06
	1500		2,5 ± 0,07		1,2 ± 0,08

## Resultados

Para la primera concentración de ácido láurico probada 50 mg/ml al 5 % se obtuvieron halos de inhibición de  $2,5 \pm 0,21$  cm para *S. suis*, frente a los  $1,8 \pm 0,08$  cm para *P. multocida*. Para 100 mg/ml al 5 % se obtuvieron tamaños del halo de inhibición menores en el caso de *S. suis*,  $1,5 \pm 0,19$ , y muy similares a la concentración anterior en el caso de *P. multocida*. Para concentraciones de 200 mg/ml obtuvimos halos de  $2 \pm 0,12$  y  $1,9 \pm 0,11$  para *S. suis* y *P. multocida*, respectivamente. Existió una disminución en el halo en ambos casos para la concentración de 500 mg/ml, ( $1,4 \pm 0,07$  cm para *S. suis* y de  $1,6 \pm 0,12$  para *P. multocida*). Para 700 mg/ml se obtuvieron halos de  $2 \pm 0,11$  cm y  $2 \pm 0,09$  cm para *S. suis* y *P. multocida*, respectivamente. Para 900 y 1500 mg/ml se obtuvieron  $2 \pm 0,13$  y  $3 \pm 0,13$  para el caso de *S. suis*, y de  $2,1 \pm 0,13$  y  $2,5 \pm 0,17$  cm para *P. multocida*.

Respecto a la monolaurina, para la primera concentración del éster probado a 50 mg/ml al 5 % se obtuvieron halos de inhibición de  $2,5 \pm 0,21$  cm frente a la bacteria *S. suis*, en contraposición con los  $1,2 \pm 0,18$  cm para *P. multocida*. Para 100 mg/ml al 5 % se obtuvieron halos de  $2,5 \pm 0,58$  cm para el caso de *S. suis*, y de  $1,5 \pm 0,16$  para *P. multocida*. Para concentraciones de 200 mg/ml obtuvimos halos de  $2,1 \pm 0,16$  y  $1 \pm 0,06$  para *S. suis* y *P. multocida*, respectivamente. En el caso de 500 mg/ml existió una disminución en el halo para *P. multocida*  $1 \pm 0,07$ , la cual se mantuvo en niveles inferiores hasta la concentración final de 1500. No ocurrió lo mismo para *S. suis* ( $2,8 \pm 0,25$ ). Para 700 mg/ml se obtuvieron halos de  $2,9 \pm 0,12$  cm y  $1,1 \pm 0,05$  cm para *S. suis* y *P. multocida*, respectivamente. Para 900 y 1500 mg/ml se obtuvieron  $3,2 \pm 0,21$  y  $2,5 \pm 0,07$  para el caso de *S. suis*, y de  $1 \pm 0,6$  y  $1,2 \pm 0,08$  para *P. multocida*.



**Imagen 15:** Halo de inhibición formado por un ácido orgánico sobre una bacteria de CRP.

## Resultados

### Experimento basado en recuento

Se probaron diferentes concentraciones de ácido láurico en DMSO, añadidas al 5 % en cultivo líquido bacteriano, se incubaron en agitación durante 4 horas más para que el ácido actuase y se realizaron diluciones de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-8}$ , incluyendo un control negativo y un control positivo. Tras la incubación a 37°C en anaerobiosis obtuvimos los resultados de la tabla 42.

**Tabla 42.** Resultados de ácido láurico en medio líquido sobre las bacterias *Streptococcus suis* y *Pasteurella multocida*.

Concentración de ácido láurico al 5 % en cultivo	<i>Streptococcus suis</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	DO <sub>600nm</sub> obtenida
2,5 mg/ml en DMSO	0	$14 \times 10^{-3}$	0,73
5 mg/ml en DMSO	0	$9 \times 10^{-3}$	0,8
25 mg/ml en DMSO	0	0	0,95
40 mg/ml en DMSO	0	0	1,56
50 mg/ml en DMSO	0	0	1,34
200 mg/ml en DMSO	0	0	1,55
500 mg/ml en DMSO	0	0	1,79
700 mg/ml en DMSO	0	0	1,89
900 mg/ml en DMSO	0	0	1,95
1500 mg/ml en DMSO	0	0	2,3
0 mg/ml en DMSO (control)	$4 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	0,56

Debido a la turbidez presentada al adicionar el stock de ácido láurico + DMSO en el cultivo bacteriano la densidad óptica no fue un indicador de crecimiento bacteriano puesto que los ácidos orgánicos la modifican.

Para *Streptococcus suis* para todas las concentraciones de ácido láurico se obtuvo una eficacia del 100 %.

Para *P. multocida* las primeras concentraciones con las que se ensayó este compuesto no se obtuvo inhibición total del crecimiento bacteriano. Estas concentraciones fueron 2,5 mg/ml, 5 mg/ml y 25 mg/ml, las cuales no fueron tan eficaces como las concentraciones 40, 50, 200, 500, 700, 900 y 1500 mg/ml.

### 4.6. Resultados de microscopía electrónica

Mediante MEB observó una disminución en la unión y número de bacterias para las exposiciones a concentraciones de 450 y 900 mg/ml de ácido láurico disuelto en DMSO. Disminución también presente en el número de UFCs en la siembra en cultivo sólido (Ver Imagen 15). Por otro lado, no pudimos observar grandes daños en la pared de las bacterias en contacto con el ácido, pero sí estructuras mucho más alargadas y sin zonas de separación. A simple vista no existe ningún tipo de deformación en la superficie de los aislados bacterianos (Imagen 16), pero sí una disminución en la concentración de bacterias y unas agregaciones más disgregadas.

Debido a las características fisicoquímicas del ácido láurico no se pudieron realizar los cortes de ultramicrotoma, no pudiendo realizarse así los siguientes pasos y ni obtener imágenes de MET a las concentraciones estudiadas.

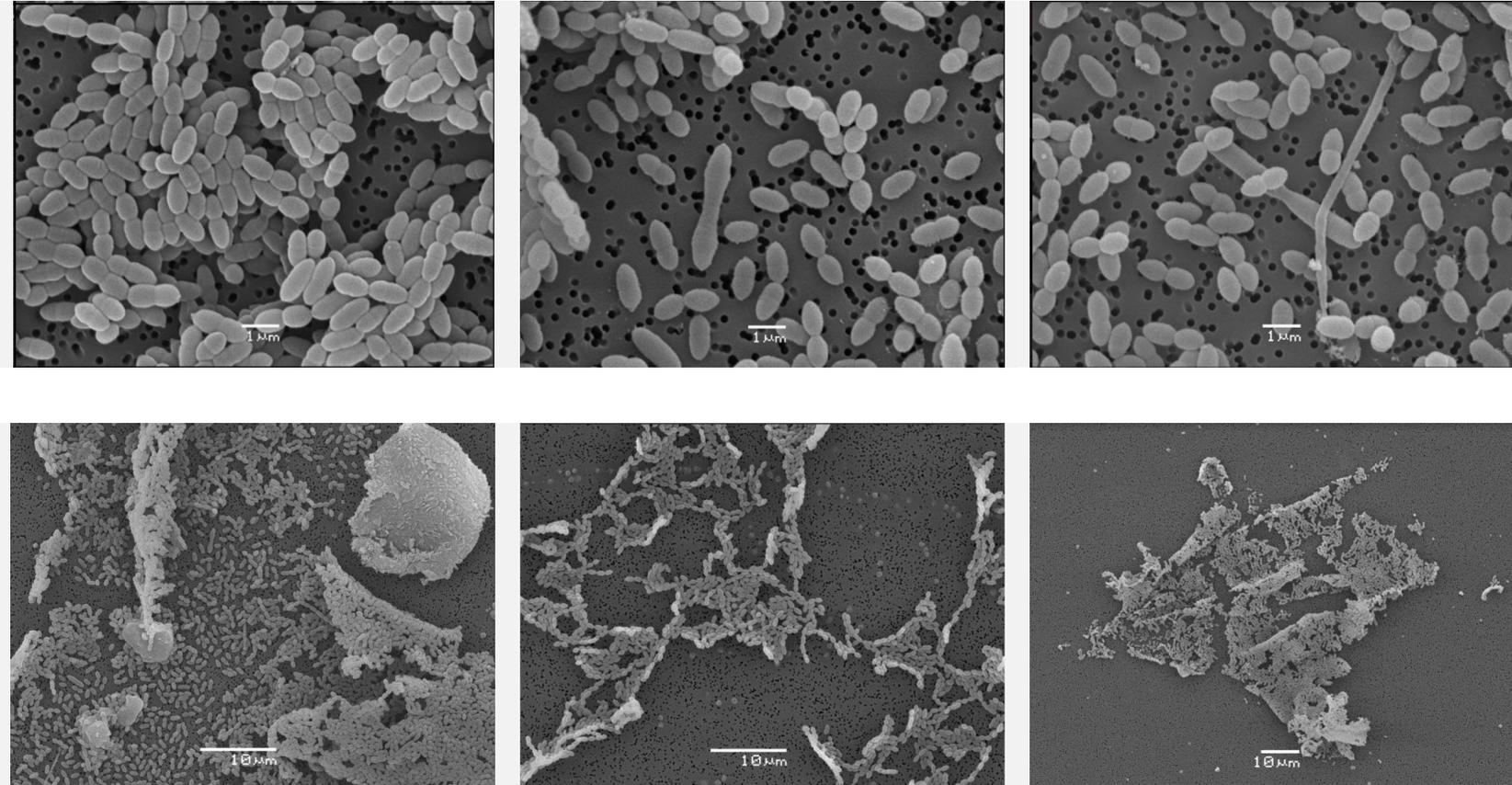
## Resultados

---

Control

22500 ppm de ácido láurico

45000 ppm de ácido láurico



**Imagen 16:** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de *S. suis* a diferentes concentraciones de ácido láurico frente a microscopía de barrido.

### **4.7. Estudio *in vivo* de la actividad del ácido láurico sobre bacterias del complejo respiratorio en ganado porcino.**

Se valoró en un ensayo experimental en granja el efecto de suplementación de la dieta con dos dosis diferentes de ácido láurico. Esta experiencia se llevó a cabo en la etapa de transición sobre un total de 144 lechones destetados (25 días de edad) que se distribuyeron en 6 corrales (24 lechones por corral). Los animales de dos de los corrales recibieron pienso pre-starter y starter sin aditivo (sin antibióticos ni óxido de zinc), grupo control; los animales de dos de los corrales recibieron pienso pre-starter y starter (sin antibióticos ni óxido de zinc) suplementados con 2 kg de ácido láurico por tonelada, grupo 2 kg/t; los animales de dos de los corrales recibieron pienso pre-starter y starter (sin antibióticos ni óxido de zinc) suplementados con 4 kg de ácido láurico por tonelada, grupo 4 kg/t.

Los animales de todos los grupos experimentales fueron pesados individualmente al inicio del seguimiento (día 22 de septiembre de 2021), al cambio de pienso pre-starter a starter (día 7 de octubre de 2021) y antes de pasar al cebadero (día 4 de noviembre de 2021) (Figura 27). Adicionalmente, se anotó el consumo de pienso para cada uno de los corrales en las fechas en que se realizaron los muestreos y se tomaron muestras de heces e hisopos nasales de 10 lechones elegidos al azar con el fin de llevar a cabo un seguimiento del microbiota tanto digestiva como nasal. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 43.

Los valores de ganancia media diaria (GMD) durante los 43 días del experimento fueron de 0,307 kg para cada animal del grupo control, de 0,305 kg para cada animal del grupo 2 kg/t y de 0,322 kg para cada animal el grupo 4 kg/t, valores muy similares, aunque algo más elevados en el grupo que recibió la dosis más alta de ácido láurico. El consumo de pienso fue más elevado en el grupo control (28,64 kg/cerdo) en comparación con los grupos que recibieron ácido láurico (grupo 2 kg/t: 27,17 kg/cerdo y grupo 4 kg/t: 27,48 kg/cerdo). Finalmente, el índice de conversión mostró una leve mejoría (más pienso convertido en kilo productivo) en el grupo que recibió 4 kg/t (2,02) frente al grupo control (2,29). Las diferencias no alcanzaron significación estadística.

En lo que respecta a la mortalidad y morbilidad durante el periodo de seguimiento, no se observaron diferencias entre los grupos suplementados con ácido láurico y el grupo control, siendo muy limitada la incidencia de procesos patológicos.

## Resultados

Resultados obtenidos tras la suplementación del pienso con dos dosis de ácido láurico (2 kg/t y 4 kg/t) durante la etapa de transición. El periodo 1 corresponde a las semanas 1 y 2 tras el destete (pienso pre-starter) y el periodo 2 a las semanas 3 a 6 tras el destete (pienso starter). El pienso empleado en los tres grupos fue el mismo, con la única diferencia del suplemento de ácido láurico, y no incluyó antibióticos ni óxido de zinc.

**Tabla 43.** Índices paramétricos en los tres grupos a lo largo del experimento. Se expresa la GMD en kilos, con media y la desviación típica, el consumo de pienso por corral durante los dos intervalos estudiados en kilos, y el índice de conversión como la transformación de alimento a masa corporal.

Grupo	Ganancia Media Diaria (kg)			Consumo de pienso total por corral (kg)			Índice de Conversión Media		
	Periodo		Total	Periodo		Total	Periodo		Total
	1	2		1	2		1	2	
Control	0,033 (0,02)	0,18 (0,03)	0,213 (0,07)	140	1120	1260	1,65	2,41	2,29
2 kg/t	0,030 (0,02)	0,198 (0,05)	0,228 (0,07)	130	1120	1250	1,69	2,19	2,12
4 kg/t	0,037 (0,02)	0,205 (0,04)	0,242 (0,07)	144	1120	1264	1,52	2,11	2,02

La riqueza de especies bacterianas fue más alta en el caso de la microbiota fecal (figura 27 (a)) que en la microbiota respiratoria, esta última fue incrementando a lo largo del tiempo obteniendo valores más altos en el último muestreo. Respecto al estudio de diversidad de especies se analizó mediante el índice de diversidad de Simpson (figura 27 (b)), observando tanto las especies bacterianas en la microbiota, así como su abundancia relativa. En este caso cuanto más próximo obtuvimos a 1 mayor probabilidad de dominancia de una población, y cuanto más bajo se este índice mayor diversidad bacteriana existe.

En el caso de la microbiota fecal este índice fue disminuyendo a lo largo del tiempo, con lo cual las especies bacterianas fueron siendo más variadas a lo largo del tiempo. La microbiota nasal fue aumentando el índice de Simpson a lo largo del tiempo.

## Resultados

---

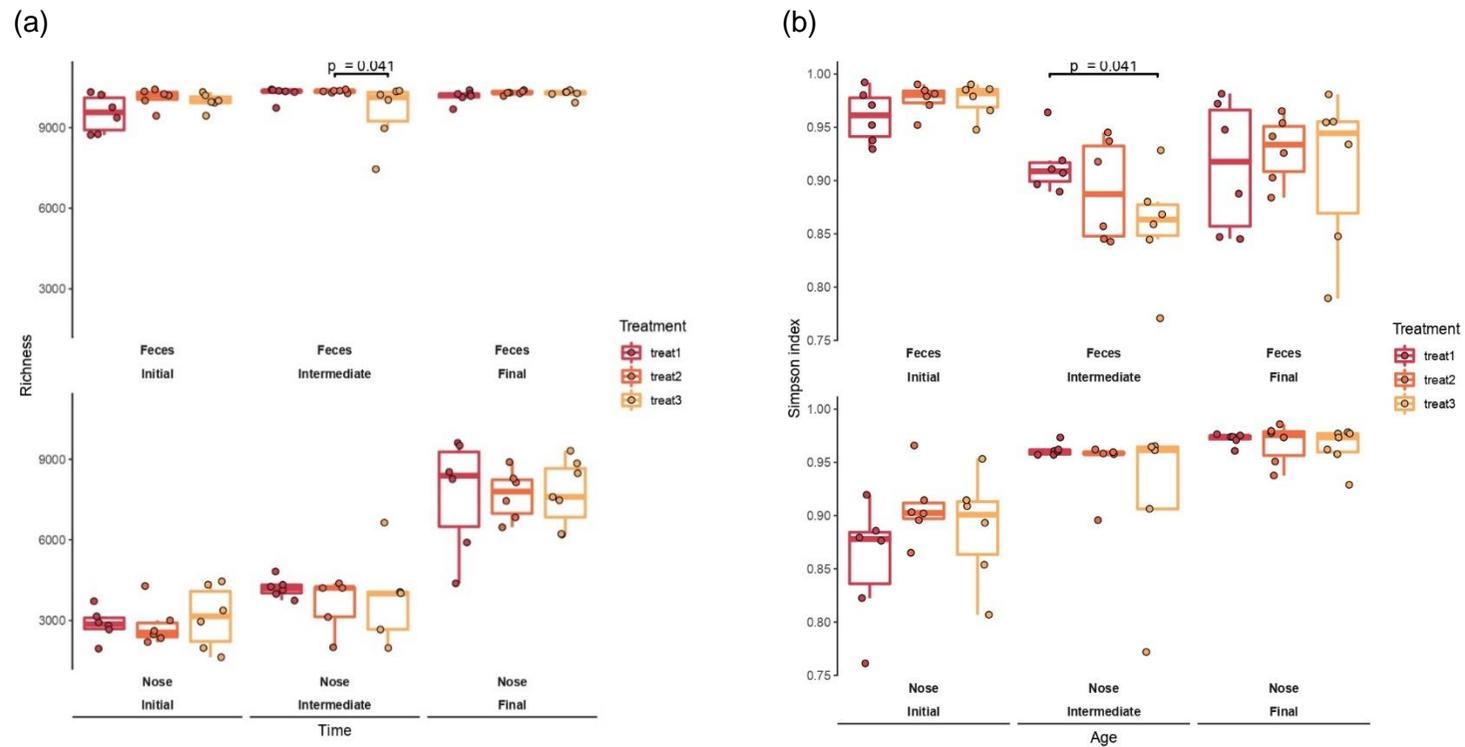
como podemos observar, podemos decir que la diversidad de especies en este caso fue asentándose y disminuyendo a lo largo del tiempo.

Para el análisis de componentes principales del análisis de la microbiota nasal se observó una segregación de las bacterias nasales en función de la edad de los cerdos. Viendo diferencias entre especies como podemos observar en la figura 28(a). Respecto a la taxonomía fecal se observa hay una segregación de las bacterias fecales en función de la edad de los cerdos, entre el estadio final e inicial, pero no se observa diferencia clara con el estadio intermedio y final figura 28 (b).

Como podemos observar más detalladamente en el *anexo 3* los géneros y especies de las bacterias más abundantes identificadas en la microbiota nasal fueron *Clostridioides difficile*, que apareció mayoritariamente durante los dos primeros muestreos a los cerdos. *Bergeyella zoohelcum*, la cual apareció sobre todo en el primer y último muestreo. Bacterias que aparecieron durante todo el muestreo, pero sobre todo tras los 43 días que duró el ensayo experimental fueron *S. suis*, *G. parasuis*. Por último, fueron identificados varios integrantes del género *Prevotella* y *Moraxella* (*Prevotella sp.*, *Prevotella copri*, *Prevotella stercorea*, *Moraxella sp.*, *Moraxella porci*, *Moraxella boevrei*, *Moraxella lacunat* y *Moraxella pluranimalium*) durante todo el ensayo experimental.

Por otro lado, la tras el análisis de la microbiota fecal obtuvimos diversos integrantes del género *Prevotella*, sobre todo en los lechones que llevaban consumiendo el pienso suplementado tras los 14 días iniciales del experimento. La bacteria *E. coli* aparece en gran cantidad, pero sobre sobre todo al principio del experimento, podría haber sido desplazada por *Prevotella*. También hemos encontrado en cantidades significativas a *Ruminococcus*, el cual encontramos sobre todo en los lechones alimentados 43 con la máxima dosis de ácido láurico El género *Clostridium* fue variando a lo largo de tiempo, así como *Bacteroides fragilis*. Para más información sobre la evolución de los microorganismos en el tiempo se puede consultar el *anexo 4*.

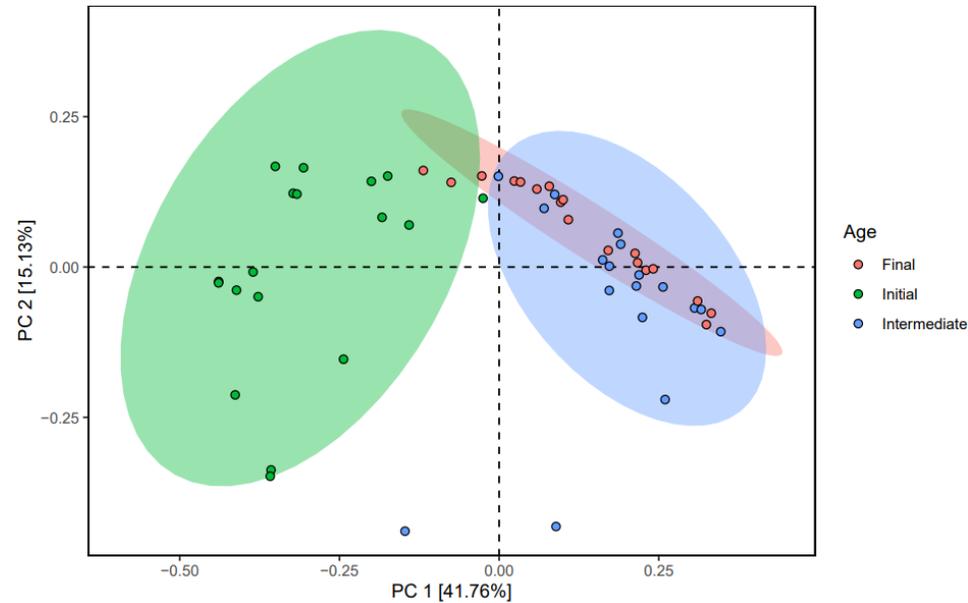
## Resultados



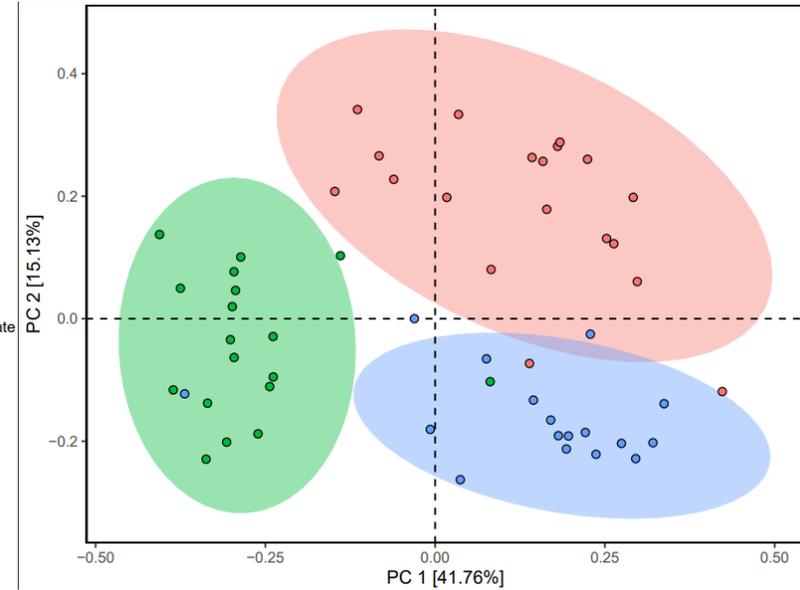
**Figura 27:** (a) Riqueza de la microbiota nasal y fecal, donde se representa la abundancia de bacterias durante los tres tiempos. En rojo las bacterias en los animales control, en naranja para la suplementación de 2 kg/T de ácido láurico en pienso y en rojo para 4 kg/T. (b) Índice de Simpson o índice de diversidad de la microbiota nasal y fecal, donde se representa la abundancia de bacterias durante los tres tiempos. En rojo las bacterias en los animales control, en naranja para la suplementación de 2 kg/T de ácido láurico en pienso y en rojo para 4 kg/T.

## Resultados

(a)



(b)



**Figura 28:** Los ejes muestran los primeros dos componentes principales del análisis (a) Análisis de componentes principales del análisis de la microbiota nasal, donde el azul representa las bacterias identificadas en el muestreo inicial, el verde en el tiempo intermedio y el rojo en el momento final. (b) Análisis de componentes principales del análisis de la microbiota fecal, donde el azul representa las bacterias identificadas en el muestreo inicial, el verde en el tiempo intermedio y el rojo en el momento final.

## Resultados

---

# 5. DISCUSIÓN



Hoy en día las prácticas y reglamentos que recomiendan reducir el uso de antibióticos y eliminar su mala utilización son un pilar fundamental para el desarrollo de un futuro sostenible en salud humana y sanidad animal. Las limitaciones vigentes en el empleo de estos antimicrobianos son medidas que ya vienen aplicándose desde las últimas décadas, normativas que evolucionan con el paso del tiempo, requiriendo de nuevas estrategias que permitan moderar el consumo de antibióticos, reservándolo en todo caso para situaciones críticas donde realmente su utilización sea necesaria (Omonijo *et al.*, 2018). Teniendo una visión global de esta problemática, una disminución en el uso de antibióticos en producción animal ayuda a evitar estas resistencias, mejorando así también la salud humana. Consecuentemente, esta disminución en el uso de antibióticos se traduce en un descenso en las pérdidas económicas de muchas explotaciones porcinas.

En la lucha contra las resistencias frente a los antibióticos la primera línea de defensa se basa en el conocimiento de los patógenos a los que nos enfrentamos, en este caso en concreto, bacterias del CRP. Con el fin de conocer el estado de las RA en las granjas seleccionadas se realizó un estudio del perfil de resistencias de las bacterias obtenidas frente a antibióticos. Esta aproximación representativa y extrapolable permitió conocer el estado actual en el que se encuentran las granjas de Castilla y León.

Como medidas alternativas y cada vez más en auge surgen la utilización de otros antimicrobianos no antibióticos como los ácidos grasos de cadena media, también las mejoras en el manejo y bioseguridad de las explotaciones ganaderas, donde la limpieza y desinfección juegan un papel fundamental, ya que ayudan a mantener la presión de transmisión de enfermedades tan baja como sea posible e impidiendo los ciclos de transmisión de los patógenos (Laanen *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2019).

### **5.1. Resistencia frente a antibióticos y perfil virulento de las cepas obtenidas mediante necropsia**

Los aislados de *S. suis* fueron mayoritariamente de los serotipos 9, 2 y 7, representando el 50 % de los aislados, cifras similares a las publicadas anteriormente por Petrocchi-Rilo *et al.* (2021) en España, dos de los tres serotipos mayormente encontrados en las 207 bacterias estudiadas fueron el 2 y el 9, representando más de un 40 % del total. Según Goyette-Desjardins *et al.* (2014) el serotipo 2 fue el más frecuentemente encontrado en porcino y humano a nivel global. En los últimos años, el serotipo 9 se está convirtiendo en uno de los más prevalentes en Europa (Schultsz *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2018).

## Discusión

---

Respecto a los factores de virulencia analizados en *S. suis*, los genes *luxS*, *mrp* y *gapdh* se encontraron con bastante facilidad en los aislados, con cifras que se asemejan a las de otros estudios realizado en nuestro país. Para el gen *sly* las cifras fueron bastante más bajas que las anteriores encontradas en Castilla y León y el resto de España (6,7 %), cifras más cercanas a las encontradas en las cepas aisladas en jabalíes (Schultsz *et al.*, 2012; Sánchez del Rey *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2018; Petrocchi-Rilo *et al.*, 2021).

En relación con los genes de resistencia frente a los antibióticos analizados en *S. suis*, de los dos genes estudiados para las tetraciclinas, el gen *tetO* obtuvo una alta prevalencia (presente en un 68,3 % de las bacterias) en comparación con el otro gen estudiado, el *tetM*, presente únicamente en el 1,7 %. Caso completamente inverso al estudio realizado en China en 2018, donde el gen *tetM* fue mucho más abundante (72,2 %) que el *tetO* (27,2 %). Por tanto, los datos fueron muy divergentes en comparación con los aislados chinos. Estas cifras fueron muy similares a las encontrados en España (Yuet *et al.*, 2018; Petrocchi-Rilo *et al.*, 2021). Para el estudio de los genes de resistencia frente a macrólidos, el *ermB* se encontró en un 46,7 % de los aislados. Este gen presenta regiones transferibles entre *S. suis* de diferentes serotipos, siendo un potencial gen de transferencia horizontal. Por último, el gen *MefA/E*, relacionado también con las resistencias a macrólidos, estuvo presente en un 8,3 % de los aislados, lo no es de extrañar, ya que otros autores han obtenido resultados similares en *S. suis* resistentes a macrólidos, sugiriendo que las resistencias en estos casos ocurren mediante otros genes (Blondeau y Fitch, 2019; Bamphensin *et al.*, 2021; L. Chen *et al.*, 2021).

En la práctica, es decir, en cuanto a su resistencia real frente a los antibióticos, estos aislados tuvieron las proporciones más elevadas frente a las tetraciclinas y sulfamidas (sulfadimetoxina). A diferencia de esta tesis, en el estudio publicado en distintas regiones de Tailandia para *S. suis*, se comprobó que el tratamiento con ceftiofur o con florfenicol no provocó mayores resistencias entre aquellos aislados. En el mismo estudio, pero comparando los valores de la gentamicina y enrofloxacino, existieron cifras similares a las de esta tesis, que podrían indicar la difusión genes relacionados con la resistencia. Paradójicamente, a diferencia de lo ocurrido en nuestro estudio, en el que las resistencias frente a los macrólidos y las tetraciclinas fueron inferiores al 5 % en su investigación (Yongkiettrakul *et al.*, 2019) detectaron una gran cantidad de resistencias de los aislados de *S. suis* frente a estas dos familias, lo que también ocurrió en la

## Discusión

---

investigación de Moreno *et al.* (2016), atribuible con toda probabilidad al consumo excesivo de estos antibióticos y a la selección consiguiente de las resistencias.

En una investigación comparativa realizada en el Reino Unido en 2013-2014 en relación con 2009-2011, se detectaron incrementos en los niveles de resistencia de las cefalosporinas, quinolonas fluoradas, pleuromutilinas y sulfonamidas (Hernández-García *et al.*, 2017), datos que podrían concordar en cierto grado con los porcentajes de resistencia medidos en nuestro caso para estos antibióticos. Por último, en un muestro llevado a cabo en Holanda entre 2013 y 2015, los resultados recogidos para la ampicilina, ceftiofur, enrofloxacino, florfenicol, penicilina y clotrimoxazol fueron completamente diferentes a los obtenidos en esta tesis, con porcentajes de resistencias inferiores al 1 %, excepto en el caso de esta última combinación, que ascendió al 3,0 % (van Hout *et al.*, 2016). Este dato seguramente revela la menor presión sufrida en el uso de estos antibióticos por los cerdos en la industria porcina holandesa.

Para *Pasteurella multocida*, el 100 % de los aislados presentaron el tipo capsular A, lo que es un dato demasiado llamativo ya que existen resultados similares en otras investigaciones españolas sobre bacterias del complejo respiratorio porcino, con un 79 % de aislados positivos frente al tipo capsular A (García *et al.*, 2011), y en Castilla y León otro estudio reportó un 96,9 % de los aislados con el tipo capsular A (Petrocchi-Rilo *et al.*, 2018). El tipo capsular A, compuesto principalmente por ácido hialurónico, juega un papel fundamental en la resistencia de los microorganismos frente a la fagocitosis, debido a la inhibición que ejerce sobre la fagocitosis de los neutrófilos del hospedador. (Chung *et al.*, 2001).

Desde la primera secuenciación del genoma de *P. multocida* se pudo observar que gran parte estaba destinado a la producción de factores de virulencia, siendo estos genes objeto de estudio (May *et al.*, 2001; Boyce *et al.*, 2012; Cuevas Gómez, 2020). En la presente tesis doctoral se estudiaron 10 factores de virulencia comúnmente presentes en *P. multocida*, con el fin de conocer un poco mejor la patogenicidad de las cepas aisladas.

En cuanto a los valores sobre los genes que codifican proteínas la membrana externa (*ompH* y *oma87*), en comparación con la tesis realizada en España en 2020 por Cuevas en el que se analizaron los factores de virulencia de 41 aislados de *P. multocida* en cerdo, los resultados fueron superiores para el gen *omA87*, para el cual en nuestro estudio encontramos la totalidad de los aislados positivos, frente a ellos que encontraron la mitad. Para el gen *oma87* obtuvimos resultados muy altos en ambos casos, rozando

## Discusión

---

el 100 % en nuestro caso, y obteniéndolo en el suyo. En relación con a las fimbrias y adhesinas *ptfA* y *pfhA* nos ocurre un hecho similar al de las proteínas de exterior de membrana, uno de los genes, el *ptfA*, aparece en el 95,8 de los aislados, cifra muy cercana al 100 % encontrado por Cuevas. Para *pfhA* los datos cambian bastante, encontrándolo únicamente en el 10 % de los aislados, y en el 80,5 % de los estudiados por Cuevas, este gen regula la expresión la adhesión bacteriana (Cuevas *et al.*, 2020).

Para las sialidasas y superóxido dismutasas *nanH* y *sodA* obtuvimos valores muy similares para el gen *nanH*, y completamente distintos para *sodA* (95,8 % en nuestro caso frente ningún aislado positivo en otro estudio realizado en España en 2020). El gen *sodA* protege a *P. multocida* de ser fagocitada por los macrófagos y neutrófilos, protegiéndola de los radicales libres generados por las células del sistema inmune, permitiendo el desarrollo de la enfermedad al hospedador (Verma *et al.*, 2013; Cuevas *et al.*, 2020).

En relación con factores de virulencia relacionado con el metabolismo transporte del hierro los resultados para los genes *tbpA* y *hgbA* fueron muy similares que los encontrados India en 2014. También relacionado con el transporte del hierro, el sistema *tonB*, encargado de suministrar la energía para realizar el transporte de hierro transmembrana, se encontró en un 83,3 % de nuestros aislados, cifra superior a los 37,8 % encontrados en el estudio publicado por Cuevas en España (Sarangi *et al.*, 2014; Cuevas *et al.*, 2020; Bamphensin *et al.*, 2021).

La toxina dermonecrótica *toxA* es muy prevalente en el tipo capsular D de *P. multocida*, pero con cierta facilidad puede aparecer en bacterias con tipo A, es la responsable de la atrofia de los cornetes nasales de los cerdos, causando rinitis atrófica progresiva. La encontramos en un 27,1 % de los aislados. Comparando los resultados con otro estudio realizado en España, en el cual obtuvieron un 0 % de sus aislados con el gen, podrían explicarse observando que el 100 % de los aislados presentaron tipo A y los estudiados por Cuevas fueron todos del B (Runnels, 1982; Confer, 1993; Petersen *et al.*, 2001; Cuevas *et al.*, 2020).

En relación con los genes de resistencia frente a tetraciclinas, la detección del gen *tetB* fue similar al de la investigación realizada por San Millán *et al.* (2007). En esta tesis se ha encontrado una mayor frecuencia del gen *tetB* (San Millan *et al.*, 2007; Oh *et al.*, 2019), no solo en *P. multocida* sino también en otros miembros de la familia *Pasteurellaceae*, como *A. pleuropneumoniae* y *Glasserella parasuis*. La presencia del gen *tetB* sugiere que el mecanismo subyacente a la resistencia a las tetraciclinas

involucra proteínas de bomba de eflujo que expulsan estos compuestos fuera de las bacterias, lo que provoca la inactividad de las tetraciclinas contra *P. multocida* (Blanco *et al.*, 2006; San Millan *et al.*, 2007; Furian *et al.*, 2016).

Respecto a los genes de resistencia frente a  $\beta$ -lactámicos, el gen *bla<sub>ROB1</sub>* obtuvo resultados un poco más elevados a los obtenidos en otro estudio también realizado en España en los años 2017 y 2018, con un 12,5 % de aislados positivos frente al 27,1 % de obtenidos en la presente tesis doctoral. Por último, comparando la prevalencia del gen *bla<sub>TEM1</sub>* con un estudio realizado en Australia, se obtuvo una mayor prevalencia de este gen en España (20 % en a 0 % en Australia). Estos datos pueden sugerir que quizás los genes de resistencia frente a estos antibióticos estén en aumento en granjas españolas (Dayao *et al.*, 2016; Petrocchi-Rilo *et al.*, 2018).

Por último, los genes de resistencia frente a macrólidos, obtenidos en esta tesis doctoral para *P. multocida*, fueron de los más diverso: *mrsE* apareció en un 22,9 % de los aislados, mientras que *mphE* no apareció en ningún aislado. Los genes *ermA* y *ermC*, responsables de la resistencia frente a eritromicina fueron positivos respectivamente en 16,7 % y 41,7 % de las bacterias estudiadas, cifras mayores a las encontradas en Australia, en la que no se encontró ningún aislado positivo para *ermA* ni *ermC* (Dayao *et al.*, 2016).

Curiosamente, un único aislado de *P. multocida* entre los 48 analizados resultó resistente a la amoxicilina, en un estudio llevado a cabo en España en 2018, mientras que un 40,6 % de los aislados fueron resistentes a la ampicilina (Petrocchi-Rilo *et al.*, 2018). Un comportamiento similar se describe en España desde hace 30 años para el ceftiofur, casi cuando fue aprobado para el tratamiento de las enfermedades respiratorias porcinas (Goys *et al.*, 1983; Kehrenberg *et al.*, 2001).

Las tasas de resistencia a las tetraciclinas en esta tesis doctoral, en comparación con las obtenidas en España en 2018, fueron casi cuatro veces superiores para la oxitetraciclina, y casi tres veces más altas para la doxiciclina. El enrofloxacino y la marbofloxacina se comportaron como dos de los antibióticos más efectivos *in vitro* contra los aislados de *P. multocida*, al igual que sucedió en el estudio anteriormente mencionado (Petrocchi-Rilo *et al.*, 2018). Aun así, una de las cepas fue resistente al enrofloxacino, porcentaje muy inferior al 22,5% encontrado para esta fluoroquinolona en Brasil (Oh *et al.*, 2019). El florfenicol es un antibiótico utilizado exclusivamente para el tratamiento de las neumonías causadas por *P. multocida*. Este compuesto fue activo contra los 48 asilados bacterianos. La tiamulina es un antibiótico utilizado en el

## Discusión

---

tratamiento de diversas infecciones en cerdos, y propuesto para combatir infecciones de las *Pasteurellaceae* (Dayao *et al.*, 2016a). En nuestro estudio obtuvo un 25 % de resistencia frente a este antibiótico, aunque la resistencia fue inferior a las reportadas hace dos décadas, lo que desaconseja su uso frente a neumonías causadas por *P. multocida* (Vera Lizarazo *et al.*, 2006).

Los macrólidos mostraron muy buenos resultados, con solo un aislado resistente a la tilmicosina. Se encontraron tasas de resistencia bastante similares en España durante los últimos 30 años (Vera Lizarazo *et al.*, 2006). Los resultados no fueron tan buenos para la eritromicina, la cual demostró una ineficacia sustancialmente mayor (12,5%) (Petrocchi-Rilo *et al.*, 2018).

Para *A. pleuropneumoniae*, agente etiológico de la pleuroneumonía, cuyo tratamiento con antibióticos eficaces ha recaído en la utilización de pleuromutilinas, tetraciclinas y quinolonas fluoradas, puede denotarse una cierta resistencia frente a ciprofloxacino y enrofloxacino (55,6 %), trimetoprima-sulfametoxazol y eritromicina (61,1 % de aislados resistentes). Sin embargo, todas las cepas analizadas resultaron sensibles frente a la acción de bloqueo de la inhibición de las girasas bacterianas, promovida por el enrofloxacino, el cual se encuentra en la categoría B, o de uso restringido.

También fueron muy sensibles frente a la colistina (categoría B) y gentamicina, la cual se encuentra en la categoría C, pudiendo ser utilizada con precaución. En otro estudio desarrollado en España, se midió el cambio en la sensibilidad de aislados españoles a lo largo del espacio comprendido entre 1987-1988 y 1997-2004. Contrariamente a lo detectado en la investigación actual, se apreció un incremento de las resistencias frente a las tetraciclinas, así como frente a una quinolona no fluorada, el ácido nalidíxico, ya que la enrofloxacina no fue valorado. Todos estos resultados aconsejaron el mantenimiento de una vigilancia continua de los patrones de sensibilidad, para controlar los incrementos de las resistencias en este destacado patógeno porcino (Gutiérrez-Martín *et al.*, 2006; Michael *et al.*, 2018).

Por último, para *G. parasuis*, bacteria causante de la enfermedad de Glässer, el 60 % de las bacterias fueron resistentes a las tetraciclinas y ampicilina, antibióticos de los grupos D y C respectivamente, los cuales se pueden utilizar con cautela y precaución. La eritromicina, entre los antibióticos del grupo C, y la colistina del grupo B, mostraron los mejores valores de eficacia, siendo sensibles para más de un 80 % en ambos casos.

En un estudio alemán realizado para 123 aislados de *Glaesserella parasuis* en 2018, se obtuvo que las MIC<sub>90</sub> más bajas fueron para los antibióticos ciprofloxacina y enrofloxacino, antibióticos del grupo B, en nuestro caso las resistencias frente a estos antimicrobianos fueron del 40 %. En el estudio realizado en Alemania para las ampicilinas y penicilinas se obtuvieron valores similares a los de esta tesis. Al igual que ocurrió para las tres bacterias anteriormente estudiadas, los resultados aconsejaron el mantenimiento de una vigilancia continua de los patrones de resistencia antibiótica (Brogden *et al.*, 2018).

### 5.2. Desinfectantes

La bioseguridad es esencial para combatir la transmisión de enfermedades infecciosas; por ello, en ganadería porcina una medida que ayuda a mejorarla es la puesta en marcha de protocolos de limpieza y desinfección, en los cuales se respeten los tiempos de espera entre secados y lotes se, dando como resultado la rotura del ciclo de transmisión de las enfermedades entre lotes de animales (Amass y Clark, 1999; Hurd *et al.*, 200; Dewulf, 2014).

Tomando como los resultados de esta tesis doctoral y los descritos en la bibliografía podemos seguir apoyando la bioseguridad como herramienta estrella para la disminución de enfermedades, y con ello, del uso de antibióticos.

#### **Desinfectantes convencionales *in vitro* e *in vivo***

Según en la normativa Europea UNE-EN 1656:2009 para antisépticos y desinfectantes, la mayoría de los desinfectantes probados en condiciones de laboratorio para esta tesis doctoral pueden considerarse eficaces, ya que existió una reducción del 99,999% de las bacterias. Dos de los desinfectantes utilizados en granja no tuvieron la misma eficacia que los demás. Estos desinfectantes fueron *Polimorfo* y *Limoseptic*, obteniendo en ambos casos una peor desinfección (del 99,9 % frente al 99,9999 % obtenido en los otros casos) para *E. coli*, *S. suis* y *P. multocida*.

En el caso de *Polimorfo*, antiséptico compuesto por paraclorometacresol, alcohol y detergente su eficacia no fue tan elevada como la de los otros desinfectantes probados, no funcionando para bacterias del complejo respiratorio porcino, en concreto para el 6,6 % de los aislados de *S. suis*, y casi el 11 % de aislados *P. multocida*. En un estudio en el que se probaron 28 desinfectantes frente a *Salmonella entérica* y *E. coli*, el *Polimorfo*, y un derivado mejorado del mismo *Polimorfo plus* no presentaron la mejor actividad de todos los desinfectantes probados. (Martínez-Martínez *et al.*, 2016).

## Discusión

---

*Limoseptic*, desinfectante compuesto por amonio y aldehídos, no funcionó en bacterias del complejo respiratorio porcino ni en bacterias ambientales, fallando en el 6,6 % aislados de *S. suis*, en el 8,3 % de *P. multocida*, y en el 10 % de los aislados de *E. coli*. Estos resultados han sido apoyados por un estudio publicado por Gómez-García *et al.* (2022), en el que este desinfectante tampoco resultó tan eficaz como los demás.

Podemos concluir que la mayoría de los desinfectantes han actuado de manera correcta en condiciones de laboratorio. Los resultados *in vitro* muestran que la eficacia de desinfectantes frente a microorganismos, tanto bacterias ambientales como del complejo respiratorio porcino, confirman que la actividad antibacteriana de la mayoría de los desinfectantes es eficaz, en contraposición con los resultados obtenidos en los muestreos en granja, en los cuales podemos observar que no existe tanta eficacia, lo que podría ser debido a que en condiciones de campo la contaminación no es eliminada por completo, a pesar de la realización correcta de los protocolos de limpieza y desinfección (De Reu *et al.*, 2016; Reicks, 2019).

Teniendo en cuenta los estudios previos y valorando los propios resultados, podemos deducir que la falta de eficacia obtenida en los procesos de limpieza y desinfección en granja pudo deberse a fallos en los protocolos, errores como una limpieza inadecuada, tiempos de secado insuficientes o dosificación de desinfectantes incorrecta (Amass *et al.*, 1999; Davidson y Harrison, 2002; Dewulf, 2014). Otro problema a tener en cuenta, que exponen autores como Tong (2021), es el aumento de bacterias con resistencias frente a desinfectantes, con toda la problemática que ello acarrea. Estas nuevas resistencias, al igual que ocurre en las RA, pueden ocurrir por mutaciones o transferencia genética horizontal (Cloete, 2003; Thong 2021).

Un punto clave en la propagación de microorganismos patógenos se encuentra en transporte de los animales. En esta tesis doctoral se realizaron tres muestreos en camiones de transporte, con la finalidad de conocer el estado sanitario de los mismos. Los camiones han de presentar unas medidas de limpieza y desinfección muy estrictas, ya que en ocasiones el mismo camión realiza servicio para más de una granja y mataderos. Estas medidas que incluyen tiempos de espera entre granjas y diferentes fases del ciclo productivo. Debido a la naturaleza de la ganadería intensiva, y como hemos visto que también ocurre en las granjas, en ocasiones no se respetan los tiempos de secado ni los tiempos de inactividad entre el transporte de granjas diferentes. Para comprobar la higienización de un camión, el primer paso es una inspección visual, a pesar de que muchas veces no se realiza. Un segundo paso es el estudio

## Discusión

---

microbiológico, el cual se realiza en menos ocasiones (Levis *et al.*, 2011; Romagosa, 2017).

Por ello, se considera fundamental una evaluación periódica de los protocolos de limpieza y desinfección de las granjas, y también de los vehículos de transporte. Para poder señalar los puntos débiles de estos procesos, como suelen ser la eliminación de todas las heces y restos de materia orgánica. Y los reservorios de microorganismos, ya que la mayoría de los desinfectantes utilizados pierde su capacidad ante una mala limpieza. Pudiendo difundir los agentes infecciosos entre distintas rondas de producción (Dewulf, 2014).

Teniendo en cuenta los buenos resultados mostrados por la gran mayoría de los desinfectantes comerciales en condiciones de laboratorio, en la presente tesis doctoral se llevó a cabo una segunda etapa de evaluación *in vivo* para evaluar los protocolos de limpieza y desinfección en las granjas de diferentes fases productivas. Mediante los criterios establecidos por Maertens *et al.* (2018), en la presente tesis se obtuvieron resultados de limpieza y desinfección distintos, dependiendo de la fase en la que se encontrara la granja, siendo las granjas de transición las granjas con menor carga microbiológica y las más limpias, seguidas de las granjas de madres; por último, se situaron los cebaderos con la peor limpiezas y desinfección.

Este hecho puede deberse a que en estas fases se tiene mayor cuidado en los protocolos de limpieza y desinfección, ya que los animales son más sensibles a los cambios. Los peores resultados se encontraron en todo caso en cebaderos, ya que la limpieza y desinfección se puede realizar peor en cuanto mayor sea la densidad y tamaño de los animales. Un estudio publicado en 2021 demostró que la limpieza y desinfección desde el nacimiento hasta el destete juega un papel muy importante en la microbiota, la salud e incluso el peso de los animales, siendo las estancias con mejores protocolos que respetan los tiempos de limpieza, desinfección y secado los que generan una mejor salud animal (Law *et al.*, 2021).

Los comederos obtuvieron resultados peores. La retirada de materia orgánica, el desmontaje adecuado de los espacios y equipos y los tiempos de secado son puntos críticos que limitan la eficacia de estos protocolos en las granjas de cerdos. Generalmente, en los casos estudiados los lugares de peor acceso o difíciles de desmontar presentaron una peor desinfección general, en comparación con superficies lisas como paredes o suelos. En otros estudios apuntan que la retirada de materia orgánica y el proceso de “todo dentro, todo fuera” son muy importantes para limpiar

pequeños reservorios de microorganismos (Pearce, 1999; Wales *et al.*, 2011; Law *et al.*, 2021; Byrne *et al.*, 2022).

Las bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus xylosus* y el género *Bacillus* se detectaron en casi todos los casos tras la limpieza y desinfección, perteneciendo lo más probable a microbiota ambiental y no a microorganismos que necesariamente causarían enfermedad. Aun así, esta falta de eficacia obtenida de los desinfectantes frente a los resultados *in vitro* nos muestra que la presencia de materia orgánica, la dosificación de los desinfectantes o los fallos en los tiempos de secado hacen que las bacterias con una menor sensibilidad a estos compuestos proliferen, resultados respaldados por un gran número de estudios, en los cuales también se relaciona el papel de estas bacterias resistentes frente a los desinfectantes con las resistencias frente a antibióticos (Pearce, 1999; Davidson y Harrison, 2002; Karatzas *et al.*, 2007; Wales *et al.*, 2011; Webber *et al.*, 2015; Law *et al.*, 2021; Byrne *et al.*, 2022).

Como hemos podido comprobar, los fallos en los métodos de desinfección convencional suelen deberse a fallos en la aplicación de los productos, así como en los tiempos de secado. Por ello, en la presente tesis doctoral se decidió evaluar la eficacia de otros métodos de desinfección.

### **Desinfección *in vitro* e *in vitro* con nuevas técnicas: luz ultravioleta, agua ozonizada y ozono.**

La luz ultravioleta ha sido utilizada durante décadas como desinfectante y conservante de alimentos en la industria alimentaria, acuicultura, hospitales y laboratorios de todo el mundo (Thomas *et al.*, 2022). Debido a su naturaleza, también la podemos encontrar en muchos sistemas para el tratamiento de aguas. Su modo de actuación es dañar el material genético de los microorganismos, reduciendo así el uso de desinfectantes que generen residuos.

Lo mismo ocurre con el ozono, el cual se ha utilizado ampliamente para la purificación del agua, pero la química del ozono en el agua no es la misma que en el aire. Las altas concentraciones de ozono en el aire se pueden utilizar para ayudar a descontaminar un espacio desocupado de ciertos contaminantes u olores químicos o biológicos. A diferencia de otros desinfectantes convencionales el ozono es producido en el momento de utilizarse, mediante generadores, utilizando como materia prima el oxígeno y una fuente de energía (Dunston y Spivak, 1997; Lim *et al.*, 2022).

## Discusión

---

En los últimos tiempos, las nuevas técnicas de desinfección son una alternativa cada vez más común en las industrias antes mencionadas. Además, en las últimas décadas, con el conocimiento de que las medidas de bioseguridad, ha aumentado la implementación de estos métodos de desinfección en ciertas áreas de la ganadería. Resulta especialmente interesante en el caso de la ganadería porcina, ya que, como hemos mencionado anteriormente, muchas veces no se respetan los tiempos de limpieza y desinfección, dando como resultado una peor eficacia. Debido a las propiedades del ozono esta desinfección alternativa podría ayudar a la disminución de estos tiempos de espera de los ciclos productivos. El agua ozonizada tiene una fuerte capacidad de oxidante desinfectante. Además, el residuo que deja en el ambiente es cero, ya que se genera otra vez oxígeno, sin efectos secundarios, por lo que es ampliamente utilizada en la industria alimentaria y en áreas médicas (Wang, 2004; Ye, 2008). Estudios previos han demostrado que el agua ozonizada puede inactivar virus con ARN, como el virus de la estomatitis vesicular (Zhang *et al.*, 1998), el virus Norwalk (Shin y Sobsey, 2003), el poliovirus 1 (Shin y Sobsey, 2003), el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (Zhang *et al.*, 2004) y el virus de la diarrea epidémica porcina (Guo *et al.*, 2016). Hasta el momento, no hay ningún informe sobre el efecto de inactivación del agua ozonizada en los virus con ADN.

En vista de la urgente necesidad de prevención y control de la bioseguridad de la peste porcina africana en China, en este estudio se evaluaron los efectos de inactivación del agua ozonizada producida por el generador electrolítico de ozonización en la peste porcina africana. No es de extrañar el empleo de ozonizadores en agua de granja. Autores como Zhang demuestran que el agua ozonizada ha sido buen desinfectante contra medida preventiva para el virus de la peste porcina africana (Zhang *et al.*, 2020).

Los resultados obtenidos fueron los reflejados en las tablas 30, 39 y 40. Al tratarse de un espacio diáfano, el ozono funcionó muy bien en superficies (suelos y paredes). El agua ozonizada fue eficaz en comederos, bebederos, placas calefactoras y juguetes, por lo que podemos afirmar que la desinfección con ozono a 1,5 ppm y con agua ozonizada en sitios con difícil acceso podría ser una buena alternativa frente al desinfectante convencional, teniendo en cuenta que el ozono no deja residuos y que las instalaciones donde se usa pueden ser utilizadas al poco tiempo tras la desinfección.

Al igual que en los desinfectantes convencionales, es muy importante la limpieza previa a la desinfección porque la presencia de materia orgánica dificulta el efecto del

## Discusión

---

desinfectante sobre la carga microbiológica. Comederos, bebederos y juguetes son considerados lugares con más recovecos, y generalmente, con más problemas para la retirada de la materia orgánica. Tanto el desinfectante convencional como el ozono han presentado menor eficacia que en superficies lisas y más fáciles de limpiar (Vangroenweghe *et al.*, 2009).

### 5.3. Ácido láurico

#### Ensayos *in vitro*

En los resultados *in vitro* obtuvimos que el ácido láurico tuvo un potencial bactericida mediante difusión en disco y recuento de UFCs y fue eficaz frente a las bacterias patógenas del sistema respiratorio porcino probadas (*P. multocida* y *S. suis*). En un estudio realizado en 2017 en Nigeria se valoró el efecto del ácido láurico y su éster derivado sobre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* y *Salmonella entérica*. Los resultados fueron prometedores contra las Gram positivas, al igual que ocurrió en nuestro estudio para *S. suis*, y esa investigación también mostró efectividad frente a las Gram negativas, pero a concentraciones superiores que para las Gram positivas (Anzaku *et al.*, 2017).

En otro estudio realizado en 2019, se cuantificó la actividad antimicrobiana del ácido láurico, en aislados humanos, sobre todo para bacterias de la microbiota digestiva, en dicho estudio se pudo observar que la actividad bactericida del ácido láurico sobre bacterias comensales del intestino fue bastante reducida, pero sí que presentó actividad contra bacterias patógenas. Por ello podemos decir que este ácido modula la salud intestinal, favoreciendo las bacterias beneficiosas y desplazando a las patógenas (Matsue *et al.*, 2019). Se ha demostrado que dentro de los ácidos grasos de cadena media el ácido láurico y el ácido cáprico presentaron mejor capacidad antibacteriana que otros ácidos. En este mismo estudio, se comprobó la actividad antibacteriana del ácido láurico frente a *S. suis* (Jackman *et al.*, 2020).

En esta tesis doctoral se realizó un estudio de microscopía electrónica de transmisión para poder determinar el daño bacteriano resultante después de la exposición a ácido láurico. Se seleccionó la bacteria más encontrada en patología respiratoria *S. suis*. En los recuentos bacterianos se observó una disminución significativa de esta bacteria Gram positiva en forma de cacahuete, disminución que también se apreció en microscopía electrónica de barrido, pero no se observaron grandes daños estructurales, por lo cual se desconoce con exactitud el proceso de actuación de este ácido sobre la bacteria todavía. Para otras bacterias, el uso de una mezcla de ácidos grasos polinsaturados provocó alteraciones de la membrana celular, como fue el caso de *Porphyromonas gingivalis*, o cambios morfológicos en la membrana, haciéndola más rugosa, como en *Streptococcus mutans*, o disrupciones en la membrana como ocurrió para *Bacillus cereus* o *S. aureus*. En experimentos realizados únicamente con ácido láurico se había observado que *Clostridium difficile* liberaba más ácido

nucleico al ser tratado con este ácido, lo que sugería daños en la membrana, los cuales se comprobaron mediante microscopía electrónica de transmisión de sección ultrafina, observándose una morfología anormal, así como una fuga en el contenido del citoplasma. Para *S. aureus* también se observaron formaciones tubulares en la bicapa lipídica, las cuales acabaron en lisis (Scheffers y Pinho, 2005; Zheng *et al.*, 2005; Vollmer *et al.*, 2008; Kenny *et al.*, 2009; Schumann, 2011; Stan *et al.*, 2017; Jackman *et al.*, 2020a; Casillas-Vargas *et al.*, 2021).

### **Ensayo *in vivo***

Como hemos comentado anteriormente, la utilización preventiva de los antibióticos en el ganado porcino aumenta los índices productivos y mejora la mortalidad durante la transición, así como la diseminación de enfermedad en granjas intensivas. El problema de los destetes a temprana edad intensifica las disbiosis en la microbiota de los animales ocasionadas por la fase de transición. Por otro lado, y debido al abuso de los antimicrobianos, nos podemos encontrar con genes de resistencia frente a antibióticos en la microbiota de los cerdos. Se ha llevado a cabo un estudio experimental el cual se ha modificado la composición de la dieta de los lechones mediante la introducción de dos dosis diferentes del aditivo ácido láurico (2 kgs de ácido láurico por cada tonelada de pienso y 4 kgs de ácido láurico por tonelada de pienso), con el fin de que este compuesto, con las propiedades que presentan los ácidos grasos de cadena media, mejoren la microbiota beneficiosa para los animales, previniendo la colonización de bacterias patógenas, y con ello obtener una disminución del abuso de antibióticos en explotaciones porcinas. Este estudio proporcionó un análisis exhaustivo de la estructura y la composición de la microbiota de nasal y fecal en cerdos de destete, mostrando diferencias y similitudes entre los distintos piensos probados. Los estudios sobre la microbiota nasal y fecal de los lechones dieron como resultado que los tractos intestinales y respiratorios están expuestos a centenares de especies bacterianas, con grandes variaciones tras el destete (Slifierz *et al.*, 2015; Tajima y Aminov, 2015; Wang *et al.*, 2019).

La microbiota del tracto respiratorio superior, y en concreto la microbiota nasal (por ser la primera vía de entrada y estar más expuesta al medio), está relacionada con las enfermedades respiratorias. En los suinos, el hocico, además de la función de respiración y olfateo cumple una función fundamental en la relación del animal con el entorno y otros animales; además, es la primera barrera de entrada de los microorganismos por lo que se pueden desencadenar enfermedades. En un estudio

## Discusión

---

publicado en 2016 se demostró la relación de las comunidades bacterianas nasales con la enfermedad de Glässer (Correa-Fiz *et al.*, 2016, 2020; Lanaspá *et al.*, 2017).

Respecto a los resultados obtenidos para la microbiota nasal, se ha podido observar que a grandes rasgos existen diferencias entre la  $\beta$ -diversidad bacteriana, es decir, entre la diversidad de microorganismos que presentaron los diferentes grupos estudiado a lo largo del tiempo. Una mayor diversidad filogenética está asociada a una mejor salud del animal, ya que en los casos de patología el animal tiende a ser colonizado por una o varias especies patógenas que desplazan al resto de los microorganismos (Correa-Fiz *et al.*, 2016, 2020).

En un primer momento, es decir, el primer día del destete, pudimos analizar los cambios mediante el índice de Simpson de cada grupo de animales a lo largo del tiempo, obteniendo un índice menor en este primer muestreo. Este hecho puede ser explicado por la homogeneidad de microorganismos que los lechones presentan antes de la fase de transición, sin empezar aún la disbiosis que genera en los cerdos la ingesta de alimentos sólidos, cuando sucede el cambio de la leche materna a pienso. A los 14 días de iniciar el tratamiento, la abundancia relativa de los tres grupos aumento considerablemente, pero manteniendo las medianas más estables en el grupo control y en 2 kg/T, frente al grupo de los 4 kg/T de ácido láurico, lo cual nos indica una mayor diversidad filogenética para este último y un índice de Simpson superior para la dosis de 4 kg/T. Por último y tras los 43 días de consumo de piensos suplementados con ácido láurico, podemos decir que en este punto tanto la riqueza de especies como el índice de Simpson aumento en los tres casos, siendo más variado en los casos de los piensos suplementados con ácido láurico.

Durante el primer y el segundo momento en el que se muestrearon a los animales, la bacteria con más presencia en las muestras nasales fue *Clostridioides difficile*, patógeno humano y bacteria comensal en porcino, especialmente en los individuos jóvenes (Weese, 2020). Este microorganismo disminuyó su tasa de aparición en los lechones en el último muestreo, en el caso de 2 kg/T de ácido láurico, así como para 4 kg/T, aunque se siguió encontrando como el microorganismo más abundante en el grupo control.

El segundo microorganismo más encontrado fue *Bergeyella zoohelcum*, bacteria que se puede encontrar en el tracto respiratorio de muchos mamíferos, como perros, gatos y cerdos; en este último caso, en un análisis de microbiota nasal en cerdos y jabalíes sanos publicado en 2018, se encontró esta bacteria lechones y rayones de 3 a

## Discusión

---

4 semanas de vida, no teniendo muy claro su papel como comensal o patógeno. Apareció mayoritariamente durante las primeras semanas de vida de los lechones, disminuyendo a los 14 días de tratamiento y reapareciendo, sobre todo en los individuos de grupo control, a los 43 días de tratamiento (Martínez-López *et al.*, 2013; Lorenzo de Arriba *et al.*, 2018).

Los tercer y cuarto microorganismos encontrados fueron integrantes del complejo respiratorio porcino, *S. suis* y *G. parasuis*, los cuales aparecieron mayoritariamente en el primer y último muestreo, bajando su incidencia en el segundo momento. Debido a que no existió patología causada por estos microorganismos durante la duración del experimento, y apoyando nuestra hipótesis en otros ensayos, podemos afirmar que su función en la microbiota nasal de los hospedadores cumplía el papel de bacterias comensales (Correa-Fiz *et al.*, 2020; Blanco-Fuertes *et al.*, 2021; Niazy *et al.*, 2022).

A partir de los 14 días, con el tratamiento se empezaron a identificar bacterias del género *Prevotella* (*Prevotella* sp., *Prevotella copri* y *Prevotella stercorea*), apareciendo más en el control que en los cerdos suplementados con ácido láurico. A pesar de ser un género que puede actuar como comensal o patógena del tracto digestivo, se ha encontrado también frecuentemente en la microbiota nasal de cerdos sin patología (Wang *et al.*, 2019; Amat *et al.*, 2020).

El género *Moraxella* apareció con *Moraxella* sp., *M. porci*, *M. boevrei*, *M. lacunat* y *M. pluranimalium*, bacteria comensal del tracto respiratorio en mamíferos. En un estudio publicado en 2020 se obtuvieron *Moraxella porci* y *Moraxella pluranimalium* después del análisis de microbiota nasal de lechones sanos (López-Serrano *et al.*, 2020).

Está demostrado que la microbiota digestiva en mamíferos juega un papel fundamental en la salud, por lo que no es extraño que en los últimos tiempos el estudio de esta microbiota haya sido tema de estudio en la industria porcina, acompañado del incremento en las disbiosis a nivel digestivo que se están notificando en los últimos años en ganadería porcina (Fouhse *et al.*, 2016; Gresse *et al.*, 2017; Barko *et al.*, 2018).

Mediante el estudio y análisis de la microbiota fecal, se ha podido observar que a grandes rasgos existieron diferencias entre la  $\beta$ -diversidad bacteriana, es decir, entre la diversidad de microorganismos que presentaron los diferentes grupos estudiados a lo largo del tiempo. Una mayor diversidad filogenética está asociada a una mejor salud del

## Discusión

---

animal, ya que en casos de patología el animal tiende a ser colonizado por una o varias especies patógenas que desplazan al resto de microorganismos (Correa-Fiz *et al.*, 2016, 2020).

En este estudio, la riqueza de especies se mantuvo en los tres tiempos, y el índice de Simpson fue variando en el tiempo, obteniendo valores mucho más bajos en el último muestreo, en comparación con el primero. Esto podría ser debido a las disbiosis intestinales que ocurren en la microbiota intestinal de los animales en el momento de la transición.

El género *Prevotella* fue muy prevalente en nuestro estudio, sobre todo a partir del segundo muestreo (14 días de tratamiento), encontrando sobre todo *Prevotella* sp, *P. copri* y *P. stercorea*. No es de extrañar puesto que es un género muy predominante en el tracto intestinal de los cerdos, y sobre todo en el momento postdestete. En el caso de *P. copri*, en un estudio publicado en 2021 se demostró que activó las respuestas inflamatorias crónicas del cerdo a través de las vías de señalización TLR4 y mTOR en la microbiota intestinal de cerdos alimentados con dietas de fórmula comercial, aumentando a su vez la deposición de grasa del animal ( Yang *et al.*, 2018; Ke *et al.*, 2019; C. Chen *et al.*, 2021).

*Ruminococcus* apareció en los lechones justo después del destete, manteniéndose con mayor prevalencia a los 43 días del experimento en los individuos suplementados con ácido láurico. Estas bacterias ayudan a la producción de ácidos grasos de cadena corta y a la degradación de fibra (Chen *et al.*, 2019; Uryu *et al.*, 2020).

Para *E. coli*, bacteria patógena y comensal de la microbiota intestinal por excelencia ocurrió lo mismo: en un primer muestreo la encontramos en todos los individuos de todos los grupos, y a lo largo del tiempo únicamente en el muestreo realizado el día 14 del experimento, volviendo a desaparecer casi por completo el día 43 de muestreo.

Respecto al género *Clostridium* a lo largo del tiempo fue desapareciendo en los individuos con ingesta de ácido láurico, sugiriendo que este ácido graso desplazó a este microorganismo. Este género suele aparecer en la microbiota normal de los animales, pero *C. difficile* puede causar patologías como la diarrea neonatal (Ślizewska y Chlebicz, 2019).

Lo mismo ocurrió con *Bacteroides frágilis*, bacteria relacionada con las infecciones intestinales y peritonitis: se obtuvo el mismo patrón que para *Clostridium*, apareciendo sobre todo en el grupo control (Cao *et al.*, 2022)

## Discusión

---

Cabe destacar que en los cerdos tras 43 días consumiendo pienso suplementado con ácido láurico aparecieron poblaciones de *Megasphaera elsdenii*, que en otro tipo de ganadería está directamente asociada con una mejor salud gastrointestinal, mejorando la acidosis provocada por las dietas ricas en granos (Chen *et al.*, 2019).

En definitiva, si bien la abundancia general de microorganismos no fue muy distinta entre los diferentes grupos, la suplementación con ácido láurico podría haber generado un efecto en la modulación de la microbiota beneficiosa, y con ello en la salud general de los individuos.

Por último, el estudio de los pesos y consumo de pienso de los animales durante este procedimiento experimental fue similar en los tres casos, pero destacando los incrementos en los índices de producción en el caso de 4kg/T de ácido láurico, así como más bajas por bajo peso y enfermedad en los grupos control (cuatro bajas frente a dos).

En nuestro caso los valores de ganancia media diaria durante todo el experimento fueron muy similares en el caso del grupo control y de 2 kg/T de ácido láurico. Por otro lado, para el grupo de 4 kg/T de ácido láurico fueron notablemente mayores (de 0,307 kg por animal para el grupo control a 0,322 para el grupo de 4 kg/T).

El consumo de pienso fue más elevado en el grupo control (28,64 kg/cerdo) en comparación con los grupos que recibieron ácido láurico (grupo 2 kg/T: 27,17 kg/cerdo y grupo 4 kg/T: 27,48 kg/cerdo). El índice de conversión, el cual revela el pienso convertido en kilo productivo, mostró una mejoría en el grupo que recibió 4 kg/T (2,02) frente al grupo control (2,29). Anteriormente las investigaciones con ácidos grasos de cadena media sobre la salud de la microbiota intestinal y sobre las propiedades antiinflamatorias habían obtenido resultados positivos, pero pocas veces se cuantificaron las mejoras en los parámetros productivos utilizando estos compuestos (Zentek *et al.*, 2011; Liu, 2015).

En esta tesis los resultados apuntan a que existe una mejora en los índices productivos, así como una mayor diversidad de poblaciones bacterianas en los animales a los que se les administró ácido láurico. Estos resultados fueron similares a los dos estudios realizados en Australia, en que también se reportaron impactos beneficiosos en algunas variables de producción en los animales suplementados con láurico. En dichos estudios se probaron tanto ácido láurico y como monolaurina como aditivos en el pienso, obteniéndose con el ácido láurico mejoras en las poblaciones bacterianas de interés a fecal (Pluske *et al.*, 2018; Jackman *et al.*, 2020). Otro estudio realizado en 192 lechones en fase de transición mostró que las dietas suplementadas con ácido láurico

## Discusión

---

redujeron significativamente el uso de antibióticos asociados a la diarrea, mejorando así la salud intestinal y general de los cerdos. Se ha demostrado que dentro de los ácidos grasos de cadena media el ácido láurico y el cáprico presentaron mejor capacidad antibacteriana que otros ácidos. En este mismo estudio se comprobó la actividad antibacteriana del ácido láurico frente a *S. suis* (Jackman *et al.*, 2020; Rebucci *et al.*, 2021).



# 6. CONCLUSIONES

## Conclusiones

---

## Conclusiones

---

### PRIMERA:

Tras la evaluación *in vitro* de los once desinfectantes comerciales y dos compuestos activos utilizados en las granjas, los desinfectantes *Limoseptic* y *Poliformo* no llegaron a eliminar por completo la presencia de bacterias viables para todos los microorganismos ensayados. Sin embargo, el resto de los compuestos probados si resultaron ser eficaces frente a *A. pleuropneumoniae*, *B. subtilis*, *E. coli*, *G. parasuis*, *P. multocida*, *P. fluorescens*, *S. aureus* y *S. suis*. Este resultado apoya aún más la importancia de los protocolos de limpieza y desinfección y la rotación de desinfectantes, así como la realización de higienogramas para la evaluación de la calidad de la desinfección.

### SEGUNDA:

Los muestreos realizados en treinta y cinco granjas porcinas de Castilla y León, y en tres camiones de transporte de cerdos mostraron que la actividad de los desinfectantes presentaron mejor eficacia en las superficies planas que en las superficies irregulares y de difícil acceso, señalando que los protocolos de limpieza y desinfección son fundamentales para detener los ciclos de reproducción y propagación de microorganismos patógenos, muchos de los cuales son portadores de resistencias frente a antibióticos.

### TERCERA:

Los ensayos *in vitro* de la desinfección realizada con ozono y radiación UV sobre las bacterias ambientales *B. subtilis*, *E. coli*, *P. fluorescens* y *S. aureus* mostraron una alta eficacia. Coincidiendo estos resultados con los obtenidos *in vivo*, en los que el ozono a 1,5 ppm y agua ozonizada pulverizada mostraron una buena desinfección en granja.

Sugiriendo así que el ozono es una alternativa equivalente a la desinfección convencional, además de tener la ventaja de no generar residuos, ahorrando el tiempo de secado posterior a la desinfección y puede actuando en lugares de difícil acceso.

## Conclusiones

---

### CUARTA:

Tanto el ácido láurico, como su éster derivado, el glicerol monolaurato, presentaron una actividad antimicrobiana *in vitro* dependiente de su concentración para las bacterias respiratorias *P. multocida* y *S. suis*, siendo de gran importancia las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para elegir la concentración a la hora su administración.

A pesar de que los mecanismos de acción de estos ácidos grasos sobre las bacterias no están aun perfectamente descritos, el estudio de microscopía electrónica de barrido (MEB) mostró una menor densidad poblacional para el caso de *S. suis* tratado con ácido láurico.

### QUINTA:

Los índices paramétricos de los cerdo, desde el destete hasta el cebo, los cuales fueron alimentados con concentraciones de 2 y 4 kilogramos de ácido láurico en los piensos *pre-starter* y *starter* presentaron una ligera mejoría respecto a los grupos control.

Los animales alimentados con pienso sin suplementación con ácido láurico manifestaron un consumo de pienso más elevado. Se desconoce el mecanismo de actuación de este ácido sobre la composición corporal y digestibilidad de los animales, por lo que debería ser estudiado en un futuro.

### SEXTA:

La microbiota nasal de los animales suplementados con 2 y 4 kg de ácido láurico por tonelada de pienso indicó una gran diversidad de microorganismos o  $\beta$ -diversidad, es decir, una mejor microbiota nasal, ya que cuando son pocos los microorganismos que colonizan el hocico suelen ser patógenos. Durante los primeros momentos, los tres grupos a estudio presentaron *Clostridioides difficile*, el cual desapareció en los dos grupos que fueron suplementados con ácido láurico tras 43 días de consumo.

### SÉPTIMA:

La evaluación de la microbiota fecal de los cerdos suplementados con 2 y 4 kg de ácido láurico por tonelada de pienso a lo largo de su fase de transición mostró resultados muy similares de  $\beta$ -diversidad en los tres grupos. Encontrando en los cerdos suplementados mayores poblaciones de *Megasphaera elsdenii*, bacteria estrechamente relacionada con una buena salud. Por otro lado, los cerdos suplementados revelaron menores poblaciones de bacterias relacionadas con infecciones intestinales y peritonitis, como *Clostridium* spp.

# 7. BIBLIOGRAFÍA



## Bibliografía

---

Aarestrup, F. M. (2015) "The livestock reservoir for antimicrobial resistance: a personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward", *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. The Royal Society, 370(1670), p. 20140085. doi:10.1098/RSTB.2014.0085.

Aarestrup, F. M., Wegener, H. C. & Collignon, P. (2008) "Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies". *Expert Rev Anti Infect Ther*, 6(5), pp. 733-750. doi:10.1586/14787210.6.5.733.

Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J. & Handelsman, J. (2010) "Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments". *Nat Rev Microbiol*, 8(4), pp. 251-259. doi:10.1038/NRMICRO2312.

Alvarez, J., Sarradell, J., Kerkaert, B., Bandyopadhyay, D., Torremorell, M., Morrison, R. & Perez, A. (2015) "Association of the presence of influenza A virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in sow farms with post-weaning mortality". *Prev Vet Med*, 121(3-4), pp. 240-245. doi:10.1016/J.PREVETMED.2015.07.003.

Amass, S. F., Clark, A. & L Kirk (1999) "Biosecurity considerations for pork production units". *J. Swine Health Prod.*, 7, p. 228.

Amat, S., Lantz, H., Munyaka, P. M. & Willing, B. P. (2020) "*Prevotella* in pigs: the positive and negative associations with production and health". *Microorganisms* 2020, Vol. 8, Page 1584. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 8(10), p. 1584. doi:10.3390/MICROORGANISMS8101584.

Angen, Ø., Ahrens, P. & Jessing, S. G. (2008) "Development of a multiplex PCR test for identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1, 7, and 12". *Vet. Microbiol.* 132(3-4), pp. 312-318. doi:10.1016/J.VETMIC.2008.05.010.

Angulo, F. J., Baker, N. L., Olsen, S. J., Anderson, A. & Barrett, T. J. (2004) "Antimicrobial use in agriculture: controlling the transfer of antimicrobial resistance to humans". *Semin Pediatr Infect Dis*, 15(2), pp. 78-85. doi:10.1053/J.SPID.2004.01.010.

Anzaku, A. A., Akyala, J. I., Juliet, A. & Obianuju, E. C. (2017) "Antibacterial activity of lauric acid on some selected clinical isolates". *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 5(2). doi:10.21767/2386-5180.1000170.

## Bibliografía

---

del Arco, J. (2014) "Antibióticos: situación actual", Farmacia Profesional. Elsevier, 28(5), pp. 29-33. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-antibioticos-situacion-actual-X0213932414516605> (Accedido: 31 de enero de 2022).

Babot Gaspa, D., Cachón de Mesa, J. & Miranda Sotillos, F. (2017) Bases zootécnicas para el cálculo del balance alimentario de nitrógeno y de fósforo . Madrid. Disponible en: [www.mapama.gob.es](http://www.mapama.gob.es) (Accedido: 9 de marzo de 2022).

Bamphensin, N., Chopjitt, P., Hatrongjit, R., Boueroy, P., Fittipaldi, N., Gottschalk, M. & Kerdsin, A. (2021) "Non-penicillin-susceptible *Streptococcus suis* isolated from humans", Pathogens, 10(9), p. 1178. doi:10.3390/PATHOGENS10091178.

Barbosa da Silva Jr, J., Espinal, M. & Ramón-Pardo, P. (2020) "Antimicrobial resistance: time for action\*". Rev Panam Salud Publica. doi:10.26633/RPSP.2020.131.

Barton, M. D. (2000) "Antibiotic use in animal feed and its impact on human health". Nutr Res Rev, 13(2), pp. 279-299. doi:10.1079/095442200108729106.

Bbosa, G. S., Mwebaza, N., Odda, J., Kyegombe, D. B. & Ntale, M. (2014) "Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance". Health, 2014(05), pp. 410-425. doi:10.4236/HEALTH.2014.65059.

Blanco-Fuertes, M., Correa-Fiz, F., Fraile, L., Sibila, M. & Aragon, V. (2021) "Altered nasal microbiota composition associated with development of polyserositis by *Mycoplasma hyorhinis*". Pathogens, 10(5). doi:10.3390/PATHOGENS10050603.

Blanco, M., Gutiérrez-Martin, C. B., Rodríguez-Ferri, E. F., Roberts, M. C. & Navas, J. (2006) "Distribution of tetracycline resistance genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates from Spain". Antimicrob Agents Chemother, 50(2), pp. 702-708. doi:10.1128/AAC.50.2.702-708.2006.

Blondeau, J. M. & Fitch, S. D. (2019) "Mutant prevention and minimum inhibitory concentration drug values for enrofloxacin, ceftiofur, florfenicol, tilmicosin and tulathromycin tested against swine pathogens *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* and *Streptococcus suis*". PloS One, 14(1). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0210154.

## Bibliografía

---

Bloomfield, S. F. (2002) "Significance of biocide usage and antimicrobial resistance in domiciliary environments.", Symposium series (Society for Applied Microbiology) (31), pp. 144S-157S. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12481839> (Accedido: 5 de febrero de 2022).

Bloomfield, S. F. (2003) "Home hygiene: A risk approach", J Hyg Environ Health. 206(1), pp. 1-8. doi:10.1078/1438-4639-00193.

Boyce, W. T., Sokolowski, M. B. & Robinson, G. E. (2012) "Toward a new biology of social adversity". PNAS, 109 (suppl.2), pp. 17143-17148. doi:10.1073/PNAS.1121264109.

De Briyne, N., Atkinson, J., Pokludová, L., Borriello, S. P. & Price, S. (2013) "Factors influencing antibiotic prescribing habits and use of sensitivity testing amongst veterinarians in Europe". Vet Rec, 173(19), p. 475. doi:10.1136/VR.101454.

Brockmeier, S. L., Halbur, P. G. & Thacker, E. L. (2002) "Porcine Respiratory Disease Complex". ASM Press. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2481/> (Accedido: 31 de enero de 2022).

Brogden, S., Pavlović, A., Tegeler, R., Kaspar, H., De Vaan, N. & Kehrenberg, C. (2018) "Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* isolates from Germany by use of a proposed standard method for harmonized testing". Vet Microbiol, 217, pp. 32-35. doi:10.1016/J.VETMIC.2018.02.017.

Broom, L. J. (2019) "Organic acids for improving intestinal health of poultry", <https://doi.org/10.1017/S0043933915002391>. Taylor & Francis, 71(4), pp. 630-642. doi:10.1017/S0043933915002391.

Bruyndonckx, R., Adriaenssens, N., Versporten, A., Hens, N., Monnet, D. L., Molenberghs, G., Goossens, H., Weist, K., Coenen, S., group, the E.-N. study, Strauss, R., Vandael, E., Sabtcheva, S., Payerl-Pal, M., Kyriakidou, I., Vlček, J., Sönksen, U. W., Linask, E., Sarvikivi, E., Cavalié, P., Feig, M., Kontopidou, F., Benkő, R., Aspelund, G., Oza, A., Fortinguerra, F., Rutkowska, I., Kuklytė, J., Bruch, M., Zarb, P., Natsch, S., Blix, H. S., Olczak-Pierńkowska, A., Silva, A., Iosif, I., Tesař, T., Čížman, M., Herreras, M. A., Bergfeldt, V. & Hopkins, S. (2021) "Consumption of antibiotics in the community, European Union/European Economic Area, 1997–2017: data collection, management and analysis", Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Oxford Academic, 76(Supplement 2), pp. ii2-ii6. doi:10.1093/JAC/DKAB171.

## Bibliografía

---

Burke, J. P. (1998) "Antibiotic resistance--squeezing the balloon?". JAMA, 280(14), pp. 1270-1271. doi:10.1001/JAMA.280.14.1270.

Buxadé Carbó, C. (ed.) (1996) Porcinocultura intensiva y extensiva. Mundi-Prensa. Disponible en: <https://www.mundiprensa.com/catalogo/9788471145895/porcinocultura-intensiva-y-extensiva--tomo-vi--zootecnia-bases-de-produccion-animal--> (Accedido: 9 de marzo de 2022).

Byrne, N., O'Neill, L., Díaz, J. A. C., Manzanilla, E. G., Vale, A. P. & Leonard, F. C. (2022) "Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from on-farm and conventional hatching broiler farms in Ireland". Ir Vet J, 75(1), p. 7. doi:10.1186/S13620-022-00214-9.

Cantón, R., Loza, E., Aznar, J., Barrón-Adúriz, R., Calvo, J., Castillo, F. J., Cercenado, E., Cisterna, R., González-Romo, F., López-Hontangas, J. L., Suárez-Barrenechea, A. I., Tubau, F., Molloy, B., López-Mendoza, D., Herrero, O., Martínez-Martínez, L., Domínguez, M. A., Sáenz, J. L. P., Seral, C., Arcía-Castillo, M., Prieto, J., González-Galán, V. & Pascual, A. (2018) "Antimicrobial susceptibility trends and evolution of isolates with extended spectrum  $\beta$ -lactamases among Gram-negative organisms recovered during the SMART study in Spain (2011-2015)". Rev Esp Quimioter, 31(2), p. 136. Disponible en: </pmc/articles/PMC6159370/> (Accedido: 3 de febrero de 2022).

Cao, H., Liu, M. C.-J., Tong, M.-K., Jiang, S., Lau, A., Chow, K.-H., Tse, C. W.-S. & Ho, P.-L. (2022) "Diversity of genomic clusters and CfiA/cfiA alleles in Bacteroides fragilis isolates from human and animals". Anaerobe, 75, p. 102567. doi:10.1016/J.ANAEROBE.2022.102567.

Casillas-Vargas, G., Ocasio-Malavé, C., Medina, S., Morales-Guzmán, C., Del Valle, R. G., Carballeira, N. M. & Sanabria-Ríos, D. J. (2021) "Antibacterial fatty acids: An update of possible mechanisms of action and implications in the development of the next-generation of antibacterial agents". Prog. Lipid Res, 82, p. 101093. doi:10.1016/J.PLIPRES.2021.101093.

Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M. E. (2019) "Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis". Lancet

## Bibliografía

---

Publishing Group, 19(1), pp. 56-66. doi:10.1016/S1473-3099(18)30605-4/ATTACHMENT/84C40198-AD78-4322-A158-CDF215C37DFC/MMC1.PDF.

Cepero Briz, R. (octubre, 2006) "Retirada de los antibióticos promotores de crecimiento en la unión europea: causas y consecuencias". XII Congreso Bienal AMENA, Jalisco, México. [http://www.wpsa-aeca.es/aeca\\_imgs\\_docs/24\\_01\\_30\\_MEXICO05-RCB.pdf](http://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/24_01_30_MEXICO05-RCB.pdf)

Chen, C., Fang, S., Wei, H., He, M., Fu, H., Xiong, X., Zhou, Y., Wu, J., Gao, J., Yang, H. & Huang, L. (2021) "*Prevotella copri* increases fat accumulation in pigs fed with formula diets". *Microbiom*, 9(1), pp. 1-21. doi:10.1186/S40168-021-01110-0.

Chen, L., Huang, J., Huang, X., He, Y., Sun, J., Dai, X., Wang, X., Shafiq, M. & Wang, L. (2021) "Horizontal transfer of different erm(B)-carrying mobile elements among *Streptococcus suis* strains with different serotypes". *Front Microbiol.* 12, p. 340. doi:10.3389/FMICB.2021.628740/BIBTEX.

Chen, L., Shen, Y., Wang, C., Ding, L., Zhao, F., Wang, M., Fu, J. & Wang, H. (2019) "Megasphaera elsdenii lactate degradation pattern shifts in rumen acidosis models". *Front Microbiol.* p. 162. doi:10.3389/FMICB.2019.00162/BIBTEX.

Confer, A. W. (1993) "Immunogens of *Pasteurella*", *Vet. Microbiol.*, 37(3-4), pp. 353-368. doi:10.1016/0378-1135(93)90034-5.

Coote, J. G. (2001) "Environmental sensing mechanisms in *Bordetella*", *Adv Microb Physiol*, 44, pp. 141-181. doi:10.1016/S0065-2911(01)44013-6.

Correa-Fiz, F., Fraile, L. & Aragón, V. (2016) "Piglet nasal microbiota at weaning may influence the development of Glässer's disease during the rearing period". *BMC Genomics*. BioMed Central Ltd., 17(1), pp. 1-14. doi:10.1186/S12864-016-2700-8/TABLES/4.

Correa-Fiz, F., Neila-Ibáñez, C., López-Soria, S., Napp, S., Martínez, B., Sobrevia, L., Tibble, S., Aragón, V. & Migura-García, L. (2020) "Feed additives for the control of post-weaning *Streptococcus suis* disease and the effect on the faecal and nasal microbiota", *Sci. Rep.* 10(1). doi:10.1038/S41598-020-77313-6.

Cromwell, G. L. (2002) "Why and how antibiotics are used in swine production". *Anim. Biotechnol.* 13(1), pp. 7-27. doi:10.1081/ABIO-120005767.

## Bibliografía

---

Cuevas Gómez, M. I. (2020) "Estudio de las septicemias causadas por *Pasteurella multocida* en el ganado porcino y bovino." Universidad de Córdoba, UCOPress. Disponible en: <https://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/20504> (Accedido: 14 de abril de 2022).

Cuevas, I., Carbonero, A., Cano, D., García-Bocanegra, I., Amaro, M. Á. & Borge, C. (2020) "Antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* type B isolates associated with acute septicemia in pigs and cattle in Spain", BMC Vet. Res. 16(1), pp. 1-9. doi:10.1186/S12917-020-02442-Z/TABLES/6.

Damiaans, B., Sarrazin, S., Heremans, E. & Dewulf, J. (2018) "Perception, motivators and obstacles of biosecurity in cattle production", Vlaams Diergeneeskund Tijdschr. 87(3), pp. 150-163. doi:10.21825/VDT.V87I3.16079.

Dayao, D., Gibson, J. S., Blackall, P. J. & Turni, C. (2016) "Antimicrobial resistance genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* and *Pasteurella multocida* isolated from Australian pigs", Aust. Vet. J. 94(7), pp. 227-231. doi:10.1111/AVJ.12458.

Daza Pérez, R. (1998) "Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria ". En Información terapéutica del Sistema Nacional de Salud. 3.a ed. Madrid: Dialnet, pp. 57-67. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4310875> (Accedido: 9 de marzo de 2022).

Diallo, D., Marston, A., Terreaux, C., Toure, Y., Paulsen, B. S. & Hostettmann, K. (2001) "Screening of malian medicinal plants for antifungal, larvicidal, molluscicidal, antioxidant and radical scavenging activities". Phytother Res. 15(5), pp. 401-406. doi:10.1002/PTR.738.

De la Puente Redondo, V. A., Navas Méndez, J., García del Blanco, N., Ladrón Boronat, N., Gutiérrez Martín, C. B. & Rodríguez Ferri, E. F. (2003) "Typing of *Haemophilus parasuis* strains by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* gene". Vet. Microbiol. 92(3), pp. 253-262. doi:10.1016/S0378-1135(02)00362-0.

Edqvist, L.-E. & Pedersen, K. B. (2008) "Antimicrobials as growth promoters: resistance to common sense". European Environment Agency. Disponible en: [https://www.eea.europa.eu/publications/environmental\\_issue\\_report\\_2001\\_22/issue-22-part-09.pdf/view](https://www.eea.europa.eu/publications/environmental_issue_report_2001_22/issue-22-part-09.pdf/view) (Accedido: 8 de marzo de 2022).

## Bibliografía

---

EMA, Committee for Medicinal Products for Veterinary use (CVMP) & Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) (2019) "Categorisation of antibiotics in the European Union Answer to the request from the European Commission for updating the scientific advice on the impact on public health and animal health of the use of antibiotics in animals". Amsterdam. Disponible en: [www.ema.europa.eu/contact](http://www.ema.europa.eu/contact) (Accedido: 9 de marzo de 2022).

Errecalde, J. Ó. (2004) "Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencias del desarrollo de resistencias en salud pública". La Plata: Univeristy of la plata, Facultad de ciencias Veterinarias. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/273060145\\_Uso\\_de\\_antimicrobianos\\_an\\_animales\\_de\\_consumo](https://www.researchgate.net/publication/273060145_Uso_de_antimicrobianos_an_animales_de_consumo) (Accedido: 8 de marzo de 2022).

Espinosa, I. & Martínez, S. (2008) "*Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica* y *Streptococcus suis* en el complejo respiratorio porcino", Rev. Salud Anim. 30(3), pp. 137-145. ISSN 0253-570X.

European Centre for Disease Prevention and Control. "Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals". (2013). Stockholm. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/health-care-associated-infections-antimicrobial-use-PPS.pdf> (Accedido: 3 de febrero de 2022).

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), European Food Safety Authority & and European Medicines Agency (EMA) (2021) "Third joint inter-agency report on integrated analysis of consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals in the EU/EEA". doi:10.2903/j.efsa.2021.6712.

European Medicines Agency & European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (2018) "Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018". EMA/24309/2020. Disponible en: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2018-trends-2010-2018-tenth-esvac-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2018-trends-2010-2018-tenth-esvac-report_en.pdf) (Accedido: 4 de febrero de 2022).

## Bibliografía

---

EMA Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP) & EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (2017) "EMA and EFSA Joint Scientific Opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety (RONAFA)", *EFSA Journal*. Wiley, 15(1). doi:10.2903/J.EFSA.2017.4666.

Finger, H. & Koenig, C. H. W. von (1996) "*Bordetella*", *Clinical Infectious Disease*, Second Edition. University of Texas Medical Branch at Galveston, pp. 859-862. doi:10.1017/CBO9781139855952.147.

Furian, T. Q., Borges, K. A., Laviniki, V., da Silveira Rocha, S. L., de Almeida, C. N., do Nascimento, V. P., Salle, C. T. P. & de Souza Moraes, H. L. (2016) "Virulence genes and antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from poultry and swine". *Braz J Microbiol*. 47(1), pp. 210-216. doi:10.1016/J.BJM.2015.11.014.

Gómez-García, M., Argüello, H., Pérez-Pérez, L., Vega, C., Puente, H., Mencía-Ares, Ó., Rubio, P. & Carvajal, A. (2022) "Combined *in-vitro* and on-farm evaluation of commercial disinfectants used against *Brachyspira hyodysenteriae*". *Porcine Health Manag*. 8(1). doi:10.1186/S40813-021-00244-9.

Goyette-Desjardins, G., Auger, J. P., Xu, J., Segura, M. & Gottschalk, M. (2014) "*Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent-an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing". *Emerg Microbes Infect*. 3(6). doi:10.1038/EMI.2014.45.

Goys, M., Barnes & RF, R. (1983) "Potentiation of turbinate atrophy in pigs by long-term nasal colonization with *Pasteurella multocida*", *Am. J. Vet. Res*. 44(3), pp. 372-8.

Gram, T. & Ahrens, P. (1998) "Improved diagnostic PCR assay for *Actinobacillus pleuropneumoniae* based on the nucleotide sequence of an outer membrane lipoprotein". *J Clin Microbiol*. 36(2), pp. 443-448. doi:10.1128/JCM.36.2.443-448.1998.

Gutiérrez, C., Rodríguez Barbosa, J., Suárez J, J., González. OR, Tascón. RI & Ferri, E. (1995) "Efficacy of a variety of disinfectants against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1", *Am J Vet Res*. 56(8), pp 1025-1029.

Halbur, P. G., Paul, P. S., Frey, M. L., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, X. J., Andrews, J. J., Lum, M. A. & Rathje, J. A. (1996) "Comparison of the antigen distribution of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus". *Vet Pathol*, 33(2), pp. 159-170. doi:10.1177/030098589603300205.

## Bibliografía

---

Hernando-Amado, S., Coque, T. M., Baquero, F. & Martínez, J. L. (2019) "Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives". *Nat Microbiol.* 4(9), pp. 1432-1442. doi:10.1038/S41564-019-0503-9.

Huang, Y., Li, C. Y., Pattison, D. L., Gray, W. M., Park, S. & Gibson, S. I. (2010) "SUGAR-INSENSITIVE3, a RING E3 Ligase, Is a New Player in Plant Sugar Response", *Plant Physiology*. Oxford University Press, 152(4), p. 1889. doi:10.1104/PP.109.150573.

Isaeva, V. I., Vedenyapina, M. D., Kurmysheva, A. Y., Weichgrebe, D., Nair, R. R., Nguyen, N. P. T. & Kustov, L. M. (2021) "Modern Carbon-Based Materials for Adsorptive Removal of Organic and Inorganic Pollutants from Water and Wastewater". *Molecules*. 26(21). doi:10.3390/MOLECULES26216628.

Jackman, J. A., Boyd, R. D. & Elrod, C. C. (2020) "Medium-chain fatty acids and monoglycerides as feed additives for pig production: towards gut health improvement and feed pathogen mitigation", *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 11(1). doi:10.1186/S40104-020-00446-1.

Jácome-Roca, A. (2017) "Historia de los Medicamentos: De hierbas, remedios, fórmulas secretas y fármacos". Bogotá, Colombia. *An. R. Acad. Nac. Med.* 3, pp. 0-350. ISBN 958-97117-9-0.

Jensen, H. H. & Hayes, D. J. (2014) "Impact of Denmark's ban on antimicrobials for growth promotion". *Curr. Opin. Microbiol.* 19(1), pp. 30-36. doi:10.1016/J.MIB.2014.05.020.

Jim O'Neil (2016) "Review on antimicrobial resistance: tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations". Londres, Reino Unido. Wellcome Trust. pp- 0-80. Disponible en: [https://amr-review.org/sites/default/files/160518\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf)

Kabara, J. J., Swieczkowski, D. M., Conley, A. J. & Truant, J. P. (1972) "Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2(1), pp. 23-28.

Ke, S., Fang, S., He, M., Huang, X., Yang, H., Yang, B., Chen, C. & Huang, L. (2019) "Age-based dynamic changes of phylogenetic composition and interaction networks of health pig gut microbiome feeding in a uniformed condition", *BMC Vet. Res.* 15(1). doi:10.1186/S12917-019-1918-5.

Kehrenberg, C., Salmon, S. A., Watts, J. L. & Schwarz, S. (2001) "Tetracycline resistance genes in isolates of *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*,

## Bibliografía

---

*Mannheimia glucosida* and *Mannheimia varigena* from bovine and swine respiratory disease: intergeneric spread of the tet(H) plasmid pMHT1". J. Antimicrob. Chemother. 48(5), pp. 631-640. doi:10.1093/JAC/48.5.631.

Kenny, J. G., Ward, D., Josefsson, E., Jonsson, I. M., Hinds, J., Rees, H. H., Lindsay, J. A., Tarkowski, A. & Horsburgh, M. J. (2009) "The *Staphylococcus aureus* response to unsaturated long chain free fatty acids: survival mechanisms and virulence implications". PLoS One. 4(2), p. e4344. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0004344.

Kerdsin, A., Akeda, Y., Hatrongjit, R., Detchawna, U., Sekizaki, T., Hamada, S., Gottschalk, M. & Oishi, K. (2014) "*Streptococcus suis* serotyping by a new multiplex PCR". J Med Microbiol. 63(Pt 6), pp. 824-830. doi:10.1099/JMM.0.069757-0.

Laanen, M., Beek, J., Ribbens, S., Vangroenweghe, F., Maes, D. & Dewulf, J. (2010) "Biosecurity on pig herds: development of an on-line scoring system and the results of the first 99 participating herds". Vlaams. Diergeneeskd. Tijdschr. 79(4) pp. 302-306.

Law, K., Lozinski, B., Torres, I., Davison, S., Hilbrands, A., Nelson, E., Parra-Suescun, J., Johnston, L. & Gomez, A. (2021) "Disinfection of maternal environments is associated with piglet microbiome composition from birth to weaning". mSphere. 6(5). doi:10.1128/MSPHERE.00663-21.

Lekagul, A., Tangcharoensathien, V. & Yeung, S. (2019) "Patterns of antibiotic use in global pig production: A systematic review". Vet. Anim. Sci. 7, p. 100058. doi:10.1016/J.VAS.2019.100058.

Levis, D. G., Emeritus, P., Rodney Baker, L. B. & Clinician, S. (2011) "Biosecurity of Pigs and Farm Security". The Board Regent. Univ. of Nebraska. p. 0-31. <https://extensionpublications.unl.edu/assets/pdf/ec289.pdf>

Lim, S., Shi, J. L., von Gunten, U. & McCurry, D. L. (2022) "Ozonation of organic compounds in water and wastewater: a critical review". Water Res. p. 118053. doi:10.1016/J.WATRES.2022.118053.

López-Serrano, S., Galofré-Milà, N., Costa-Hurtado, M., Pérez-De-Rozas, A. M., Aragon, V. & Aragon, V. (2020) "Heterogeneity of *Moraxella* isolates found in the nasal cavities of piglets". BMC Vet. Res. 16(1). doi:10.1186/S12917-020-2250-9.

## Bibliografía

---

Lorenzo de Arriba, M., Lopez-Serrano, S., Galofre-Mila, N. & Aragon, V. (2018) "Characterisation of *Bergeyella spp.* isolated from the nasal cavities of piglets". Vet J, 234. pp. 1-6. doi:10.1016/J.TVJL.2018.01.004.

Macedo, N., Rovira, A. & Torremorell, M. (2015) "*Haemophilus parasuis*: infection, immunity and enrofloxacin". Vet. Res. BioMed Central, 46(1), p. 128. doi:10.1186/S13567-015-0263-3.

Maertens, H., De Reu, K., Van Weyenberg, S., Van Coillie, E., Meyer, E., Van Meirhaeghe, H., Van Immerseel, F., Vandenbroucke, V., Vanrobaeys, M. & Dewulf, J. (2018) "Evaluation of the hygienogram scores and related data obtained after cleaning and disinfection of poultry houses in Flanders during the period 2007 to 2014". Poult. Sci. 97(2), pp. 620-627. doi:10.3382/PS/PEX327.

Mahmmod, Y. S., Correa-Fiz, F. & Aragon, V. (2020) "Variations in association of nasal microbiota with virulent and non-virulent strains of *Glaesserella (Haemophilus) parasuis* in weaning piglets". Vet. Res. 51(1). doi:10.1186/S13567-020-0738-8.

Maria Cardinal, K., Kipper, M., Andretta, I. & Machado Leal Ribeiro, A. (2019) "Withdrawal of antibiotic growth promoters from broiler diets: performance indexes and economic impact". Poult. Sci. 98(12), pp. 6659-6667. doi:10.3382/PS/PEZ536.

Mariadason, J. M., Barkla, D. H. & Gibson, P. R. (1997) "Effect of short-chain fatty acids on paracellular permeability in Caco-2 intestinal epithelium model", <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1997.272.4.G705>. American Physiological Society Bethesda, MD , 272(4 35-4). doi:10.1152/AJPGI.1997.272.4.G705.

Marston, H. D., Dixon, D. M., Knisely, J. M., Palmore, T. N. & Fauci, A. S. (2016) "Antimicrobial Resistance". JAMA. 316(11), pp. 1193-1204. doi:10.1001/JAMA.2016.11764.

Martínez-López, J., Moreno-Flores, A., Zamora-López, M. J. & Álvarez-García, P. (2013) "Celulitis por mordedura de gato: *Bergeyella zoohelcum*". Med Clin. 141(11), pp. 509-510. doi:10.1016/J.MEDCLI.2013.02.030

Martínez-Martínez, S., Yubero-Delgado, S., Rodríguez-Ferri, E.-F., Frandoloso R., Álvarez-Estrada, Á. & Gutiérrez-Martín, C. B. (2016) "*In vitro* efficacy of several disinfectants against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and *Escherichia coli* strains from poultry". SciELO Bra. doi:10.1590/0103-8478cr20151288.

Matsue, M., Mori, Y., Nagase, S., Sugiyama, Y., Hirano, R., Ogai, K., Ogura, K.,

## Bibliografía

---

Kurihara, S. & Okamoto, S. (2019) "Measuring the antimicrobial activity of lauric acid against various bacteria in human gut microbiota using a new method". *Cell Transplantat.* 28(12), p. 1528. doi:10.1177/0963689719881366.

May, B. J., Zhang, Q., Li, L. L., Paustian, M. L., Whittam, T. S. & Kapur, V. (2001) "Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(6), pp. 3460-3465. doi:10.1073/PNAS.051634598.

Michael, G. B., Bossé, J. T. & Schwarz, S. (2018) "Antimicrobial resistance in *Pasteurellaceae* of veterinary origin". *Microbiol Spectr.* 6(3). doi:10.1128/MICROBIOLSPEC.ARBA-0022-2017.

Niazy, M., Hill, S., Nadeem, K., Ricker, N. & Farzan, A. (2022) "Compositional analysis of the tonsil microbiota in relationship to *Streptococcus suis* disease in nursery pigs in Ontario", *Anim Microbiome.* 4(1), pp. 1-13. doi:10.1186/S42523-022-00162-3.

Oehler, R. L., Velez, A. P., Mizrachi, M., Lamarche, J. & Gompf, S. (2009) "Bite-related and septic syndromes caused by cats and dogs". *Lancet Infect Dis.* 9(7), pp. 439-447. doi:10.1016/S1473-3099(09)70110-0.

Oh, Y. H., Moon, D. C., Lee, Y. J., Hyun, B. H. & Lim, S. K. (2019) "Genetic and phenotypic characterization of tetracycline-resistant *Pasteurella multocida* isolated from pigs", *Vet Microbiol*, 233, pp. 159-163. doi:10.1016/J.VETMIC.2019.05.001.

Opriessnig, T., Giménez-Lirola, L. G. & Halbur, P. G. (2011) "Polymicrobial respiratory disease in pigs", *Animal Health Research Reviews.* Cambridge University Press, 12(2), pp. 133-148. doi:10.1017/S1466252311000120.

PAHO & OMS (2016) "Enterobacterias con resistencia transferible a colistina, implicaciones para la salud pública en las Américas". Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/10-junio-2016-enterobacterias-con-resistencia-transferible-colistina-implicaciones-para> (Accedido: 22 de febrero de 2022).

Pandiselvam, R., Kaavya, R., Jayanath, Y., Veenuttranon, K., Lueprasitsakul, P., Divya, V., Kothakota, A. & Ramesh, S. V. (2020) "Ozone as a novel emerging technology for the dissipation of pesticide residues in foods—a review". *Trends Food Sci Technol.* 97, pp. 38-54. doi:10.1016/J.TIFS.2019.12.017.

Pandiselvam, R., Sunoj, S., Manikantan, M. R., Kothakota, A. & Hebbar, K. B. (2017) "Application and Kinetics of Ozone in Food Preservation". *Ozone Sci Eng.* 39(2), pp. 115-126. doi:10.1080/01919512.2016.1268947.

## Bibliografía

---

Pearce, G. P. (1999) "Epidemiology of enteric disease in grower-finisher pigs: a postal survey of pig producers in England". *Vet Rec.* 144(13), pp. 338-342. doi:10.1136/VR.144.13.338.

Petersen, K. D., Christensen, J. P., Permin, A. & Bisgaard, M. (2001) "Avian Pathology Virulence of *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* isolated from outbreaks of fowl cholera in wild birds for domestic poultry and game birds". *Avian Pathol.* 30(1), pp. 27-31. doi:10.1080/03079450020023168.

Petrocchi-Rilo, M., Gutiérrez-Martín, C. B., Méndez-Hernández, J. I., Rodríguez-Ferri, E. F. & Martínez-Martínez, S. (2018) "Antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolates recovered from swine pneumonia in Spain throughout 2017 and 2018". *Vet Anim Sci*, 7. doi:10.1016/J.VAS.2018.100044.

Petrocchi-Rilo, M., Martínez-Martínez, S., Aguarón-Turrientes, Á., Roca-Martínez, E., García-Iglesias, M. J., Pérez-Fernández, E., González-Fernández, A., Herencia-Lagunar, E. & Gutiérrez-Martín, C. B. (2021) "Anatomical site, typing, virulence gene profiling, antimicrobial susceptibility and resistance genes of *Streptococcus suis* isolates recovered from pigs in Spain". *Antibiotics.* 10(6). doi:10.3390/ANTIBIOTICS10060707.

Pluske, J., Turpin, D., Abraham, S., Collins, A. & Dunshea, F. (2018) "2C-125: Lauric acid, a potentially new feed additive for the Australian pork industry". *Pork CRC.* <https://apri.com.au/wp-content/uploads/2021/04/Pork-CRC-II-Research-Summaries-2011-2019.pdf>

Postma, M., Backhans, A., Collineau, L., Loesken, S., Sjölund, M., Belloc, C., Emanuelson, U., Beilage, E. G., Nielsen, E. O., Stärk, K. D. C., Dewulf, J., Andreasen, M., Liesner, B. G., Körk, C. A., Lindberg, A., Lösken, S., Seemer, H., Stärk, K. & Visschers, V. (2016) "Evaluation of the relationship between the biosecurity status, production parameters, herd characteristics and antimicrobial usage in farrow-to-finish pig production in four EU countries", *Porc. Health Manag.* 2(1), pp. 1-11.

Prado-Silva, L., Cadavez, V., Gonzales-Barron, U., Rezende, A. C. B. & Sant'Ana, A. S. (2015) "Meta-analysis of the effects of sanitizing treatments on *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* inactivation in fresh produce". *Appl. Environ. Microbiol.* 81(23), pp. 8008-8021. doi:10.1128/AEM.02216-15.

Rasschaert, G., Michiels, J., Tagliabue, M., Missotten, J., De Smet, S. & Heyndrickx, M. (2016) "Effect of Organic Acids on Salmonella Shedding and Colonization in Pigs on a Farm with High Salmonella Prevalence", *Journal of food*

## Bibliografía

---

protection. J Food Prot, 79(1), pp. 51-58. doi:10.4315/0362-028X.JFP-15-183.

Rebucci, R., Comi, M., Ghiringhelli, M., Giorgi, S., Cheli, F. & Bontempo, V. (2021) "Lauric acid saponified with calcium ameliorates indices of intestinal function and gut health in weaned piglets". Ital. J. Anim. Sci., 20(1), pp. 1479-1490. doi:10.1080/1828051X.2021.1944338.

Regula, Gertraud, Gail Scherba, Nohra E Mateus-Pinilla, C. A. L. and R. M. W. (2003) "The impact of endemic porcine reproductive and respiratory syndrome virus and other pathogens on reproductive performance in swine". J. Swine Health Prod. pp. 13-18.

Reicks, D. L. (2019) "Effective biosecurity to protect North American studs and clients from emerging infectious disease". Theriogenology. 137, pp. 82-87. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2019.05.041.

Rodrigues, G., Maximiano, M. R. & Franco, O. L. (2021) "Antimicrobial peptides used as growth promoters in livestock production". Appl Microbiol Biotechnol. 105(19), pp. 7115-7121. doi:10.1007/S00253-021-11540-3.

Rodríguez Ferri, E. F., Martínez, S., Frandoloso, R., Yubero, S. & Gutiérrez Martín, C. B. (2010) "Comparative efficacy of several disinfectants in suspension and carrier tests against *Haemophilus parasuis* serovars 1 and 5". Res Vet Sci. 88(3), pp. 385-389. doi:10.1016/J.RVSC.2009.12.001.

Rojo-Gimeno, C., Postma, M., Dewulf, J., Hogeveen, H., Lauwers, L. & Wauters, E. (2016) "Farm-economic analysis of reducing antimicrobial use whilst adopting improved management strategies on farrow-to-finish pig farms". Prev. Vet. Med., 129, pp. 74-87. doi:10.1016/J.PREVETMED.2016.05.001.

Romagosa A, et al., (2017) "Biosecurity must-haves for swine veterinarians". Global Ag Media. pp. 5-10. <https://www.thepigsite.com/news/2017/10/biosecurity-musthaves-for-swine-veterinarians> (Accedido: 27 de febrero de 2022).

Runnels, L. J. (1982) "Infectious atrophic rhinitis of swine.". Vet. Clin. N. Am. 4(2), pp. 301-319. doi:10.1016/S0196-9846(17)30107-6.

Salie, F., Eagles, P. F. K. & Leng, H. M. J. (1996) "Preliminary antimicrobial screening of four South African *Asteraceae* species". J Ethnopharmacol. 52(1), pp. 27-33. doi:10.1016/0378-8741(96)01381-5.

## Bibliografía

---

San Millan, A., Escudero, J. A., Catalan, A., Nieto, S., Farelo, F., Gibert, M., Moreno, M. A., Dominguez, L. & Gonzalez-Zorn, B. (2007) " $\beta$ -lactam resistance in *Haemophilus parasuis* is mediated by plasmid *pB1000* bearing *blaROB-1*", *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(6), p. 2260. doi:10.1128/AAC.00242-07.

Sánchez del Rey, V., Fernández-Garayzábal, J. F., Domínguez, L., Gottschalk, M. & Vela, A. I. (2016) "Screening of virulence-associated genes as a molecular typing method for characterization of *Streptococcus suis* isolates recovered from wild boars and pigs". *Vet J.* 209, pp. 108-112. doi:10.1016/J.TVJL.2015.11.007.

Sayago-Ayerdi, S. (2008) "Sefulness and controversial issues of middle-chain fatty acids consumption on lipid-protein metabolism and obesity.", *Nutr Hosp.*, 23(3). ISSN 1699-5198.

Schauber, J., Svanholm, C., Termén, S., Iffland, K., Menzel, T., Scheppach, W., Melcher, R., Agerberth, B., Lührs, H. y Gudmundsson, G. H. (2003) "Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways", *Gut. Gut.*, 52(5), pp. 735-741. doi:10.1136/GUT.52.5.735.

Scheffers, D.-J. & Pinho, M. G. (2005) "Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69(4), pp. 585-607. doi:10.1128/MMBR.69.4.585-607.2005/ASSET/9F897456-BDA0-4B67-A8F7-2B56D2CBBDF/ASSETS/GRAPHIC/ZMR0040521020006.JPEG.

Schultsz, C., Jansen, E., Keijzers, W., Rothkamp, A., Duim, B., Wagenaar, J. A. & van der Ende, A. (2012) "Differences in the population structure of invasive *Streptococcus suis* strains isolated from pigs and from humans in the Netherlands". *PloS One.* 7(5), p. e33854. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0033854.

Schumann, P. (2011) "Peptidoglycan sructure". *Methods Microbiol.*, 38, pp. 101-129. doi:10.1016/B978-0-12-387730-7.00005-X.

Raf, J. & Burhan, S. T. (2018) "Evaluation of inhibitory activity of some natural materials on biofilms formed on fresh fish cutting boards". *AJMS.* 27(2), pp. 26-34. doi:10.33899/RJS.2018.145388.

Scott, H. M., Acuff, G., Bergeron, G., Bourassa, M. W., Gill, J., Graham, D. W., Kahn, L. H., Morley, P. S., Salois, M. J., Simjee, S., Singer, R. S., Smith, T. C., Storrs, C. & Wittum, T. E. (2019) "Critically important antibiotics: criteria and approaches for measuring and reducing their use in food animal agriculture". *Ann. N. Y. Acad. Sci. Ltd.* 1441(1), pp. 8-16. doi:10.1111/NYAS.14058.

## Bibliografía

---

Shilling, M., Matt, L., Rubin, E., Visitacion, M. P., Haller, N. A., Grey, S. F. & Woolverton, C. J. (2013) "Antimicrobial effects of virgin coconut oil and its medium-chain fatty acids on *Clostridium difficile*", J. Med. Food. 16(12), pp. 1079-85. doi:10.1089/jmf.2012.0303.

Ślizewska, K. & Chlebicz, A. (2019) "Synbiotics impact on dominant faecal microbiota and short-chain fatty acids production in sows". FEMS Microbiol. Lett. 366(13), p. 157. doi:10.1093/FEMSLE/FNZ157.

Speksnijder, D. C., Mevius, D. J., Brusckke, C. J. M. & Wagenaar, J. A. (2015) "Reduction of veterinary antimicrobial use in the Netherlands. The Dutch success model". Zoonoses Public Health. 62 Suppl 1(s1), pp. 79-87. doi:10.1111/ZPH.12167.

Stan, C., Balasoiu, M., Buzatu, D. & Cristescu, C. P. (2017) "Multifractal analysis of CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/lauric acid/DDS-Na/H<sub>2</sub>O ferrofluid from transmission electron microscopy measurements". J Comput Theor Nanosci . 14(4), pp. 2030-2034. doi:10.1166/JCTN.2017.6538.

Vander Stichele, R. H., Elseviers, M. M., Ferech, M., Blot, S. & Goossens, H. (2004) "European surveillance of antimicrobial consumption (ESAC): data collection performance and methodological approach". Br. J. Clin. Pharmacol. 58(4), pp. 419-428. doi:10.1111/J.1365-2125.2004.02164.X.

Swann, J. R., Want, E. J., Geier, F. M., Spagou, K., Wilson, I. D., Sidaway, J. E., Nicholson, J. K. & Holmes, E. (2011) "Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Proc Natl Acad Sci U S A, 108 Suppl 1(Suppl 1), pp. 4523-4530. doi:10.1073/PNAS.1006734107.

Swann, M. M., Baxter, K. L., Field, H. I., Howie, J. W., Lucas, I. A. M., Millar, E. L. M., & White, E. G. (1969). "report of the joint committee on the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine". HMSO. pp. 1-82.

Terry, M. L. O., Ward, C. K. & Inzana, T. J. (1998) "Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 by multiplex PCR. J Clin Microbiol. 36(6), pp. 1704-1710. doi:10.1128/JCM.36.6.1704-1710.1998.

Thacker, E. L., Halbur, P. G., Ross, R. F., Thanawongnuwech, R. & Thacker, B. J. (1999) "*Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia". J Clin Microbiol. 37(3), pp. 620-627. doi:10.1128/JCM.37.3.620-627.1999.

## Bibliografía

---

Thanawongnuwech, R., Thacker, E. L. & Halbur, P. G. (1997) "Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) (isolate ATCC VR-2385) infection on bactericidal activity of porcine pulmonary intravascular macrophages (PIMs): *in vitro* comparisons with pulmonary alveolar macrophages (PAMs)". *Veterinary immunology and immunopathology*. *Vet Immunol Immunopathol.* 59(3-4), pp. 323-335. doi:10.1016/S0165-2427(97)00078-0.

Thomas, R. E., Thomas, B. C., Conly, J. & Lorenzetti, D. (2022) "Cleaning and disinfecting surfaces in hospitals and long-term care facilities for reducing hospital- and facility-acquired bacterial and viral infections: a systematic review. *J Hosp Infect.* 122, pp. 9-26. doi:10.1016/J.JHIN.2021.12.017.

Timbermont, L., Lanckriet, A., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. & Van Immerseel, F. (2009) "Intra-species growth-inhibition by *Clostridium perfringens* is a possible virulence trait in necrotic enteritis in broilers", *Veterinary microbiology*. *Vet Microbiol*, 137(3-4), pp. 388-391. doi:10.1016/J.VETMIC.2009.01.017.

Torres, C. & Zarazaga, M. (2002) "Antibiotics as growth promoters in animals. Are we going down the right road?". *Gac Sanit*, 16(2). pp. 109-112. doi:10.1016/S0213-9111(02)71640-3.

Townsend, K. M., Frost, A. J., Lee, C. W., Papadimitriou, J. M. & Dawkins, H. J. S. (1998) "Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates". *J Clin Microbiol.* 36(4), pp. 1096-1100. doi:10.1128/JCM.36.4.1096-1100.1998.

Turnidge, J., Kahlmeter, G. & Kronvall, G. (2006) "Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values". *Clin Microbiol Infect.* 12(5), pp. 418-425. doi:10.1111/J.1469-0691.2006.01377.X.

Uryu, H., Tsukahara, T., Ishikawa, H., Oi, M., Otake, S., Yamane, I. & Inoue, R. (2020) "Comparison of productivity and fecal microbiotas of sows in commercial farms". *Microorganisms.* 8(10), pp. 1-12. doi:10.3390/MICROORGANISMS8101469.

Valdes-Donoso, P., Alvarez, J., Jarvis, L. S., Morrison, R. B. & Perez, A. M. (2018) "Production losses from an endemic animal disease: Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in selected Midwest US Sow Farms". *Front. Vet. Sci.* 16(5) pp. 102. doi:10.3389/FVETS.2018.00102/FULL.

## Bibliografía

---

Vera Lizarazo, Y. A., Rodríguez Ferri, E. F., Martín de la Fuente, A. J. & Gutiérrez Martín, C. B. (2006) "Evaluation of changes in antimicrobial susceptibility patterns of *Pasteurella multocida* subsp *multocida* isolates from pigs in Spain in 1987-1988 and 2003-2004". *Am J Vet Res.* 67(4), pp. 663-668. doi:10.2460/AJVR.67.4.663.

Verma, S., Sharma, M., Katoch, S., Verma, L., Kumar, S., Dogra, V., Chahota, R., Dhar, P. & Singh, G. (2013) "Profiling of virulence associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cattle". *Vet Res Commun.* 37(1), pp. 83-89. doi:10.1007/S11259-012-9539-5.

Vilaró, A., Novell, E., Enrique-Tarancón, V., Balielles, J., Allué, E. & Fraile, L. (2020) "Antimicrobial stewardship for respiratory pathogens in swine". *Antibiotics.* 9(11), pp. 1-11. doi:10.3390/ANTIBIOTICS9110727.

Vilaró, A., Novell, E., Enrique-Tarancón, V., Balielles, J., Vilalta, C., Martínez, S. & Sauce, L. J. F. (2020) "Antimicrobial susceptibility pattern of porcine respiratory bacteria in Spain". *Antibiotics.* 9(7), pp. 1-13. doi:10.3390/ANTIBIOTICS9070402.

Villegas Vázquez, A. L., Campuzano-Ocampo, V. M., Hernández-Castro, R., Suárez-Güemes, F., Trigo Tavera, F. J. & Jaramillo-Arango, C. J. (2014) "Caracterización de los tipos capsulares de *Pasteurella multocida* en exudado faríngeo de bovinos productores de carne clínicamente sanos en el estado de Querétaro". *Vet. Mex. UNAM*, 45(SPE), pp. 19-28. ISSN: 0301-5092.

Vollmer, W., Blanot, D. & De Pedro, M. A. (2008) "Peptidoglycan structure and architecture". *FEMS Microbiol. Rev.* 32(2), pp. 149-167. doi:10.1111/J.1574-6976.2007.00094.X.

Wales, A. D., Cook, A. J. C. & Davies, R. H. (2011) "Producing *Salmonella*-free pigs: a review focusing on interventions at weaning". *Vet Rec.* 168(10), pp. 267-276. doi:10.1136/VR.D1125.

Wang, T., He, Q., Yao, W., Shao, Y., Li, J. & Huang, F. (2019) "The variation of nasal microbiota caused by low levels of gaseous ammonia exposure in growing pigs". *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10(5), p. 1083. doi:10.3389/FMICB.2019.01083/BIBTEX.

Weber, D., Wolfson, J., Swartz, M. & Hooper, D. (1984) "*Pasteurella multocida* infections: Report of 34 cases and review of the literature", *Medicine.* 63(3), pp. 133-154. doi:10.17615/AVDA-K325.

## Bibliografía

---

Weese, J. S. (2020) "*Clostridium (Clostridioides) difficile* in animals". J Vet Diagn Invest. s, 32(2), p. 213. doi:10.1177/1040638719899081.

Yang, C., Zhang, L., Cao, G., Feng, J., Yue, M., Xu, Y., Dai, B., Han, Q. & Guo, X. (2019) "Effects of dietary supplementation with essential oils and organic acids on the growth performance, immune system, fecal volatile fatty acids, and microflora community in weaned piglets". J Anim Sci. 97(1), pp. 133-143. doi:10.1093/JAS/SKY426.

Yang, H. T., Chen, J. W., Rathod, J., Jiang, Y. Z., Tsai, P. J., Hung, Y. P., Ko, W. C., Paredes-Sabja, D. & Huang, I. H. (2018) "Lauric acid is an inhibitor of *Clostridium difficile* growth in vitro and reduces inflammation in a mouse infection model". Front. Microbiol. 8(1). doi:10.3389/fmicb.2017.02635.

Yang, H., Yang, M., Fang, S., Huang, X., He, M., Ke, S., Gao, J., Wu, J., Zhou, Y., Fu, H., Chen, C. & Huang, L. (2018) "Evaluating the profound effect of gut microbiome on host appetite in pigs". BMC Microbiol. 18(1). doi:10.1186/S12866-018-1364-8.

Yu, Y., Fang, J. T., Zheng, M., Zhang, Q., Walsh, T. R., Liao, X. P., Sun, J. & Liu, Y. H. (2018) "Combination therapy strategies against multiple-resistant *Streptococcus suis*". Front. Pharmacol. 9(5), p. 489. doi:10.3389/FPHAR.2018.00489/FULL.

Zhang, L., Luo, Y., Wang, W., Sun, Y., Zhang, J., Fatima, M., Jia, X. & Qiu, H. J. (2020) "Efficient inactivation of African swine fever virus by ozonized water". Vet Microbiol. 247. doi:10.1016/J.VETMIC.2020.108796.

Zheng, C. J., Yoo, J. S., Lee, T. G., Cho, H. Y., Kim, Y. H. & Kim, W. G. (2005) "Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids", FEBS Lett. 579(23), pp. 5157-5162. doi:10.1016/J.FEBSLET.2005.08.028.

Zheng, H., Du, P., Qiu, X., Kerdsin, A., Roy, D., Bai, X., Xu, J., Vela, A. I. & Gottschalk, M. (2018) "Genomic comparisons of *Streptococcus suis* serotype 9 strains recovered from diseased pigs in Spain and Canada", Vet. Res. BioMed Central Ltd., 49(1), pp. 1-13. doi:10.1186/S13567-017-0498-2/FIGURES/4.

Zimmerman, J. J., Yoon, K. J., Wills, R. W. & Swenson, S. L. (1997) "General overview of PRRSV: a perspective from the United States". Vet Microbiol. 55(1-4), pp. 187-196. doi:10.1016/S0378-1135(96)01330-2.



# 8. ANEXOS



**ANEXO 1. Composición del pienso *starter***



## Anexos

<b>EMPRESA :</b>	PROGATECSA		
<b>FÓRMULA :</b>	00039-T20		
<b>REFERENCIA :</b>			
<b>COMENTARIO :</b>	STARTER --		
<b>FABRICACIÓN :</b>	multiformulación T20	<b>FECHA FAB. :</b>	01/10/2021 11:37:08
<b>C. PROPIA :</b>			
<b>PRECIO :</b>	<b>388,18 €/Tm.</b>	64,588 Ptas/Kg.	

### SOLUCIÓN

C. PROPIA	CÓDIGO	INGREDIENTES	SOLUCIÓN	KG. ACUM.	PRECIO	COSTE M.P.
	00122	TRIGO NAC/PG	28,066	421,000	250,000	70,166
	00121	CEBADA NAC 2C/PG	25,000	375,000	240,000	60,000
	00129	MAIZ NACIONAL PG	21,000	315,000	270,000	56,700
	00252	SOJA 47 PG	14,466	217,000	400,000	57,866
	S0157	HP-300/CC	4,000	60,000	875,000	35,000
	S0193	ACEITE DE SOJA	2,133	32,000	1.175,000	25,066
	S0164	PESCADO 70 LT	1,533	23,000	1.360,000	20,853
	S0216	LISINA 50 LIQUID	0,826	12,400	900,000	7,440
	S0201	CARBONATO CÁLCICO	0,543	8,150	30,000	0,162
	S0203	SAL	0,533	8,000	80,000	0,426
	00126	CORR. STARTER MINTREX CU	0,400	6,000	2.010,000	8,040
	S0220	FOSFATO MONOCÁLCICO	0,400	6,000	635,000	2,540
	S0218	L-TREONINA	0,226	3,400	2.000,000	4,533
	00238	SECURE	0,200	3,000	6.210,000	12,420
	00245	SECUESTRANTE	0,153	2,300	2.950,000	4,523
	S0204	DL-METIONINA	0,133	2,000	2.690,000	3,586
	00247	BUTIRATO	0,100	1,500	2.900,000	2,900
	S0233	L-VALINA	0,093	1,400	4.000,000	3,733
	S0219	L-TRIPTÓFANO	0,080	1,200	8.500,000	6,800
	00271	ENZYMAS	0,060	0,900	2.019,000	1,211
	00248	PROBIOTICO	0,040	0,600	8.750,000	3,500
	S0279	EDULCORANTE	0,010	0,150	7.120,000	0,712
			99,999	1.500,000		

### ANÁLISIS DE RESTRICCIONES

NUTRIENTES	SOLUCIÓN
PESO	100,000
HUMEDAD	10,947
PROTEINA BRUTA	18,523
GRASA BRUTA	4,000
AC. LINOLEICO	1,904
FIBRA BRUTA	3,262
F.A.D.	4,235
F.N.D.	10,901
ALMIDON Ewers	44,730
AZUCARES	2,841
CENIZAS	4,384
CALCIO	0,647
CALCIO DIG. PORC. AP.	0,377
FOSFORO TOTAL	0,468
FOSFORO DISPONIBLE	0,353
FOSFORO DIG. PORC. AP.	0,348
FOSFORO FITICO	0,225
SODIO	0,271
CLORO	0,386
CLORUROS	0,647
BALANCE ELECTROLÍTICO	192,718
LISINA	1,292
METIONINA	0,480
METIONINA-CISTINA	0,782
TREONINA	0,858



## Anexos

<b>EMPRESA :</b>	PROGATECSA		
<b>FÓRMULA :</b>	00039-T20		
<b>REFERENCIA :</b>			
<b>COMENTARIO :</b>	STARTER --		
<b>FABRICACIÓN :</b>	multiformulación T20	<b>FECHA FAB. :</b>	01/10/2021 11:37:08
<b>C.PROPIA :</b>			
<b>PRECIO :</b>	<b>388,18 €/Tm.</b>	64,588 Ptas/Kg.	

### ANÁLISIS DE RESTRICCIONES

NUTRIENTES	SOLUCIÓN
TRIPTÓFANO	0,290
LEUCINA	1,349
ISOLEUCINA	0,716
VALINA	0,916
HISTIDINA	0,446
E.N. PORCINO-ST (Mcal/kg)	2,485
E.D. PORCINO-ST (Mcal/kg)	3,526
E.N. CERDA-ST (Mcal/kg)	2,517
PROTEÍNA DIGESTIBLE PORC. (SID)	15,786
LISINA DIG. PORC. (SID)	1,217
METIONINA DIG. PORC. (SID)	0,461
MET+ CYS DIG.PORC. (SID)	0,729
TREONINA DIG. PORC. (SID)	0,793
TRIPTÓFANO DIG.PORC. (SID)	0,271
LEUCINA DIG. PORC. (SID)	1,212
ISOLEUCINA DIG. PORC. (SID)	0,650
VALINA DIG. PORC. (SID)	0,830
FENILALANINA DIG.PORC. (SID)	0,764
FEN+ TYR DIG. PORC. (SID)	1,290
HISTIDINA DIG. PORC. (SID)	0,400
Lisina Dig. Porc. SINTÉTICA	0,413
ÍNDICE GLICÉMICO	8,967
CALIDAD GRANULO	4,814

**ANEXO 2. Composición del pienso pre-*starter***



## Anexos

<b>EMPRESA :</b>	PROGATECSA		
<b>FÓRMULA :</b>	00034-T22		
<b>REFERENCIA :</b>	PRESTARTER		
<b>COMENTARIO :</b>	PRESTARTER --		
<b>FABRICACIÓN :</b>	multiformulación T22	<b>FECHA FAB. :</b>	31/10/2018 10:22:14
<b>C.PROPIA :</b>			
<b>PRECIO :</b>	<b>473,34 €/Tm.</b>	78,758	Ptas/Kg.

### SOLUCIÓN

C.PROPIA	CÓDIGO	INGREDIENTES	SOLUCIÓN	KG. ACUM.	PRECIO	COSTE M.P.
	00129	MAIZ NACIONAL PG	26,200	262,000	183,500	48,077
	00122	TRIGO NAC/PG	24,000	240,000	193,000	46,320
	00121	CEBADA NAC 2C/PG	10,000	100,000	190,000	19,000
	S0140	SOJA 47	9,700	97,000	329,000	31,913
	S0157	HP-300/CC	6,000	60,000	805,000	48,300
	S0179	SUERO DULCE	5,000	50,000	650,000	32,500
	S0164	PESCADO 70 LT	4,000	40,000	1.400,000	56,000
	S0087	DEXTROSA	3,750	37,500	590,000	22,125
	S0193	ACEITE DE SOJA	3,100	31,000	675,000	20,925
	S0183	SUERO REENGR-50	2,500	25,000	940,000	23,500
	S0159	PLASMA POLVO 80	1,000	10,000	4.390,000	43,900
	00244	OPTICELL	1,000	10,000	725,000	7,250
	S0216	LISINA 50 LIQUID	0,895	8,950	770,000	6,891
	S0220	FOSFATO MONOCÁLCICO	0,500	5,000	490,000	2,450
	00126	CORR. STARTER MINTREX CU	0,400	4,000	2.090,000	8,360
	S0203	SAL	0,300	3,000	80,000	0,240
	00238	SECURE	0,300	3,000	6.400,000	19,200
	S0201	CARBONATO CÁLCICO	0,295	2,950	30,000	0,088
	S0218	L-TREONINA	0,275	2,750	1.350,000	3,712
	00247	BUTIRATO	0,200	2,000	2.900,000	5,800
	S0204	DL-METIONINA	0,180	1,800	2.020,000	3,636
	S0233	L-VALINA	0,175	1,750	3.800,000	6,650
	S0219	L-TRIPTÓFANO	0,100	1,000	7.800,000	7,800
	00104	AMYLOFEED	0,050	0,500	6.000,000	3,000
	00248	PROBIOTICO	0,040	0,400	8.500,000	3,400
	S0279	EDULCORANTE	0,020	0,200	7.120,000	1,424
	00234	FITASA QUANTUM BLUE2500/500 PG	0,020	0,200	4.410,000	0,882
			100,000	1.000,000		

### ANÁLISIS DE RESTRICCIONES

NUTRIENTES	SOLUCIÓN
PESO	100,000
HUMEDAD	10,191
PROTEINA BRUTA	19,078
GRASA BRUTA	6,602
AC. LINOLEICO	2,565
FIBRA BRUTA	2,973
F.A.D.	3,673
F.N.D.	9,626
ALMIDON Ewers	36,007
AZUCARES	9,793
LACTOSA	4,250
CENIZAS	4,295
CALCIO	0,608
CALCIO DIG. PORC. AP.	0,325
FOSFORO TOTAL	0,534
FOSFORO DISPONIBLE	0,445
FOSFORO DIG. PORC. AP.	0,407
FOSFORO FITICO	0,188
SODIO	0,271
COLORO	0,425

## Anexos

<b>EMPRESA :</b>	PROGATECSA		
<b>FÓRMULA :</b>	00034-T22		
<b>REFERENCIA :</b>	PRESTARTER		
<b>COMENTARIO :</b>	PRESTARTER --		
<b>FABRICACIÓN :</b>	multiformulación T22	<b>FECHA FAB. :</b>	31/10/2018 10:22:14
<b>C. PROPIA :</b>			
<b>PRECIO :</b>	<b>473,34 €/Tm.</b>	78,758	Ptas/Kg.

### ANÁLISIS DE RESTRICCIONES

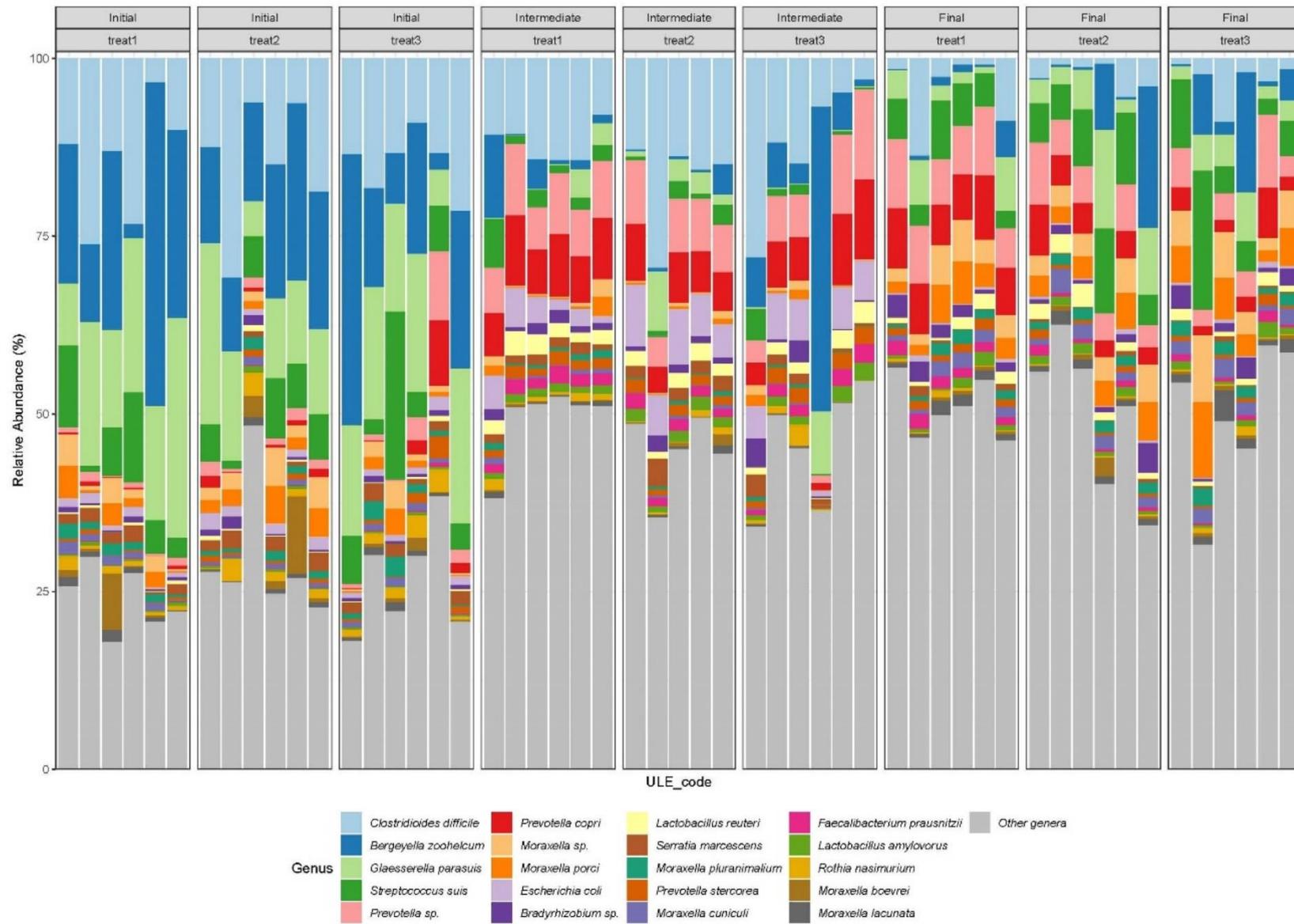
NUTRIENTES	SOLUCIÓN
CLORUROS	0,704
BALANCE ELECTROLÍTICO	193,011
LISINA	1,472
METIONINA	0,562
METIONINA-CISTINA	0,872
TREONINA	0,983
TRIPTÓFANO	0,326
E.N. PORCINO-ST (Mcal/kg)	2,587
E.D. PORCINO-ST (Mcal/kg)	3,527
E.N. CERDA-ST (Mcal/kg)	2,584
PROTEÍNA DIGESTIBLE PORC. (SID)	16,889
LISINA DIG. PORC. (SID)	1,393
METIONINA DIG. PORC. (SID)	0,541
MET+ CYS DIG.PORC. (SID)	0,821
TREONINA DIG. PORC. (SID)	0,906
TRIPTÓFANO DIG.PORC. (SID)	0,307
LEUCINA DIG. PORC. (SID)	1,274
ISOLEUCINA DIG. PORC. (SID)	0,678
VALINA DIG. PORC. (SID)	0,946
FENILALANINA DIG.PORC. (SID)	0,776
FEN+ TYR DIG. PORC. (SID)	1,307
HISTIDINA DIG. PORC. (SID)	0,422
Lisina Dig. Porc. SINTÉTICA	0,447
C18:0 Esteárico	0,190
C18:1 Oleico	1,055
C18:2 (n6) Linoléico (LA)	2,365
C18:3 (n3) α-Linolénico (ALA)	0,222
ÍNDICE GLICÉMICO	5,950
CALIDAD GRANULO	4,270



**ANEXO 3. Bacterias más abundantes identificadas en la microbiota nasal durante los tres muestreos, los análisis e imágenes fueron realizadas con la versión 3.6.2 del software R**



# Anexos

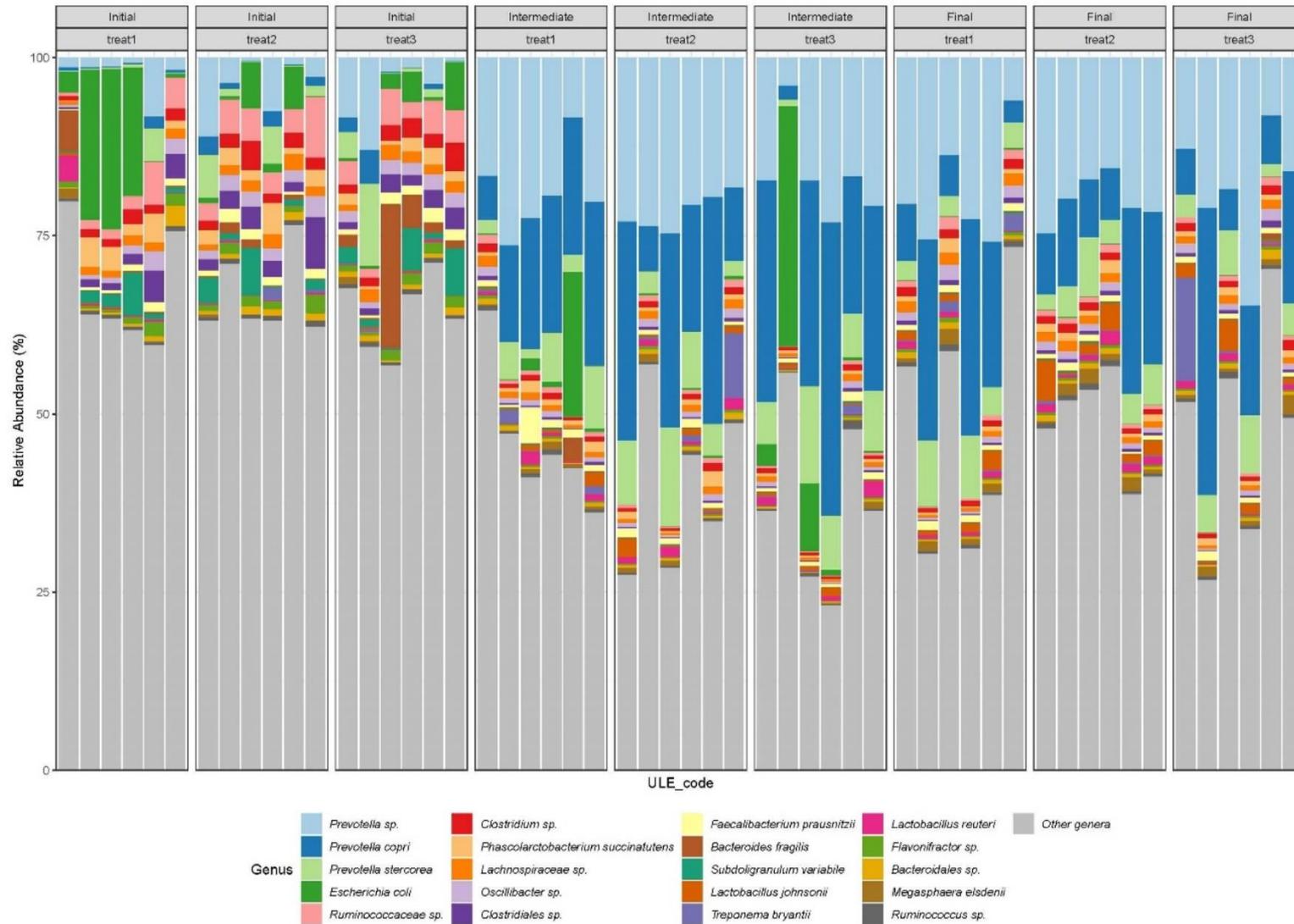




**ANEXO 4. Bacterias más abundantes identificadas en la microbiota fecal durante los tres muestreos, los análisis e imágenes fueron realizadas con la versión 3.6.2 del software R**



# Anexos





# 9. RESUMEN

## Resumen

---

## Resumen

---

Tradicionalmente el mal uso de los de antibióticos como promotores de crecimiento, así como su abuso profiláctico y metafiláctico ha llevado a las bacterias resistentes frente a antibióticos a una posición muy crítica para la salud humana y la sanidad animal. Por ello, las autoridades correspondientes a nivel nacional e internacional han diseñado diversos planes de control y vigilancia de este fenómeno, reduciendo en gran medida el uso de antibióticos. Las explotaciones ganaderas, más concretamente las intensivas de porcino, han empezado a realizar la transición para lograr la disminución de uso de los antibióticos, y también para que estas medidas afecten lo menos posible en la salud de los cerdos y a en los índices de producción. Para un conocimiento adecuado de las resistencias frente a antibióticos es fundamental estudiar el perfil de resistencias del microorganismo. Por ello, el aislamiento, identificación y perfil de resistencia de los microorganismos es un aspecto clave como estrategia para el control y tratamientos adecuados. Por otro lado, la bioseguridad en las granjas es otro de los aspectos que se deberían tener en cuenta, puesto que cuanto mejor es la limpieza y desinfección más probabilidad existe de cortar los ciclos de contagios entre lotes. Además, un ambiente más limpio mejora la salud general de los animales, previniendo la propagación de los microorganismos patógenos. Por último, el uso de aditivos alimentarios como antimicrobianos y moduladores de la microbiota está cada vez más en auge, como medidas alternativas al uso de antibióticos. Por todo lo anterior, en la presente Tesis Doctoral se ha abordado este problema desde los diferentes perspectivas.

La identificación de las especies bacterianas aisladas de muestras de origen respiratorio se realizó mediante PCR y MALDI-TOF, obteniendo 60 cepas de *Streptococcus suis*, 48 de *Pasteurella multocida*, 18 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, y 5 de *Glaesserella parasuis*

También se estudió el perfil de resistencia a los antibióticos. Las resistencias de *A. pleuropneumoniae* y *G. parasuis* se estudiaron mediante antibiogramas de disco. *A. pleuropneumoniae* fue sobre todo resistente a trimetoprima-sulfametoxazol y eritromicina, con un 61,1 % de aislados resistentes en ambos casos. Para *Glaesserella parasuis* se obtuvieron resistencias sobre todo para tetraciclina y ampicilina, con un 60 % de los aislados.

Por otro lado, *S. suis* y *P. multocida* fueron estudiados mediante el método Sensititre™. Para *P. multocida* se obtuvieron resistencias mayoritariamente para las lincosamidas (en un 94,4 % de los casos resistentes a clinfamicina). Para las sulfaminas y tiamulina se obtuvo un 55,5 % de aislados resistentes, y para resto de los antibióticos

## Resumen

---

probados se registró sensibilidad en al menos el 50 % de los aislados. Las proporciones más elevadas de resistencia entre los aislados de *S. suis* se observaron en las tetraciclinas con un 95 % y 93,3 % para la clortetraciclina y oxitetraciclina, respectivamente.

Además, en el caso de las dos especies bacterianas más prevalentes se realizó el estudio de genes, tanto de resistencia frente a antibióticos como de factores de virulencia. Respecto a los factores de virulencia, *S. suis* presentó un 6,7 % de los aislados positivos frente al gen *epf*; un 58,3 % positivos para el gen *mrp*, un 43,3 % para el gen *sly*, un 76,7 % para el gen *luxS* y un 53,3 % para el gen *gapd*. El gen más encontrado en estos aislados fue el *luxS*, presente en un 76,6 % de los aislados. Estudiando a *P. multocida* observamos que el total de los aislados fue positivo para el gen *oma87*, (48 aislados). Los genes *hgbA*, *nanH*, *ompH*, *ptfA* y *sodA* lo fueron en el 95,8% seguidos por el gen *tonB*, con un 83,3 % de casos positivos. Los genes menos prevalentes fueron el *toxA*, con un 27,1% de los aislados, el *pfhA*, con un 10,4%, y por el *tbpA*, con únicamente un aislado positivo.

Respecto a los genes de resistencia frente a antibióticos analizados en *S. suis*, de los cuatro estudiados, para las tetraciclinas el gen *tetO* estuvo presente en un 68,3 % de las bacterias, frente al *tetM*, presente únicamente en el 1,7 %. Para el estudio de los genes de resistencia frente a los macrólidos *ermB* se encontró en un 46,7 % de los aislados, del total, *MefA/E* estuvo presente en un 8,3 de los aislados. Para las resistencias frente a tetraciclinas, un 12,5 % de aislados fueron positivos frente al gen *tetA*, y un 39,6 % para *tetB*. Para la resistencia frente a  $\beta$ -lactámicos, el 27,1 % de los aislados presentaron el gen *bla<sub>ROB1</sub>* frente al 8,3 % de los aislados con *bla<sub>TEM</sub>*. Respecto a los macrólidos presentaron una resistencia de en 16,7 % para el gen *ermA*, del 41,7 % para el *ermC*, del 22,9 % para el *msrE* y de 0 % para el *mphE*.

En relación con el estudio de la acción de los desinfectantes, con el fin de mejorar la bioseguridad, se realizaron ensayos tanto *in vitro* como en granja, así como también se probaron nuevos métodos de desinfección, como la ozonización. Se analizó la capacidad de los desinfectantes más comunes en granja sobre bacterias ambientales y del CRP concluyendo que los desinfectantes polimorfo y limoseptic no funcionaron con la misma eficacia que los demás probados. También se realizaron pruebas *in vitro* con ozono y agua ozonizada. Existió una reducción del 100 % en el número de colonias en los 100 litros de aire a 1,5 ppm de ozono: por ello, para las bacterias presentes en el aire resultó muy eficaz. Para esta concentración de ozono y con agua ozonizada en

## Resumen

---

objetos de superficie irregular, la desinfección funcionó igual que el desinfectante convencional en comederos, bebederos y paredes, y mejor en el caso de las placas calefactoras, suelos y juguetes. Este hallazgo fue de gran interés, puesto que el ozono es un desinfectante que no deja residuos, siendo mejor para el medio ambiente. Tampoco necesita aclarado, mejorando así los tiempos de secado, lo que agiliza el tiempo de llenado con el siguiente lote de cerdos.

Teniendo en cuenta el uso de aditivos alimentarios como alternativa al uso de antibióticos, se realizaron estudios *in vitro* para evaluar la capacidad antibacteriana del ácido láurico, en bacterias Gram positivas y Gram negativas, realizándose determinaciones de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para las bacterias *S. suis* y *P. multocida*. En estos ensayos se incluyeron métodos basados en la difusión (tanto en placa como en disco) para cuantificar la inhibición de las bacterias frente a estos compuestos. También se realizó un estudio de microscopía electrónica de barrido para observar el efecto del ácido láurico frente a *S. suis*.

Los ensayos de difusión en placa no se pudieron llevar a cabo debido a las características físico-químicas del ácido láurico con el medio de cultivo, obteniéndose placas muy heterogéneas. Por otro lado, los métodos de difusión por disco sí se pudieron llevar a cabo sin ningún problema, obteniendo muy buenos resultados para el ácido láurico y monolaurina en el caso de ambas bacterias estudiadas y en concentraciones intermedias. Se estudiaron concentraciones desde 2,4 hasta 1500 mg/ml de ácido láurico o monolaurina al 5 %, obteniendo la inhibición para todas las concentraciones de ácido láurico en *S. suis*, y para *P. multocida* a partir de 40 mg/ml se obtuvieron inhibiciones del crecimiento bacteriano. Además; en el caso de *S. suis*, se realizó un estudio de microscopía electrónica de barrido, en el que se se pudo observar una disminución de la densidad bacteriana y cambios en su morfología al ser expuesto a 900 mg/ml de ácido láurico.

Por último, se valoró en un ensayo experimental en granja el efecto de suplementación de la dieta con dos dosis diferentes de ácido láurico. Esta experiencia se llevó a cabo en la etapa de transición, sobre 144 lechones destetados (25 días de edad), que se distribuyeron en tres grupos (dos corrales por grupo). Todos los grupos recibieron piensos sin antibióticos ni óxido de zinc. Los animales del primer grupo recibieron pienso *pre-starter* y *starter* sin aditivo, el segundo grupo recibió pienso suplementado con 2 kg de ácido láurico por tonelada y el último grupo suplementado a 4 kg/T. Los valores de ganancia media diaria (GMD) durante los 43 días del experimento

## Resumen

---

fueron muy similares en los tres casos, aunque algo más elevados en el grupo que recibió la dosis más alta de ácido láurico. El consumo de pienso fue más elevado en el grupo control (28,64 kg/cerdo), en comparación con los grupos que recibieron ácido láurico (grupo de 2 kg/T: 27,17 kg/cerdo y grupo 4 kg/T: 27,48 kg/cerdo). Finalmente, el índice de conversión mostró una leve mejoría (más pienso convertido en kilo productivo) en el grupo que recibió 4 kg/T (2,02) frente al grupo control (2,29). Las diferencias no alcanzaron significación estadística.

Al estudiar la microbiota la riqueza de especies bacterianas fue más alta en el caso de la microbiota fecal, en comparación con la microbiota respiratoria, la cual fue incrementando su diversidad a lo largo del tiempo. El estudio de diversidad de especies se analizó mediante el índice de diversidad de Simpson, observando tanto las especies bacterianas en la microbiota como su abundancia relativa. En el caso de la microbiota fecal, este índice fue disminuyendo a lo largo del tiempo, por lo que se puede afirmar que las especies bacterianas fueron siendo más variadas a lo largo del tiempo. El índice de Simpson de la microbiota nasal fue aumentando a lo largo del tiempo, podemos decir que la diversidad de especies en este caso fue asentándose y disminuyendo a lo largo del tiempo. Para el análisis de los componentes principales del análisis de la microbiota nasal, se observó una segregación de las bacterias nasales en función de la edad de los cerdos, encontrando diferencias entre las especies. Respecto a la taxonomía fecal, se observó una segregación de las bacterias fecales, en función de la edad de los cerdos, entre el estadio final e inicial, pero no se observó diferencia clara entre el estadio intermedio y final.

Las especies de las bacterias más abundantes en la microbiota nasal fueron *Clostridioides difficile*, que apareció mayoritariamente durante los dos primeros muestreos a los cerdos y *Bergeyella zoohelcum*, la cual apareció sobre todo en el primer y último muestreo. Las bacterias que aparecieron durante todo el muestreo, pero sobre todo tras los 43 días que duró el ensayo, fueron *S. suis* y *G. parasuis*. Por último, fueron identificados varios integrantes del género *Prevotella* y *Moraxella* durante todo el ensayo.

Por otro lado, tras el análisis de la microbiota fecal obtuvimos diversos integrantes del género *Prevotella*, sobre todo en los lechones que llevaban consumiendo el pienso suplementado, tras los 14 días iniciales del experimento. La bacteria *E. coli* apareció en gran cantidad, sobre sobre todo al principio del experimento, por lo que luego podría haber sido desplazada por *Prevotella*. También se ha encontrado a

## Resumen

---

*Ruminococcus* en cantidades destacadas, sobre todo en los lechones alimentados con la máxima dosis de ácido láurico. El género *Clostridium* fue variando a lo largo de tiempo, así como la especie *Bacteroides fragilis*.



# 10. SUMMARY

## Summary

---

## Summary

---

Traditionally, the misuse of antibiotics as growth promoters, as well as their prophylactic and metaphylactic abuse, has brought antibiotic resistant bacteria to a very critical position for human and animal health. Therefore, the relevant authorities at national and international level have designed various control and surveillance plans for this phenomenon, greatly reducing the use of antibiotics. Livestock farms, more specifically intensive pig farms, have started to make the transition to achieve a decrease in the use of antibiotics, and to ensure that these measures have as little impact as possible on the health of pigs and on production rates. For a proper understanding of antibiotic resistance, it is essential to study the resistance profile of the micro-organism. Therefore, isolation, identification and resistance profile of microorganisms is a key aspect as a strategy for control and appropriate treatment. On the other hand, biosecurity on farms is another aspect that should be considered, since the better the cleaning and disinfection, the more likely it is to cut the cycles of contagion between batches. In addition, a cleaner environment improves the overall health of the animals, preventing the spread of pathogenic micro-organisms. Finally, the use of feed additives as antimicrobials and microbiota modulators is becoming increasingly popular as alternative measures to the use of antibiotics. For all of the above reasons, this Doctoral Thesis has approached this problem from different perspectives.

The identification of the bacterial species isolated from samples of respiratory origin was carried out by PCR and MALDI-TOF, obtaining 60 strains of *Streptococcus suis*, 48 of *Pasteurella multocida*, 18 of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, and 5 of *Glaesserella parasuis*.

The antibiotic resistance profile was also studied. Resistance of *A. pleuropneumoniae* and *G. parasuis* was studied by disc antibiograms. *A. pleuropneumoniae* was mostly resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole and erythromycin, with 61.1 % of isolates resistant in both cases. For *Glaesserella parasuis*, resistance was mainly to tetracycline and ampicillin, with 60 % of the isolates.

On the other hand, *S. suis* and *P. multocida* were studied using the Sensititre method™. For *P. multocida*, resistance was obtained mainly for lincosamides

## Summary

---

(94.4 % of cases resistant to clindamycin). For sulphamides and tiamulin, 55.5 % of isolates were resistant, and for all other antibiotics tested, at least 50 % of the isolates were found to be susceptible. The highest proportions of resistance among *S. suis* isolates were observed for tetracyclines with 95 % and 93.3 % for chlortetracycline and oxytetracycline, respectively.

In addition, in the case of the two most prevalent bacterial species, the study of genes for both antibiotic resistance and virulence factors was carried out. Regarding virulence factors, *S. suis* presented 6.7 % of the isolates positive for the *epf* gene, 58.3 % positive for the *mrp* gene, 43.3 % for the *sly* gene, 76.7 % for the *luxS* gene and 53.3 % for the *gapd* gene. The most frequently found gene in these isolates was *luxS*, present in 76.6 % of the isolates. When studying *P. multocida*, we observed that all the isolates were positive for the *oma87* gene (48 isolates). The *hgbA*, *nanH*, *ompH*, *ptfA* and *sodA* genes were positive in 95.8 %, followed by the *tonB* gene, with 83.3 % of positive cases. The least prevalent genes were *toxA*, with 27.1% of isolates, *pfhA*, with 10.4%, and *tbpA*, with only one positive isolate.

Regarding the antibiotic resistance genes analysed in *S. suis*, of the four genes studied, for tetracyclines the *tetO* gene was present in 68.3 % of the bacteria, compared with *tetM*, which was present in only 1.7 %. For the study of macrolide resistance genes *ermB* was found in 46.7 % of the isolates, *MefA/E* was present in 8.3 % of the isolates. For tetracycline resistance, 12.5 % of isolates were positive for the *tetA* gene, and 39.6 % for *tetB*. For resistance to  $\beta$ -lactams, 27.1 % of isolates were positive for the *bla<sub>geneROB1</sub>* compared to 8.3 % of isolates with *bla<sub>TEM</sub>*. Macrolide resistance was 16.7 % for the *ermA* gene, 41.7 % for *ermC*, 22.9 % for *msrE* and 0 % for *mphE*.

In relation to the study of the action of disinfectants, in order to improve biosecurity, both *in vitro* and on-farm tests were carried out, as well as new disinfection methods, such as ozonisation, were tested. The capacity of the most common on-farm disinfectants on environmental and PRC bacteria was analysed and it was concluded that “polimorfo” and “limoseptic” disinfectants did not work as effectively as the others tested. *In vitro* tests were also carried out with ozone

## Summary

---

and ozonised water. There was a 100 % reduction in the number of colonies in the 100 litres of air at 1.5 ppm ozone: for bacteria in the air it was therefore very effective. For this ozone concentration and with ozonized water on objects with uneven surfaces, disinfection worked as well as conventional disinfectant on feeders, drinkers and walls, and better for heating plates, floors and toys. This finding was of great interest, as ozone is a disinfectant that does not leave residues, which is better for the environment. It also does not need rinsing, thus improving drying times, which speeds up the filling time with the next batch of pigs.

Considering the use of food additives as an alternative to the use of antibiotics, *in vitro* studies were carried out to evaluate the antibacterial capacity of lauric acid in Gram-positive and Gram-negative bacteria, determining the minimum inhibitory concentration (MIC) for *S. suis* and *P. multocida* bacteria. These assays included diffusion-based methods (both plate and disc) to quantify the inhibition of bacteria against these compounds. A scanning electron microscopy study was also performed to observe the effect of lauric acid against *S. suis*.

Plate diffusion tests could not be carried out due to the physicochemical characteristics of lauric acid with the culture medium, obtaining very heterogeneous plates. On the other hand, the disc diffusion methods could be carried out without any problem, obtaining very good results for lauric acid and monolaurin in the case of both bacteria studied and at intermediate concentrations. Concentrations from 2.4 to 1500 mg/ml of lauric acid or 5 % monolaurin were studied, obtaining inhibition for all concentrations of lauric acid in *S. suis*, and for *P. multocida* inhibition of bacterial growth was obtained from 40 mg/ml onwards. In addition, in the case of *S. suis*, a scanning electron microscopy study was carried out, in which a decrease in bacterial density and changes in morphology were observed when exposed to 900 mg/ml lauric acid.

Finally, the effect of supplementing the diet with two different doses of lauric acid was evaluated in an on-farm experimental trial. This experiment was carried out in the transition stage, on 144 weaned piglets (25 days of age), which were distributed in three groups (two pens per group). All groups received feed

## Summary

---

without antibiotics and zinc oxide. The animals in the first group received *pre-starter* and *starter* feed without additives, the second group received feed supplemented with 2 kg lauric acid per tonne and the last group supplemented at 4 kg/T. The average daily gain (ADG) values during the 43 days of the experiment were very similar in all three cases, although somewhat higher in the group receiving the higher lauric acid dose. Feed intake was higher in the control group (28.64 kg/pig) compared to the groups receiving lauric acid (2 kg/T group: 27.17 kg/pig and 4 kg/T group: 27.48 kg/pig). Finally, the feed conversion ratio showed a slight improvement (more feed converted into productive kg) in the group receiving 4 kg/T (2.02) compared to the control group (2.29). The differences did not reach statistical significance.

When studying the microbiota, the richness of bacterial species was higher in the case of the faecal microbiota, compared to the respiratory microbiota, which increased in diversity over time. The species diversity study was analysed using Simpson's diversity index, looking at both the bacterial species in the microbiota and their relative abundance. In the case of the faecal microbiota, this index decreased over time, so it can be affirmed that the bacterial species became more varied over time. Simpson's index of the nasal microbiota increased over time, so we can say that the diversity of species in this case settled and decreased over time. For the principal component analysis of the nasal microbiota analysis, we observed a segregation of nasal bacteria according to the age of the pigs, finding differences between species. Regarding faecal taxonomy, a segregation of faecal bacteria was observed, depending on the age of the pigs, between the final and initial stage, but no clear difference was observed between the intermediate and final stage.

The most abundant bacterial species in the nasal microbiota were *Clostridioides difficile*, which appeared mostly during the first two samplings of the pigs, and *Bergeyella zoohelcum*, which appeared mostly in the first and last sampling. Bacteria occurring throughout the sampling, but especially after the 43 days of the trial, were *S. suis* and *G. parasuis*. Finally, several members of the genera *Prevotella* and *Moraxella* were identified throughout the trial.

## Summary

---

On the other hand, after analysis of the faecal microbiota, we obtained several members of the *Prevotella* genus, especially in the piglets that had been consuming the supplemented feed after the initial 14 days of the experiment. *E. coli* bacteria appeared in large numbers, especially at the beginning of the experiment, and could have been displaced by *Prevotella*. *Ruminococcus* was also found in high numbers, especially in piglets fed the highest dose of lauric acid. The genus *Clostridium* varied over time, as did the species *Bacteroides fragilis*.

## Summary

---