



Universidad de León



TESIS DOCTORAL



Estrategias en la reducción del consumo  
de antibióticos en el ganado porcino

MGG

León  
2021



Estrategias en  
la reducción del consumo de antibióticos  
en el **Ganado Porcino**

MANUEL GÓMEZ GARCÍA  
2021





**universidad  
de león**

**TESIS DOCTORAL**  
por compendio de publicaciones

**Estrategias en la reducción del consumo  
de antibióticos en el ganado porcino**

---

Strategies for reducing antibiotic use in pig production

**Manuel Gómez García**

**Directores:** Ana M. Carvajal Urueña, Héctor Argüello Rodríguez  
y Pedro M. Rubio Nistal

Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias y de los Alimentos

Departamento de Sanidad Animal

Facultad de Veterinaria

**León, noviembre 2021**



*A mi abuelo y abuelas*

*A mis padres, a mi hermano y a Sandra*

*“Aut Jergón aut nihil”*

...

*mirad nuestra investigación pública muerta,  
mirad la Ciencia rota:  
pero de cada laboratorio muerto sale metal ardiendo  
en vez de flores,  
pero de cada hueco de Ciencia,  
sale Ciencia,  
pero de cada investigador frustrado sale un fusil con ojos,  
pero de cada recorte en la investigación nacen remordimientos  
que os hallarán un día el sitio  
del corazón.*

*Preguntaréis, ¿por qué sus tesis  
no nos hablan del entusiasmo, del interés científico,  
de los grandes hallazgos de su país natal?  
Venid a ver la sangre por los laboratorios,  
venid a ver  
la sangre por los laboratorios,  
venid a ver la sangre  
por los laboratorios!*



Adaptado de “España en el corazón”

**Pablo Neruda**

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

---

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>VII</b>
<b>COMPENDIO DE PUBLICACIONES PRESENTADAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>FINANCIACIÓN.....</b>	<b>XV</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>XVII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XIX</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>XXI</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS .....</b>	<b>XXIII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA .....	1
1.2. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN EL SECTOR PORCINO .....	4
1.3. ESTRATEGIAS PARA LA REDUCCIÓN DEL USO DE ANTIBIÓTICOS..	6
1.4. ÁCIDOS ORGÁNICOS.....	8
1.4.1. Química de los ácidos orgánicos .....	9
1.4.2. Propiedades antimicrobianas de los ácidos orgánicos.....	12
1.4.3. Empleo de ácidos orgánicos en ganado porcino.....	18
1.5. ACEITES ESENCIALES.....	24
1.5.1. Química de los aceites esenciales.....	26
1.5.2. Propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales.....	28
1.5.3. Empleo de los aceites esenciales en ganado porcino.....	33
1.6. LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN EN LAS GRANJAS.....	40
1.6.1. Agentes desinfectantes .....	44
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>55</b>
<b>3. COPIA COMPLETA DE LAS PUBLICACIONES PRESENTADAS .....</b>	<b>57</b>
3.1. PRIMERA PUBLICACIÓN .....	59
3.2. SEGUNDA PUBLICACIÓN .....	69

3.3. TERCERA PUBLICACIÓN .....	85
3.4. CUARTA PUBLICACIÓN.....	99
<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>123</b>
4.1. ESTUDIO <i>in vitro</i> DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE UNA SELECCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS, ACEITES ESENCIALES Y COMPONENTES DE ACEITES ESENCIALES.....	123
4.2. DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN BACTERICIDA DE LOS COMPONENTES DE ACEITES ESENCIALES CON MAYOR ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	131
4.3. ESTUDIO <i>in vitro</i> DEL EFECTO CITOTÓXICO DE UNA SELECCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y COMPONENTES DE ACEITES ESENCIALES.....	134
4.4. ESTUDIO <i>in vitro</i> DEL EFECTO VIRICIDA DE UNA SELECCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y COMPONENTES DE ACEITES ESENCIALES FRENTE AL VIRUS DE LA DIARREA EPIDÉMICA PORCINA .....	136
4.5. ESTUDIO <i>in vitro</i> Y EN CONDICIONES DE CAMPO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE DESINFECTANTES COMERCIALES FRENTE A <i>B. hyodysenteriae</i> .....	139
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>145</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>147</b>

# AGRADECIMIENTOS

---

A lo largo de este largo camino, me he dado cuenta que nada tiene sentido si me encuentro solo y que he sido realmente afortunado por haber recibido siempre la mano que he necesitado para seguir caminando. Es por ello que, aunque de forma muy breve, me gustaría dedicar unas palabras con especial cariño a todas aquellas personas que han hecho posible este pequeño aporte a la ciencia.

Indudablemente, debo de comenzar dando gracias a lo más importante que tengo, mi familia, gracias por vuestro inagotable esfuerzo y el tiempo que siempre me habéis dedicado y seguís dedicándome. ¿Os acordáis cuándo me dejabais los domingos en la estación de autobuses para volver a León? Vosotros sois los auténticos artífices de este trabajo. Gracias Sandrita, la verdad es que no existen palabras ni achuchones para poder agradecerte todo lo que me aportas, gracias por elegirme.

A mis compañeros de batallas, Héctor y Óscar, extracciones, Covid, chollos, diagnóstico, cafés, congresos, ronquidos, lavadoras, alguna que otra bomba... Son muchas las vivencias compartidas por lo que siempre os tendré presente. A todos los demás compañeros del departamento de Sanidad Animal, con agradecimiento especial a los que han estado este último tiempo, por haber convertido el laboratorio en un sitio de trabajo ameno y divertido.

Gracias, por supuesto, a Ana Carvajal y Héctor Argüello por ayudarme a lograr esta nueva meta, en base a vuestra experiencia y amor a la ciencia, pero sobre todo por vuestra motivación y paciencia cuando las cosas no salían como esperábamos. De igual forma, mi más sincero agradecimiento a Pedro Rubio por depositar en mí su confianza desde el inicio, a Juan Granja por permitirme formar parte de su grupo de investigación, así como a personas tan importantes en este camino, como lo han sido Juan y Gloria, por sus consejos y apoyo desinteresado.

Por último, no podía olvidarme de mis grandes amigos de toda la vida, meus queridos colegas galegos, mis compañeros de Universidad, entrenamiento y piso. Gracias a mis casi hermanos Porras, David y Sergio por haberme aguantado tanto tiempo.

*Buenos días*

---





# COMPENDIO DE PUBLICACIONES

## PRESENTADAS

---

La Tesis Doctoral con título “*Estrategias en la reducción del consumo de antibióticos en el ganado porcino*” se presenta bajo la modalidad de compendio de publicaciones e incluye tres trabajos publicados y uno en fase de revisión. A continuación, se detalla el nombre de los autores, referencia completa, fecha de publicación y factor de impacto de la revista en el año de publicación de cada uno de ellos.

---

**AUTORES:** Manuel Gómez-García, Cinta Sol, Pedro J. G. de Nova, Mónica Puyalto, Luis Mesas, Héctor Puente, Óscar Mencía-Ares, Rubén Miranda, Héctor Argüello, Pedro Rubio y Ana Carvajal.

**TITULO:** Antimicrobial activity of a selection of organic acids, their salts and essential oils against swine enteropathogenic bacteria.

**REFERENCIA:** Porcine Health Management, 5, 32.

DOI: 10.1186/s40813-019-0139-4.

**FECHA DE PUBLICACIÓN:** 27 de diciembre de 2019.

**FACTOR DE IMPACTO (JCR-2019):** 2,190 (Q1: 21 de 141 en Veterinary Sciences).

---

**AUTORES:** Manuel Gómez-García, Héctor Argüello, Héctor Puente, Óscar Mencía-Ares, Sandra González, Rubén Miranda, Pedro Rubio y Ana Carvajal.

**TITULO:** In-depth *in vitro* evaluation of the activity and mechanism of action of organic acids and essential oils against swine enteropathogenic bacteria.

**REFERENCIA:** Frontiers in Veterinary Science, 7: 572947.

DOI: 10.3389/fvets.2020.572947.

**FECHA DE PUBLICACIÓN:** 10 de noviembre de 2020.

**FACTOR DE IMPACTO (JCR-2020):** 3,412 (Q1: 9 de 146 en Veterinary Sciences).

---

---

**AUTORES:** Manuel Gómez-García, Héctor Puente, Héctor Argüello, Óscar Mencía-Ares, Pedro Rubio y Ana Carvajal.

**TÍTULO:** *In vitro* assessment of antiviral effect of natural compounds on porcine epidemic diarrhea coronavirus.

**REFERENCIA:** Frontiers in Veterinary Science, 8: 652000.  
DOI: 10.3389/fvets.2021.652000.

**FECHA DE PUBLICACIÓN:** 29 de marzo de 2021.

**FACTOR DE IMPACTO (JCR-2020):** 3,412 (Q1: 9 de 146 en Veterinary Sciences).

---

**AUTORES:** Manuel Gómez-García, Héctor Argüello, Lucía Pérez-Pérez, Clara Vega, Héctor Puente, Óscar Mencía-Ares, Pedro Rubio y Ana Carvajal.

**TÍTULO:** Combined *in vitro* and on farm evaluation of commercial disinfectants against *Brachyspira hyodysenteriae*.

**REFERENCIA:** Porcine Health Management.

DOI: -

**FECHA DE PUBLICACIÓN:** En revisión.

**FACTOR DE IMPACTO (JCR-2020):** 3,048 (Q1: 16 de 146 en Veterinary Sciences).

---

Además, parte de los resultados expuestos en la presente memoria han sido objeto de las siguientes comunicaciones a congresos:

- **ASAS-CSAS Annual Meeting & Trade Show, Animal Science and Technology: Ensuring Food Security. Baltimore, Estados Unidos. Julio de 2017.**

1. Comunicación oral. *Antibacterial activity of different essential oils and their combinations against relevant enteric pathogenic bacteria.* Juan Miguel Oddo, Luis Mesas, Cinta Sol, Manuel Gómez-García, Sara Costillas, Ana Carvajal, Juan José Mallo, Pedro Rubio y Rubén Miranda.
2. Comunicación oral. *In vitro evaluation of the antimicrobial activity of several short and medium chain fatty acid salts and their combinations.* Cinta Sol, Juan Miguel Oddo, Mónica Puyalto, Ana Carvajal, Manuel Gómez-García, Sara Costillas, Juan José Mallo y Pedro Rubio.

- **XXIII Simposio AVEDILA, Asociación de Veterinarios Especialistas en Diagnóstico de Laboratorio.** Granada, España. Noviembre de 2018.

Póster. *Determinación de la actividad antimicrobiana de una selección de ácidos orgánicos y aceites esenciales frente a una colección de bacterias enteropatógenicas.* Manuel Gómez-García, Pedro José Gómez-de Nova, Cinta Sol, Mónica Puyalto, Luis Mesas, Ana Carvajal y Pedro Rubio.

- **II Jornadas de Jóvenes Investigadores INNOVA-Salamanca.** Salamanca, España. Septiembre de 2019.

Póster. *Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de una selección de aceites esenciales frente a una colección de bacterias lácticas.* Manuel Gómez-García, Cinta Sol, Mónica Puyalto, Bernat Canal, Luis Mesas, Ana Carvajal y Pedro Rubio.

- **XXIV Simposio AVEDILA, Asociación de Veterinarios Especialistas en Diagnóstico de Laboratorio.** Pamplona, España. Noviembre de 2019.

Comunicación oral. *Actividad in vitro de aceites esenciales frente a microorganismos aislados de casos de otitis externa canina.* Manuel Gómez-García, Irene Madrigal, Héctor Puente, Óscar Mencía-Ares, Ana Carvajal y Juan Miguel Fregeneda-Grandes.

- **International Poultry Scientific Forum IPSF.** Atlanta, Estados Unidos. Enero de 2020.

1. Póster. *In vitro evaluation of antimicrobial activity of short- and medium-chain fatty acid salts and their combinations against Campylobacter jejuni.* Cinta Sol, Mónica Puyalto, Bernat Canal, Manuel Gómez-García, Ana Carvajal y Juan José Mallo.
2. Póster. *Antibacterial activity of an essential oil combination against different enteric bacterial pathogens.* Bernat Canal, Luis Mesas, Cinta Sol, Mónica Puyalto, Ana Carvajal, Manuel Gómez-García y Juan José Mallo.

- **The 8<sup>th</sup> conference on Spirochaetal infections in animals and humans.** Online. Septiembre de 2021.

Póster. *In vitro assessment of efficacy of a selection of disinfectant against Brachyspira hyodysenteriae.* Manuel Gómez-García, Héctor Argüello, Lucía Pérez-Pérez, Clara Vega, Héctor Puente, Óscar Mencía-Ares, Pedro Rubio y Ana Carvajal.

- **Pig Veterinary Society conference.** Bedford, Reino Unido. Noviembre de 2021.

Comunicación oral. *Efficacy of disinfectants against Brachyspira hyodysenteriae.* Manuel Gómez-García, Héctor Argüello, Lucía Pérez-Pérez, Clara Vega, Héctor Puente, Óscar Mencía-Ares, Pedro Rubio y Ana Carvajal.

Por último, durante el periodo de realización de la Tesis Doctoral se ha participado en las siguientes publicaciones que no componen los resultados incluidos en la presente memoria:

1. *Concordance between two rapid diagnostic tests for the detection of antibodies against SARS-CoV-2.* Jaime de la Iglesia, Tania Fernández-Villa, Juan Miguel Fregeneda, Manuel Gómez-García, Raúl Majo García, Silvia López Sanz, Patricia Méndez da Cuña, Marta Llana García, Alicia Marcos Sábada y José Pedro Fernández Vázquez. Medicina de Familia. SEMERGEN. 5, 32. 08/2020. DOI: 10.1016/j.semerg.2020.06.009.
2. *Antimicrobial use and production system shape the fecal, environmental, and slurry resistomes of pig farms.* Óscar Mencía-Ares, Raúl Cabrera-Rubio, José Francisco Cobo-Díaz, Avelino Álvarez-Ordóñez, Manuel Gómez-García, Héctor Puente, Paul D. Cotter, Fiona Crispie, Ana Carvajal, Pedro Rubio y Héctor Argüello. Microbiome. 8:164. 11/2020. DOI: 10.1186/s40168-020-00941-7.

3. *First identification and characterization of rotavirus H in swine in Europe.* Héctor Puente, Martí Cortey, Pedro J. G. de Nova, Óscar Mencía-Ares, Manuel Gómez-García, Iván Díaz, Héctor Argüello, Marga Martín, Pedro Rubio y Ana Carvajal. *Transboundary and Emerging Diseases*. 01/2021. DOI: 10.1111/tbed.13992.
4. *Effect of antimicrobial use and production system on Campylobacter spp., Staphylococcus spp. and Salmonella spp. resistance in Spanish swine: A cross-sectional study.* Oscar Mencía-Ares, Héctor Argüello, Héctor Puente, Manuel Gómez-García, Avelino Álvarez-Ordóñez, Édgar G. Manzanilla, Ana Carvajal y Pedro Rubio. *Zoonoses and Public Health*. 68 (1): 54-66 02/2021. DOI: 10.1111/zph.12790.
5. *Detection and genetic diversity of porcine coronavirus involved in diarrhoea outbreaks in Spain.* Héctor Puente, Héctor Argüello, Óscar Mencía-Ares, Manuel Gómez-García, Pedro Rubio y Ana Carvajal. *Frontiers in Veterinary Science*. 8:651999. 02/2021. DOI: 10.3389/fvets.2021.651999
6. *Antimicrobial resistance in commensal Escherichia coli and Enterococcus spp. is influenced by production system, antimicrobial use, and biosecurity measures on Spanish pig farms.* Óscar Mencía-Ares, Héctor Argüello, Héctor Puente, Manuel Gómez-García, Édgar G. Manzanilla, Avelino Álvarez-Ordóñez, Ana Carvajal y Pedro Rubio. *Porcine Health Management*. 7, 27. 03/2021. DOI: 10.1186/s40813-021-00206-1.
7. *Betaine increases net portal absorption of volatile fatty acids in Iberian pigs.* Manuel Lachica, Cristina Saro, Iván Mateos, Manuel Gómez-García, M<sup>a</sup> José Ranilla y Ignacio Fernández-Fígares. *Animal*. 15, 100197. 05/2021. DOI: 10.1016/j.animal.2021.100197.
8. *In vitro activity of essential oils against microbial isolates from otitis externa cases in dogs.* Manuel Gómez-García, Irene Madrigal, Héctor Puente, Óscar Mencía-Ares, Héctor Argüello, Ana Carvajal y Juan Miguel Fregeneda-Grandes. *Natural Product Research*. 10/2021. DOI: 10.1080/14786419.2021.1993217



# FINANCIACIÓN

---

Durante la realización de la presente Tesis Doctoral, el doctorando Manuel Gómez García ha sido beneficiario de una ayuda para financiar la contratación predoctoral de personal investigador convocada por la Junta de Castilla y León y cofinanciada por el Fondo Social Europeo (Orden EDU/1100/2017 de 29 de octubre de 2018), así como, previamente a la obtención de dicha financiación, de una ayuda puente formativa para la realización de estudios de Doctorado dentro del programa propio de Ayudas a la Investigación de la Universidad de León (convocatoria 2017).

Los trabajos realizados han sido financiados por los siguientes proyectos y contratos de investigación:

1. “*Caracterización de la microbiota digestiva en cerdos*” financiado por Juan Jiménez García SAU.
2. “*Análisis técnico para la determinación de la eficacia de una selección de productos frente a bacterias patógenas*” financiado por Norel Nutrición Animal SA.
3. “*Nuevos virus porcinos causantes de diarrea en España*” (E-RTA2015-0003-C02-02) financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) del Ministerio de Ciencia e Innovación.
4. “*Respuesta del hospedador y microbioma intestinal como dianas en el control de la disentería porcina*” (PID2019-110662RB-I00) financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación.
5. “*Uso racional y prudente de antibióticos en producción porcina*” (47/18/125/G02). del programa de Desarrollo Rural de Castilla y León, cofinanciado por la Junta de Castilla y León y el Fondo Europeo Agrario de Desarrollo Rural (FEADER).



UNIÓN EUROPEA  
Fondo Social Europeo  
El FSE invierte en tu futuro



**Junta de  
Castilla y León**





# RESUMEN

---

En el ámbito específico de la medicina veterinaria, la investigación relativa a estrategias que permitan reducir el uso de antibióticos y que, consecuentemente, limiten la selección y diseminación de la resistencia a los mismos se ha convertido en una prioridad. Así mismo y considerando las actuales y futuras restricciones en el uso de antibióticos, estas estrategias deben suponer una alternativa para el control de las infecciones, asegurando y promoviendo tanto la viabilidad económica de las explotaciones como la sanidad y el bienestar animal. Entre las estrategias existentes para el control y la reducción de enfermedades infecciosas en el sector porcino, uno de los más importantes en producción ganadera y con un consumo de antibióticos superior al de otras especies, destacan la administración como aditivos en la dieta de diferentes compuestos naturales como son los ácidos orgánicos (AOs) o aceites esenciales (AEs), así como la implementación de estrictas medidas de bioseguridad. Sin embargo, es necesario ampliar el conocimiento sobre estas estrategias para poder optimizar su eficacia.

La presente Tesis Doctoral recoge cuatro estudios que abordan diferentes aspectos relacionados con la actividad antimicrobiana *in vitro* de compuestos alternativos a los antibióticos y agentes desinfectantes frente a diferentes microorganismos relevantes como patógenos entéricos para el ganado porcino y con una elevada prevalencia de resistencia antimicrobiana.

En un primer trabajo se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de diferentes AOs, AEs y componentes principales de AEs frente a una colección de aislados recuperados de brotes de enfermedad entérica en explotaciones porcinas, así como frente a algunas cepas de colecciones de cultivos tipo de las especies *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Clostridium perfringens*. Además, se evaluó el posible efecto sinérgico de los compuestos con mayor actividad antibacteriana al combinarse, a través de la determinación del índice de concentración inhibitoria fraccional (CIF), así como la actividad de sus compuestos volátiles y la progresión del efecto antibacteriano en función de la concentración tras una corta exposición. Los resultados alcanzados corroboran el potencial uso de este tipo de compuestos frente a bacterias patógenas independientemente de su perfil de resistencia a los antibióticos.

En una segunda investigación se estudió en profundidad el mecanismo de acción de dos componentes principales de AEs, el timol y el cinamaldehído, usando técnicas como la citometría de flujo (CF), espectroscopía infrarroja transformada por Fourier (FTIR) y microscopía electrónica de barrido (SEM). Los resultados obtenidos nos permiten concluir que la principal diana celular del timol es la pared celular, provocando cambios significativos en grupos funcionales de carbohidratos y polisacáridos, así como un incremento de la permeabilidad de la membrana en las tres especies bacterianas evaluadas. Por el contrario, el cinamaldehído originó mínimas alteraciones en la pared celular, siendo diferentes los compuestos celulares afectados en las bacterias Gram negativas *E. coli* y *S. enterica* y en los aislados de *C. perfringens*.

En un tercer trabajo se determinó el efecto citotóxico de diferentes concentraciones de AOS y componentes principales de AEs a través de un ensayo fluorescente de viabilidad celular. Además, la actividad antiviral de dichos compuestos a una concentración con baja citotoxicidad fue evaluada frente a una cepa del virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP) adaptada a cultivo celular, concluyendo que solo uno de los compuestos evaluados, el ácido fórmico, presentó actividad posiblemente asociada un efecto inhibitorio sobre la replicación viral.

En un último trabajo, un método de dilución-neutralización estandarizado permitió demostrar que la mayoría de los desinfectantes comerciales son eficaces frente a aislados de *Brachyspira hyodysenteriae*, reduciendo los recuentos bacterianos más de cinco unidades logarítmicas. Finalmente, se evaluó la eficacia de los protocolos de limpieza y desinfección empleados en dos granjas con disentería porcina. La persistencia de *B. hyodysenteriae* tras la limpieza de los corrales e, incluso, tras la desinfección pone de manifiesto la importancia de evaluar y mejorar los protocolos en las granjas de cerdos.

## ABSTRACT

---

In veterinary medicine, research on alternatives to antibiotics use which will limit the selection and the spread of antibiotic resistance, is currently a priority. Current and forthcoming restrictions in antibiotics use also encourage the research and finding of strategies which provide an effective alternative in infection treatment and control. These strategies will also guarantee and promote the economic viability of farms and the animal health and welfare. Among the existing strategies for the control and prophylaxis of infectious diseases in pig production, one of the most important in livestock production with relevant antimicrobial use, stands out the use of natural compounds such as organic acids (OAs) or essential oils (EOs) as feed additives and the promotion and implementation of strict biosecurity measures. Further research on these strategies is needed in order to optimise their effectiveness.

This Doctoral Thesis includes four studies focusing on different aspects of the *in vitro* antimicrobial activity of alternative compounds to antibiotics and disinfectant agents against different microorganisms relevant as enteric pathogens for pigs and with a high prevalence of antimicrobial resistance.

In a first study, the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of different OAs, EOs and single EO compounds were determined against a collection of isolates recovered from outbreaks of enteric disease on pig farms, as well as against some strains from type culture collections of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Clostridium perfringens* species. The potential synergistic effect of compounds with higher antibacterial activity when combined was also evaluated through the determination of the fractional inhibitory concentration (FIC) index, as well as the activity of their volatile compounds and the progression of their antibacterial effect as a function of concentration after a short exposure. The results obtained show the potential use of this type of compounds against pathogenic bacteria regardless of their antibiotic resistance profile.

In a second study, the mechanism of action of two single EOs compounds, thymol and cinnamaldehyde, was studied in depth using techniques such as flow cytometry (FC), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscopy (SEM). The results obtained allow us to conclude that the main cellular target of thymol

is the cell wall, since it caused significant changes in functional groups of carbohydrate and polysaccharide, as well as an increase of the membrane permeability in the three bacterial species tested. In contrast, cinnamaldehyde caused minimal alterations in the cell wall and its target at the molecular level differed between Gram-negative bacteria, *E. coli* and *S. enterica*, and *C. perfringens* isolates.

In a third study, the cytotoxic effect of different concentrations of OAs and single EOs compounds was determined using a fluorescent cell viability assay. The antiviral activity of these compounds at a concentration with low cytotoxicity was also evaluated against a cell culture-adapted porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strain. Our results showed that formic acid was the only one of the compounds tested with antiviral activity which could be associated with an inhibitory effect on viral replication.

The last study revealed, using a standard dilution-neutralization method, that most of the commercial disinfectants tested were effective against a collection of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates, reducing bacterial counts by more than five logarithmic units. Finally, the efficacy of cleaning and disinfection protocols used on two farms with swine dysentery was also evaluated. The persistence of *B. hyodysenteriae* after cleaning of the pens and even after disinfection highlights the importance of revising the cleaning and disinfection protocols on pig farms.

## ABREVIATURAS

---

- ABC** Superfamilia casete de unión a ATP (por sus siglas en inglés *ATP binding cassette*)
- ACP** Enoil-proteína transportadora de acilo (*acyl carrier protein*)
- ADN** Ácido desoxirribonucleico
- ADP** Adenosín difosfato
- AE** Aceite esencial
- AMEG** Grupo de expertos *ad hoc* en asesoramiento antimicrobiano (*Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert group*)
- AO** Ácido orgánico
- ARE** Elemento de respuesta antioxidante (*antioxidant response element*)
- ARN** Ácido ribonucleico
- ATP** Adenosín trifosfato
- CC<sub>50</sub>** Concentración capaz de reducir el número de células viables al 50 %
- CE** Comunidad europea
- CE<sub>50</sub>** Concentración requerida de un determinado compuesto para inhibir el efecto citopático inducido por VDEP en un 50 %
- CECT** Colección española de cultivos tipo
- CF** Citometría de flujo
- CIF** Concentración inhibitoria fraccionada
- CMB** Concentración mínima bactericida
- CMB<sub>50</sub>** CMB capaz de eliminar al 50 % de los aislados de una determinada especie bacteriana
- CMI** Concentración mínima inhibitoria
- CMI<sub>50</sub>** CMI capaz de inhibir el crecimiento del 50 % de los aislados de una determinada especie bacteriana
- DEP** Diarrea epidémica porcina
- EMA** Agencia europea del medicamento (*European Medicines Agency*)
- ETEC** Patotipo enterotoxigénico de *E. coli* (*enterotoxigenic E. coli*)
- FADH<sub>2</sub>** Flavín adenín dinucleótido (*flavin adenine dinucleotide*)
- FAO** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*)
- FDA** Agencia para la Administración de Alimentos y Medicamentos (*Food and Drug Administration*)
- FTIR** Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (*Fourier-transform infrared spectroscopy*)
- GMD** Ganancia media diaria
- GRAS** Producto generalmente reconocido como seguro (*generally recognized as safe*)
- HCT116** línea celular humana derivada de carcinoma de colon
- HO-1** Enzima hemo-oxigenasa 1
- HT-29** Línea celular humana derivada de adenocarcinoma de colon
- IFN- $\gamma$**  Interferón gamma
- ICA** Índice de conversión de alimento
- IG** Inmunoglobulina
- IL** Interleucina
- IMDA** Ingesta media diaria de alimento
- IPEC-J2** Línea celular del epitelio intestinal de yeyuno de cerdo neonatal (*intestinal porcine epithelial cell line-J2*)
- IPI-21** Línea celular del epitelio intestinal de íleon de cerdo adulto

**IR** Rayos infrarrojos  
**IS** Índice de selectividad  
**IT** Índice de terapéutico  
**LPS** Lipopolisacárido  
**MAPK** Proteínas quinasas activadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinases*)  
**MATE** Familia de extrusión de compuestos tóxicos y multifármacos (*multidrug and toxic compound extrusion*)  
**MFS** Superfamilia del máximo facilitador (*major facilitator superfamily*)  
**MOI** Multiplicidad de infección (*multiplicity of infection*)  
**MYLK** Quinasas de la cadena ligera de la miosina (*myosin light chain kinase*)  
**NADH** Dinucleótido de nicotinamida y adenina (*adenine dinucleotide*)  
**NF-κB** Factor nuclear kappa B o NF- (*nuclear factor kappa B*)  
**NOS** Enzima óxido nítrico sintasa  
**Nrf2** Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)  
**OMS** Organización Mundial de la Salud  
**PCR** Reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)  
**PCU** Unidad de corrección poblacional (*population correction unit*)  
**pKa** Constante de disociación o ionización de un ácido  
**ppm**: Partes por millón  
**PRAN** Plan nacional frente a la resistencia a los antibióticos  
**PRRS** Síndrome reproductivo y respiratorio porcino (*porcine reproductive and respiratory syndrome*)  
**RND** Familia de resistencia división nodular (*resistance nodulation-cell division*)  
**ROS** Especies reactivas del oxígeno (*reactive oxygen species*)  
**SARM** *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina  
**SARS-CoV-2** Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo tipo 2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus-2*)  
**SEM** Microscopía electrónica de barrido (*scanning electron microscope*)  
**SMR** Familia de resistencia de bajo espectro (*small multidrug resistance*)  
**SPI-1** Isla de patogenicidad 1 (*Salmonella pathogenicity island 1*)  
**TEM** Microscopía electrónica de transmisión (*transmission electron microscopy*)  
**TNF-α** Factor de necrosis tumoral alfa (*tumor necrosis factor-alpha*)  
**UE** Unión Europea  
**UFC** Unidad formadora de colonias  
**VDEP** Virus de la diarrea epidémica porcina  
**ZO-1** Zónula occludens-1

# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

---

**Figura 1.** Vías de transmisión de bacterias resistentes a los antibióticos y genes de resistencia entre el hombre, animales y medio ambiente. Adaptado de Argudín *et al.* (2017) e imágenes obtenidas de *BioRender.com*. ..... 4

**Figura 2.** Mecanismo de acción por el que los ácidos orgánicos (AOs) presentan su actividad antibacteriana. **1.** Transporte de los AOs hacia el interior celular a través de difusión simple (AOs de cadena corta) o por proteínas de membrana FadL (AOs de cadena media o larga). **2.** Disociación de los AOs provocando la disminución del pH intracelular. **3.** Activación de bombas de protones transmembranas o H<sup>+</sup> ATPasas provocando la salida de protones (H<sup>+</sup>) hacia el exterior y la hidrólisis de adenosín trifosfato (ATP) a adenosín difosfato (ADP). **4.** Incremento de los niveles intracelulares de aniones RCOO<sup>-</sup> y con ello, de la presión osmótica. **5.** Síntesis de moléculas de acil-Coenzima A (acil-CoA) de cadena larga a partir de AOs de cadena larga por la sintetasa FadD. **6.** Inhibición del factor de transcripción FadR por altos niveles de acil-CoA de cadena larga. .... 14

**Figura 3.** Principales efectos asociados a la administración de AOs en el ganado porcino. Adaptada de Pearlín *et al.* (2020) e imágenes obtenidas de *Biorender.com*. ..... 24

**Figura 4.** Principales mecanismos de acción de los aceites esenciales (AEs) que se han postulado hasta la fecha. **1.** Disrupción de la envoltura celular provocando la salida de iones y componentes celulares, así como la interrupción de la fuerza protón-motriz. **2.** Alteración de la actividad tanto de proteínas de membrana como de enzimas citoplasmáticas. **3.** Inhibición de la expresión de genes asociados con el metabolismo, motilidad, virulencia y supervivencia celular. .... 29

**Figura 5.** Principales efectos asociados a la administración de AEs en el ganado porcino. Imágenes obtenidas de *Biorender.com*. ..... 40

---

**Tabla 1.** Propiedades físicas y químicas de diferentes ácidos orgánicos (AOs) usados como acidificantes en el sector porcino. Adaptada de Partanen y Mroz (1999). ..... 11

**Tabla 2.** Valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) expresados en partes por millón o ppm determinados para diferentes AOs. .... 16

**Tabla 3.** Efectos observados en el ganado porcino tras la administración de diferentes AOs en la dieta. Adaptada de Arguello *et al.* (2012). ..... 22

**Tabla 4.** Propiedades químicas de los componentes principales de aceites esenciales (AEs) más utilizados en el ganado porcino. Adaptada de Omonijo *et al.* (2018). ..... 27

**Tabla 5.** Valores de CMI expresados en ppm obtenidos para diferentes componentes principales de AEs. .... 32

**Tabla 6.** Efectos observados sobre parámetros productivos en cerdos destetados tras la administración de diferentes AEs en la dieta. .... 38

**Tabla 7.** Principales compuestos desinfectantes usados en sanidad animal. Adaptada de Frentzel *et al.* (2013). ..... 47





# 1. INTRODUCCIÓN

---

## **1.1. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA**

El término antibiótico hace referencia a cualquier sustancia química producida por un microorganismo o sus derivados sintéticos o semisintéticos capaz de inhibir el crecimiento o incluso destruir bacterias y otros microorganismos (Mohr, 2016). Su descubrimiento y producción a gran escala a principios del siglo XX constituye uno de los avances más destacados en la medicina moderna gracias a su relevante papel en el tratamiento y control de las enfermedades de etiología bacteriana (Mohr, 2016). A pesar de que la resistencia antibiótica es un mecanismo natural de adaptación de las poblaciones bacterianas para sobrevivir cuando comparten nichos o hábitats con otros microorganismos, el uso indiscriminado de los antibióticos ha favorecido el desarrollo y propagación de estos mecanismos de resistencia, comprometiendo la eficacia de los antibióticos en la terapia de las enfermedades infectocontagiosas (Merrett *et al.*, 2016). Así pues, la resistencia a los antibióticos se ha convertido en la actualidad en el principal problema de salud pública a nivel mundial con importantes consecuencias sobre la salud y el bienestar animal (Hernando-Amado *et al.*, 2019).

Las estrategias “Una Salud” o “*One Health*” a nivel regional y “Salud Global” o “*Global Health*” a nivel internacional, con intervenciones integradas desde diferentes ámbitos de la salud, son la base de los planes de acción desarrollados para combatir los riesgos asociados a la emergencia de bacterias resistentes. Esta estrategia integra políticas de sanidad humana y animal, así como culturales y socioeconómicas que pueden minimizar el desarrollo y la diseminación de la resistencia a los antibióticos junto con los elementos biológicos implicados en su evolución: microorganismos, hospedadores y ambientes (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

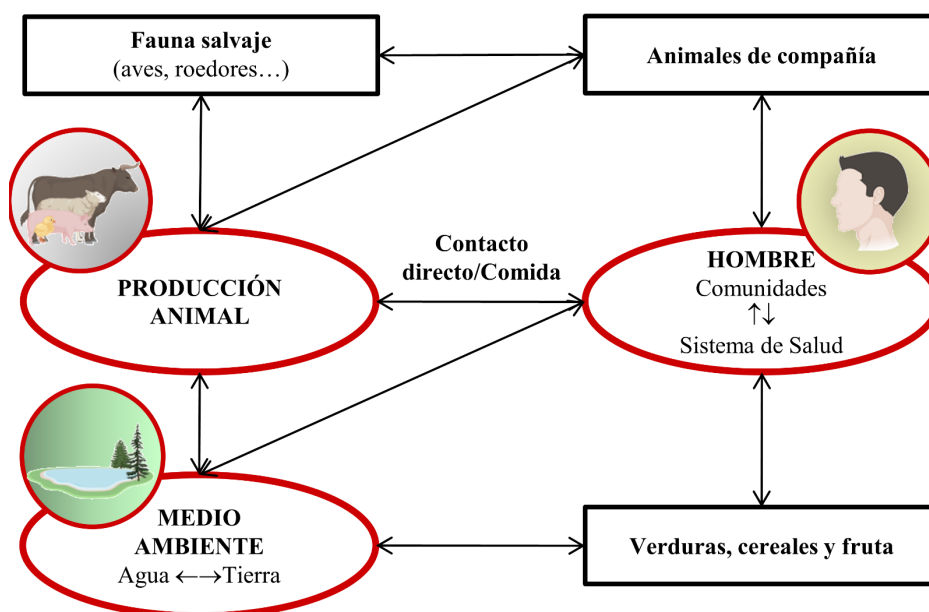
propagación de las bacterias resistentes y genes de resistencia, así como la restauración de las poblaciones bacterianas sensibles a los antibióticos (Hernando-Amado *et al.*, 2019).

El empleo de antibióticos en el ámbito de la medicina veterinaria tiene gran importancia estimándose que representa dos tercios del uso total de antibióticos a nivel mundial (Hernando-Amado *et al.*, 2019). La creciente demanda de carne, promovida por el aumento global de ingresos per cápita, se refleja en una progresión ascendente en su empleo en veterinaria. Así, las estimaciones indican que las ventas de antibióticos para uso animal podrían pasar de las 131.000 toneladas registradas en 2013 a valores superiores a las 200.000 toneladas para el año 2030 (Van Boeckel *et al.*, 2017; Hernando-Amado *et al.*, 2019). Entre las clases de antibióticos más utilizados en medicina veterinaria destacan las sulfonamidas, las tetraciclinas y las penicilinas, todas ellas clasificadas, de acuerdo al impacto potencial que su uso en veterinaria puede tener en salud humana estimado por el grupo de expertos *ad hoc* en asesoramiento antimicrobiano (AMEG) de la Agencia Europea del Medicamento (EMA), dentro de la categoría D o de uso prudente (Ma *et al.*, 2021).

La producción animal ha apoyado su desarrollo en el uso de antibióticos durante décadas. Así hasta principios del siglo XXI, el uso de antibióticos para mejorar el rendimiento productivo de los animales era común en la Unión Europea (UE). Su uso como promotores de crecimiento está prohibido desde el año 2006 (Reglamento de la Comunidad Europea o CE nº1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre aditivos en la alimentación animal). Más de 10 años después y de acuerdo con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la administración estatal de los Estados Unidos, a través de la Agencia para la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), restringió en 2017 el uso como promotores de crecimiento de múltiples grupos de antibióticos entre los que se incluyen aminoglucósidos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, lincosamidas, macrólidos, sulfonamidas, tetraciclinas y penicilinas, entre otros (Scott *et al.*, 2019). De forma general, el uso de antibióticos como promotores de crecimiento está particularmente cuestionado por implicar exposiciones más o menos continuadas a bajas concentraciones o concentraciones subterapéuticas, asociándose con el desarrollo de resistencias (Ma *et al.*, 2021). Sin embargo, aún no se han implementado medidas para limitar este uso en regiones del mundo con importante carga ganadera como Sudamérica o Asia.

El uso terapéutico de antibióticos en veterinaria incluye la aplicación estrictamente terapéutica en individuos enfermos, así como metafiláctica para el tratamiento de animales sanos con riesgo de contagio por animales enfermos y profiláctica para el tratamiento de animales sanos pero que son particularmente receptivos a una infección durante un determinado periodo de tiempo. Estos dos tipos de tratamientos preventivos, metafilaxis y profilaxis, están limitados en la nueva legislación europea (Reglamento UE 2019/4 relativo a la fabricación, la comercialización y el uso de piensos medicamentosos y Reglamento UE 2019/6 sobre medicamentos veterinarios), restringiéndose el uso metafiláctico a enfermedades de alta transmisibilidad y en ausencia de otras alternativas y prohibiéndose el uso profiláctico, con la única excepción de administraciones a animales individuales con riesgo alto de enfermedad, por ejemplo tras un procedimiento quirúrgico.

La administración de los antibióticos en producción animal se lleva a cabo, en gran medida, a través del agua de bebida o mediante el alimento (pienso) debido a ventajas de manejo y considerando los elevados censos existentes en las explotaciones intensivas (Hao *et al.*, 2014; Aarestrup, 2015). Estas dos vías de tratamiento favorecen la subdosificación, por ejemplo, si los conductos de agua presentan biofilms o están oxidados al permitir que los antibióticos puedan ser metabolizados antes de llegar al animal enfermo, dificultan que todos los animales reciban la dosis terapéutica, sobre todo en aquellos animales que por el proceso infeccioso sufran anorexia, y tratan a animales que no están enfermos. Estos tratamientos “indiscriminados” originan una presión selectiva sobre la microbiota intestinal de los animales, seleccionando bacterias con resistencia a los antibióticos (Aarestrup, 2015). La microbiota digestiva tiene un papel significativo en el metabolismo, el control del balance energético, la salud del epitelio intestinal, la capacidad de respuesta inmunitaria y el desarrollo neurológico del animal (Barko *et al.*, 2017) y se encuentra constituida por poblaciones bacterianas tanto comensales como patógenas primarias y oportunistas que pueden llegar a alcanzar a otros animales o incluso al ser humano. Por contacto directo o indirectamente a través de otras vías de transmisión, estas poblaciones bacterianas, así como genes de resistencia a los antibióticos pueden alcanzar cualquier nicho ecológico, tal como se muestra en la figura 1 (Costa *et al.*, 2013; Aarestrup, 2015; Argudín *et al.*, 2017).



**Figura 1.** Vías de transmisión de bacterias resistentes a los antibióticos y genes de resistencia entre el hombre, animales y medio ambiente. Adaptado de Argudín *et al.* (2017) e imágenes obtenidas de *BioRender.com*.

El significativo papel de la producción animal en la expansión de la resistencia a los antibióticos queda reflejado en las descripciones de resistencia y de genes de resistencia en bacterias aisladas de animales, incluyendo especies incluidas en la lista de patógenos prioritarios para la salud pública (Argudín *et al.*, 2017). Dicha lista es identificada con el acrónimo ESC(K)PE e incluye los siguientes grupos de bacterias: *Enterococcus faecium*, con una alta prevalencia de resistencia a la vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), *Clostridioides difficile*, resistente a las fluoroquinolonas, *Klebsiella pneumoniae*, resistente a  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, *Acinetobacter baumannii*, resistente a carbapenémicos, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*, con resistencia a múltiples familias de antibióticos (Pintado, 2016; Argudín *et al.*, 2017).

### **1.2. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN EL SECTOR PORCINO**

La producción porcina constituye uno de los sectores ganaderos con mayores censos e impacto económico a nivel mundial. De acuerdo al último informe del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación sobre las cifras del sector, en nuestro país se superó la cifra de 56,4 millones de animales sacrificados en el 2020, manteniéndose en cuarta posición mundial en cuanto a producción de carne. Desde el punto de vista del uso de antibióticos, su consumo en el sector porcino es mayor que en otras especies,

empleándose principalmente penicilinas y tetraciclinas durante los periodos de lactación y destete (Lekagul *et al.*, 2019).

El uso de metales como el zinc (óxido de zinc, ZnO) o el cobre (sulfato de cobre, CuSO<sub>4</sub>) en pienso es, también, especialmente frecuente en el sector porcino, utilizándose en la prevención de diarreas tras el destete (Heo *et al.*, 2012). La administración de estos compuestos reduce el blandeo característico del destete, disminuyendo el impacto de las infecciones por *Escherichia coli* y mejorando la salud, el crecimiento y el bienestar de los animales (Hill y Shannon, 2019; Villagómez-Estrada *et al.*, 2020). No obstante, la elevada concentración a la que son empleados, por ejemplo, el ZnO por encima de 2.000 partes por millón o ppm y su baja absorción a nivel intestinal, hace que estos metales supongan un importante riesgo e impacto sobre el medio ambiente (Villagómez-Estrada *et al.*, 2020). En el caso específico del ZnO, el Comité Europeo de Medicamentos Veterinarios concluyó en el 2017 que los beneficios de su administración oral para la prevención de la diarrea en cerdos no superan al impacto medioambiental asociado a su uso, lo que ha llevado a retirar su autorización de comercialización a partir del año 2022 (European Medicines Agency Veterinary Medicines Division, 2017). Además, se ha demostrado que el uso de dosis subterapéuticas de estos metales durante largos periodos de tiempo puede favorecer la selección de bacterias resistentes a estos metales y, posiblemente, la co-selección de bacterias resistentes a antibióticos. En este sentido, la resistencia al zinc a menudo aparece asociada a la resistencia a la meticilina en *Staphylococcus* spp., y a múltiples antibióticos en *E. coli* mientras que la resistencia al cobre se relaciona con resistencia a macrólidos y glicopéptidos en *Enterococcus* spp., (Yazdankhah *et al.*, 2014), si bien se requiere de más estudios que identifiquen los mecanismos de co-selección implicados.

Existe un amplio abanico de factores que influyen en el uso de antibióticos en producción animal que incluyen desde el tipo y tamaño de la explotación, el manejo y la bioseguridad, las enfermedades presentes, la edad de los animales, la densidad, el nivel de estrés, la estación del año, el nivel educativo de los ganaderos o, incluso, el precio de los antibióticos (Lekagul *et al.*, 2019). Como hemos mencionado anteriormente, la administración de antibióticos para la prevención de enfermedades y la minimización de las pérdidas económicas asociadas a las mismas es una práctica habitual en las explotaciones porcinas intensivas (Lekagul *et al.*, 2019). En este contexto, los veterinarios juegan un papel esencial, siendo los responsables de elegir la/s molécula/s y establecer

los tratamientos más adecuados (Vischers *et al.*, 2015). Un estudio llevado a cabo en 25 países europeos en 2013, reveló que el 44,3 % de los veterinarios llevaban a cabo la prescripción de antibióticos sin haber recogido, de forma previa, muestras para la identificación del agente patógeno implicado y la determinación del perfil de sensibilidad del patógeno a los antibióticos (De Briyne *et al.*, 2013). Es probable que estas prácticas hayan cambiado, al menos parcialmente, en los últimos años gracias a los programas de sensibilización de los profesionales en lo que respecta al problema de resistencias antimicrobianas y que los datos puedan ser mejores en la actualidad.

### **1.3. ESTRATEGIAS PARA LA REDUCCIÓN DEL USO DE ANTIBIÓTICOS**

Aunque los niveles de consumo de antibióticos expresados en miligramos por unidad de corrección de la población o kilogramo de producto animal (mg/PCU) presentan una alta variabilidad entre países o regiones, la tendencia a nivel europeo es decreciente. De acuerdo con los datos recogidos en el marco del Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN), el sector veterinario en España ha logrado una reducción del 32,4 % en las ventas de antibióticos, eliminando casi por completo, por ejemplo, el consumo de colistina en producción porcina. No obstante, los esfuerzos dirigidos a disminuir el consumo de antibióticos en medicina veterinaria deben continuar. En este sentido, se ha propuesto que se podrían alcanzar niveles de reducción de consumo de antibióticos cercanos al 80 % hacia el 2030 mediante la implementación y el seguimiento de los planes de acción y los programas políticos globales orientados a establecer límites regulatorios para el uso de antibióticos, la aplicación de tarifas más altas en la compra al por mayor de antibióticos, así como conductas para disminuir el consumo de carne (Van Boeckel *et al.*, 2017).

Además, es necesario potenciar la investigación y favorecer el desarrollo de nuevos antibióticos y de estrategias alternativas, ocupando estas investigaciones un papel relevante en dichos planes de acción (Hernando-Amado *et al.*, 2019). Sin embargo, la complejidad y el alto coste que conlleva la formulación de una nueva molécula de antibiótico, cercano a mil millones de dólares (Van Boeckel *et al.*, 2017), así como las limitaciones que pueden llegar a presentar como son su escasa biodisponibilidad o su toxicidad sistémica (Xiong *et al.*, 2014; Gan *et al.*, 2021), hacen que la búsqueda de alternativas a los antibióticos sea una estrategia de mayor interés.

Entre las alternativas con mayor potencial destacan las vacunas, agentes inmunomoduladores, bacteriófagos y sus lisinas, péptidos antimicrobianos, probióticos, prebióticos y simbióticos, extractos de plantas, ácidos orgánicos (AOs) y antagonistas del *quorum sensing* (Cheng *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2019a; Gan *et al.*, 2021). En el ámbito específico de la medicina veterinaria y de acuerdo a Cheng *et al.* (2014), las alternativas a los antibióticos deberían de presentar o buscar las siguientes características:

1. Ausencia o mínima toxicidad y efectos secundarios sobre el animal.
2. Fácil eliminación del organismo no generando residuos o generando residuos durante corto plazo de tiempo.
3. No inducir resistencia bacteriana.
4. Ser estables en el alimento y el tracto gastrointestinal.
5. Presentar fácil degradación y sin efecto sobre el medio ambiente.
6. No afectar a la palatabilidad.
7. No afectar negativamente a la microbiota intestinal del animal.
8. Efecto bactericida o bacteriostático sobre bacterias patógenas.
9. Favorecer el desarrollo de la resistencia del hospedador a la enfermedad.
10. Mejorar el rendimiento transformador y promover el crecimiento animal.
11. Tener buena compatibilidad con otros medicamentos e ingredientes de la dieta.

Ninguna alternativa reúne todos los requisitos mencionados (Cheng *et al.*, 2014), pero los fitobióticos y los AOs despiertan particular interés ya que pueden administrarse de forma segura en el alimento y a un elevado número de animales con un bajo coste (Quitmann *et al.*, 2014; Lynch *et al.*, 2017; Omonijo *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2019a).

Por otro lado, es necesario indicar que la mejora de las condiciones de manejo e higiene es de vital importancia para la prevención y control de enfermedades infecciosas y el bienestar animal en las explotaciones porcinas (Laanen *et al.*, 2013). La aplicación de pautas de bioseguridad interna y externa, los manejos todo dentro-todo fuera, la instalación de sistemas adecuados para el control de temperatura y ventilación en las granjas, la reducción de la densidad animal, así como el fomento de la educación entre los ganaderos son pautas incluidas en la gran mayoría de los planes de acción diseñados para hacer frente al problema de la resistencia a los antibióticos (Hernando-Amado *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2019a).



Dentro de los protocolos de bioseguridad, es importante destacar que la aplicación de productos desinfectantes juega un papel de gran importancia en la limitación de la viabilidad de los microorganismos responsables de enfermedades infecciosas en el ambiente de las explotaciones animales (Bragg *et al.*, 2018). Al igual que ocurre con los fitobióticos y los AOs, la ausencia de desventajas asociadas a otras potenciales alternativas, como por ejemplo, la limitada protección cruzada o las dificultades asociadas a la producción de algunas vacunas (Van Panhuis *et al.*, 2013), el alto nivel de especificidad de la actividad de los bacteriófagos (Chan *et al.*, 2013), la falta de actividad directa frente a las bacterias de los inmunomoduladores, la citotoxicidad de los antagonistas del *quorum sensing* o la inestabilidad natural y fácil degradación de la mayoría de ellos (Cheng *et al.*, 2014), nos permiten señalar a los desinfectantes, así como a los compuestos naturales entre las estrategias más prometedoras en la actualidad para reducir el uso de antibióticos en las explotaciones animales, minimizando el efecto sobre la rentabilidad, la sanidad y el bienestar animal.

Desde el punto de vista regulatorio, es importante destacar que la gran mayoría de los AOs y fitobióticos se clasifican como aditivos alimentarios (European Commission, 2003) y que su empleo en alimentación animal en el ámbito europeo se regula por el Reglamento CE nº1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo. De forma similar, muchos de estos compuestos son reconocidos por la FDA como productos generalmente reconocidos como seguros (GRAS), hecho que facilita su empleo en condiciones de campo en las diferentes producciones animales. Por su parte, las listas de compuestos, mezclas y productos desinfectantes autorizados varían de forma continua gracias al desarrollo de nuevos productos o combinaciones. No obstante, el uso y comercialización de los desinfectantes o 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.

### **1.4. ÁCIDOS ORGÁNICOS**

La utilidad de los acidificantes en alimentación animal para mejorar la conservación y las condiciones higiénicas del pienso o el agua de bebida es conocida desde hace años (Quitmann *et al.*, 2014). Ampliamente distribuidos en la naturaleza como constituyentes normales de tejidos de animales y vegetales, los AOs son parte del metabolismo central necesario para suministrar energía a las células (Quitmann *et al.*, 2014). Además, son

originados durante la fermentación microbiana de carbohidratos en el intestino de los animales (Partanen y Mroz, 1999).

En un principio, la mayor parte de los AOs pueden ser producidos mediante procesos biotecnológicos o de síntesis química; así, la multiplicación de *Saccharomyces cerevisiae* en ausencia de oxígeno genera ácido acético mientras que el propiónico puede obtenerse a partir de compuestos petroquímicos (Quitmann *et al.*, 2014). No obstante, no todos estos ácidos presentan el mismo interés desde el punto de vista de su producción industrial debido al alto coste que puede llevar a implicar su proceso de síntesis o la falta de conocimiento detallado del mismo (Quitmann *et al.*, 2014).

#### ***1.4.1. Química de los ácidos orgánicos***

Los AOs, incluyendo los aminoácidos y los ácidos grasos, están formados por uno o más grupos carboxílicos (-COOH) a los que se atribuye su actividad biológica (Quitmann *et al.*, 2014). De acuerdo a Pearlin *et al.* (2020), pueden clasificarse como ácidos monocarboxílicos (ácido fórmico, acético, propiónico y butírico), ácidos con un grupo hidroxilo, normalmente en el carbono  $\alpha$  (ácido láctico, málico, tartárico y cítrico) o ácidos con dobles uniones (ácido fumárico y sórbico). Por otro lado, los AOs también pueden clasificarse en función del número de grupos carboxílicos, así como por la longitud de su cadena alifática, aunque el número de carbonos de los ácidos que engloba cada grupo puede variar en función del autor de la clasificación (Sheu y Freese, 1973; Dibner y Buttin, 2002; Huyghebaert *et al.*, 2011; Tugnoli *et al.*, 2020). A continuación, se detallan diferentes AOs ampliamente empleados como acidificantes en la dieta del ganado porcino de acuerdo a la bibliografía existente:

- El **ácido fórmico** constituido por un único átomo de carbono, corresponde a un líquido transparente y fuertemente oloroso ampliamente distribuido en la naturaleza, formando parte, por ejemplo, del tejido celular de animales y de la sangre (Partanen y Mroz, 1999). Desde el punto de vista metabólico, su anión formiato tiene gran relevancia participando en múltiples reacciones bioquímicas, así como en la biosíntesis de las bases púricas y, con ello, de los ácidos nucleicos (Friedman, 2017).
- Los **ácidos acético, propiónico y butírico**, que también corresponden a líquidos con olor penetrante y desagradable, representan los principales productos finales de la fermentación de la fibra que llevan a cabo las bacterias presentes en el colon

del cerdo (Kidder y Manners, 1978). Tanto el acetato como el butirato participan en el ciclo del ácido cítrico o de Krebs tras ser transformados en acetil Coenzima A o acetil-CoA, mientras que la ruta metabólica del propionato incluye la formación de moléculas de succinil-CoA con el metilmalonil-CoA como intermediario. Además, parte del propionato puede ser convertido en lactato por las células epiteliales capaces de oxidar el acetato (Partanen y Mroz, 1999).

- El **ácido láctico** es producido por un amplio espectro de microorganismos entre los que se incluyen bacterias del género *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Pediococcus* o *Leuconostoc*, levaduras, así como hongos filamentosos (Juturu y Wu, 2016). A nivel del estómago y del intestino delgado, este ácido corresponde a un producto final de la fermentación de azúcares, mientras que en las células musculares también puede ser generado en forma de lactato a partir del ácido pirúvico en condiciones de suministro insuficiente de oxígeno (Partanen y Mroz, 1999).
- El **ácido láurico** con un cierto aroma a jabón, es un ácido graso saturado ampliamente abundante en el aceite de coco con una actividad antimicrobiana significativa frente a bacterias, hongos y virus con envoltura (Matsue *et al.*, 2019; Yan Jer *et al.*, 2021). Gracias a que puede ser absorbido fácilmente por los enterocitos del epitelio intestinal, constituye además una fuente de energía relevante siendo capaz, consecuentemente, de modular la microbiota y mejorar la estructura de la mucosa intestinal (Rolinec *et al.*, 2020).
- • Los **ácidos fumárico** y **cítrico** corresponden a sólidos cristalinos y poco olorosos que actúan como importantes metabolitos intermediarios en el ciclo del ácido cítrico. En el caso específico del ácido fumárico, en el ganado porcino es obtenido a partir de la degradación de los aminoácidos fenilalanina y tirosina, así como por el ciclo de la urea y durante la síntesis de las purinas (Partanen y Mroz, 1999).
- **Otros AOs** como el ácido sórbico, tartárico o málico, presentes de forma natural en diferentes frutos vegetales y bayas, pueden tener cierta utilidad en la dieta de cerdos (Grilli *et al.*, 2015), aunque son principalmente empleados como conservantes alimentarios gracias a sus propiedades antifúngicas (Tugnoli *et al.*, 2020).

Tanto el efecto en la reducción del pH como la actividad biológica de un ácido vienen determinadas, principalmente, por la concentración del mismo, así como por su capacidad para pasar de su forma no disociada a disociada, parámetro que se expresa por su constante de disociación o ionización (pKa). Dicho valor equivale al pH al cual el 50 % del ácido aparece disociado, de forma que la capacidad de disociación del ácido es dependiente del pH del ambiente en el que se encuentra (Mroz, 2005). La mayoría de los AOs de interés son ácidos débiles, parcialmente disociados y con un valor pKa comprendido entre 3 y 5 (Partanen y Mroz, 1999; Dibner y Buttin, 2002) (Tabla 1). Su valor pKa va a influenciar el potencial uso del ácido. De esta forma, los ácidos de pKa alto tienen mejor actividad de conservación y son muy útiles en la industria alimentaria. Por el contrario, los ácidos con un mayor número de carbonos en su cadena carbonada, con mayor grado de insaturaciones y, por consiguiente, un pKa más bajo presentan una mayor actividad antimicrobiana en el estómago de los animales (Partanen y Mroz, 1999; Tugnoli *et al.*, 2020).

**Tabla 1.** Propiedades físicas y químicas de diferentes ácidos orgánicos (AOs) usados como acidificantes en el sector porcino. Adaptada de Partanen y Mroz (1999).

Ácido	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	Presentación	pKa	Solubilidad en agua
Fórmico	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	46,03	Líquida	3,75	Altamente soluble
Acético	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	60,50	Líquida	4,76	Altamente soluble
Propiónico	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	74,08	Líquida	4,88	Altamente soluble
Butírico	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88,12	Líquida	4,82	Altamente soluble
Láctico	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	90,08	Líquida	3,83	Muy soluble
Láurico	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	200,32	Sólida	5,30	Poco soluble
Sórbico	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	112,14	Sólida	4,76	Poco soluble
Fumárico	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	116,07	Sólida	3,02 4,44	Poco soluble
Málico	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	134,09	Líquida	3,40 5,10	Altamente soluble
Tartárico	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	150,09	Líquida	2,93 4,23	Muy soluble
Cítrico	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	192,14	Sólida	3,13 4,76 6,49	Muy soluble

Es necesario indicar que la solubilidad de los ácidos también disminuye a la vez que se incrementa el número de átomos de carbono. De esta forma, los ácidos con más de seis carbonos presentan una baja solubilidad en agua, lo que limita su aplicabilidad (Lim *et al.*, 2015). Por el contrario, gracias a su estado líquido y a su alta solubilidad en agua, los ácidos con cadena corta son ampliamente usados en alimentación animal (Tugnoli *et al.*, 2020). No obstante, muchos de los AOs de interés se administran en forma de sales de sodio, potasio o calcio, y/o parcialmente esterificados, debido a las múltiples ventajas que esto conlleva. Esas sales son generalmente menos olorosas, más fáciles de manipular durante el proceso de fabricación del pienso, menos corrosivas y más solubles que sus respectivos ácidos (Huyghebaert *et al.*, 2011).

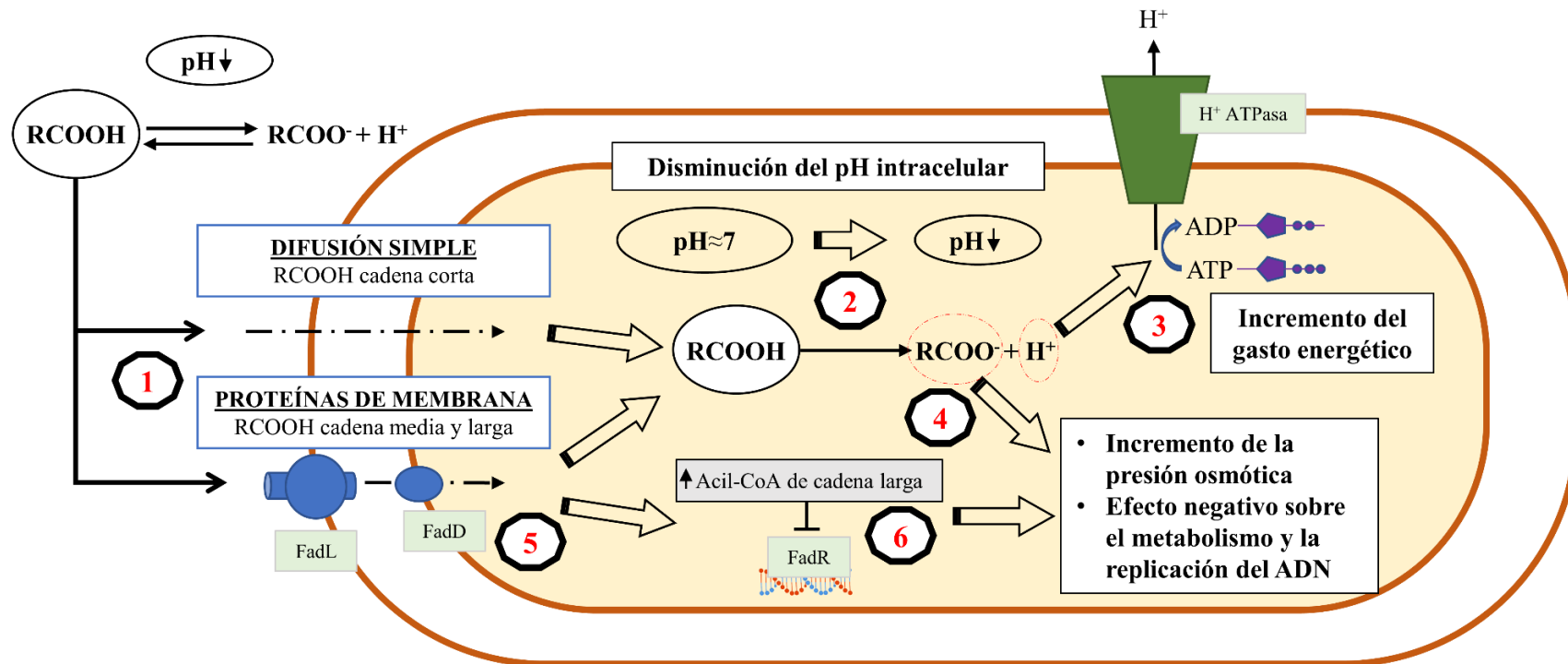
### ***1.4.2. Propiedades antimicrobianas de los ácidos orgánicos***

El amplio uso de AOs en diferentes aplicaciones en los últimos años se debe, principalmente, a sus reconocidas propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas (Tugnoli *et al.*, 2020). De forma específica, entre los principales factores que influyen en la actividad de los ácidos usados como aditivos alimentarios destacan: la fórmula y forma química (esterificado, sal, encapsulado...), la naturaleza lipofílica, el valor pKa específico, el peso molecular, la concentración efectiva frente al microorganismo diana, la estructura y composición de la pared y/o membrana celular del microorganismo, la especie animal diana y la capacidad amortiguadora del pienso o agua de bebida en el que se encuentre disuelto el ácido (Huyghebaert *et al.*, 2011).

La acción bactericida es explicada, para la mayoría de los AOs, a través del “*modelo del anión*” propuesto por Russel y Díez-González en 1998. Aunque el pH luminal en el íleon, ciego y colon de los cerdos suele ser superior a 6,5, el intercambio de iones de sodio ( $\text{Na}^+$ ) e hidrógeno ( $\text{H}^+$ ) que llevan a cabo las células del epitelio intestinal puede conllevar una disminución del pH local de la superficie de absorción intestinal (Partanen y Mroz, 1999). A bajo pH y como previamente se ha indicado, la proporción del ácido que se muestra en su forma no disociada puede difundir a través de la membrana celular gracias a su naturaleza lipofílica. Una vez dentro de la bacteria, el pH cercano a 7 en el citoplasma provoca la disociación del ácido y, con ello, la liberación de iones  $\text{H}^+$  y la disminución del pH intracelular. La acidificación del citoplasma puede conllevar una inhibición de las enzimas presentes, como pueden ser carboxilasas y catalasas, del transporte de nutrientes o incluso de la transducción de señales (Partanen y Mroz, 1999; Lambert y Stratford,

1999). Para compensar esta acidificación se produce la activación de bombas transmembranas de protones que expulsan protones al exterior. Al tratarse de un transporte activo o en dirección opuesta al gradiente de concentración, las bombas requieren de la energía potencial química del adenosín trifosfato o ATP, lo que supone un incremento del gasto energético bacteriano. Por su parte, el anión  $\text{RCOO}^-$  produce a su vez un incremento de la presión osmótica celular, así como un efecto negativo sobre la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y otras funciones metabólicas. La combinación de estos efectos inhibe los procesos de replicación bacteriana (Tugnoli *et al.*, 2020) (Figura 2).

Algunos ácidos de cadena media ( $\text{C}_{6/8}\text{-C}_{12}$ ) y los ácidos de cadena larga ( $\text{C}_{13-18}$ ) que no pueden difundir libremente debido a su elevado peso molecular requieren de proteínas de membrana para su entrada en la bacteria (Huyghebaert *et al.*, 2011). En detalle, las proteínas FadL y FadD presentes en la membrana externa e interna, respectivamente, pueden participar en su transporte. Los AOs del exterior pasan al espacio periplásmico a través de un canal de difusión específico originado a partir del cambio conformacional que sufren las proteínas FadL tras su unión con los ácidos. El pH más ácido del espacio periplásmico favorece que los AOs se muestren en su forma no disociada y sin carga que puede difundir a través de la membrana. Una vez en el interior celular, las proteínas o sintetasas específicas FadD de la membrana interna permiten la esterificación los ácidos grasos incorporados y, con ello, la formación de moléculas de acil-CoA de cadena larga (DiRusso y Black, 2004; Van Den Berg, 2005; Van Immerseel *et al.*, 2006). Aunque las moléculas de acil-CoA de cadena larga son catabolizadas a través de la ruta de la  $\beta$ -oxidación (Clark y Cronan, 2005), altos niveles intracelulares pueden conllevar la inhibición de la unión del factor de transcripción FadR al ADN, impidiendo la activación de genes implicados en la respuesta celular al estrés, así como en el metabolismo de ácidos grasos y del acetato, entre otros (DiRusso y Black, 2004) (Figura 2).



**Figura 2.** Mecanismo de acción por el que los ácidos orgánicos (AOs) presentan su actividad antibacteriana. 1. Transporte de los AOs hacia el interior celular a través de difusión simple (AOs de cadena corta) o por proteínas de membrana FadL (AOs de cadena media o larga). 2. Disociación de los AOs provocando la disminución del pH intracelular. 3. Activación de bombas de protones transmembranas o  $H^+$  ATPasas provocando la salida de protones ( $H^+$ ) hacia el exterior y la hidrólisis de adenosín trifosfato (ATP) a adenosín difosfato (ADP). 4. Incremento de los niveles intracelulares de aniones  $RCOO^-$  y con ello, de la presión osmótica. 5. Síntesis de moléculas de acil-Coenzima A (acil-CoA) de cadena larga a partir de AOs de cadena larga por la sintetasa FadD. 6. Inhibición del factor de transcripción FadR por altos niveles de acil-CoA de cadena larga.

Como se ha indicado anteriormente, el espectro de eficacia de los AOs puede variar en función de la naturaleza de la bacteria diana. Por ejemplo, se ha descrito que la presencia de lipopolisacárido (LPS) en la membrana externa de bacterias Gram negativas confiere resistencia frente a los ácidos de cadena larga, limitando su acumulación en el interior celular (Sheu y Freese, 1973). Así mismo, determinadas bacterias pertenecientes, por ejemplo, a los géneros *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* pueden soportar diferencias de pH importantes entre el interior y el exterior celular, gracias a las elevadas concentraciones citoplasmáticas de potasio que presentan. El potasio derivado de los procesos fermentativos que llevan a cabo estas bacterias es capaz de neutralizar los aniones ácidos, confiriendo cierta resistencia a estas moléculas (Russell y Díez-González, 1998; Pearlin *et al.*, 2020).

Otros mecanismos de la actividad de los AOs frente a bacterias son la reducción del pH del medio, por ejemplo, el lumen intestinal, que favorece el crecimiento de microbiota competidora, como las bacterias mencionadas en el párrafo anterior (Van Immerseel *et al.*, 2006). También suponen una fuente de carbono para el metabolismo de bacterias beneficiosas y finalmente, parece que los AOs ejercen una acción moduladora sobre la expresión de factores de virulencia de algunas bacterias patógenas. Por un lado, hay estudios que describen su capacidad para inhibir la expresión de genes de virulencia, como es el caso del ácido butírico (10 mM), propiónico (10 mM), caprónico (2 mM) y caprílico (2 mM) frente al gen *hilA* de *Salmonella* spp., (Boyen *et al.*, 2008b). Por otro, se ha comprobado que el ácido fórmico en cultivos celulares es capaz de restaurar la expresión de los genes de la isla de patogenicidad 1 (SPI-1) a concentraciones similares a las que se muestra este ácido en el íleon (aproximadamente 10 mM) (Huang *et al.*, 2008). Aunque los resultados parezcan, *a priori*, contradictorios, pueden ser indicativos de las señales quimiosensoriales mediante las cuales los patógenos se guían en el intestino para seleccionar el tramo diana para la infección. Así, el efecto combinado de ambos en condiciones naturales en el íleon, donde la concentración de ácido butírico es baja y la del ácido fórmico adecuada para la invasión por *Salmonella* spp., puede ser una de las principales explicaciones de la afinidad de esta bacteria por este tramo en cuestión.



## 1. Introducción

**Tabla 2.** Valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) expresados en partes por millón o ppm determinados para diferentes AOs.

Ácido orgánico	Especie bacteriana	CMI (ppm)	Referencia
Ácido fórmico	<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	14.726,4	(Vande Maele <i>et al.</i> , 2016)
	<i>Campylobacter jejuni</i>	5.890,6	(Peh <i>et al.</i> , 2020)
	<i>C. coli</i>	2.945,3	
Formiato sódico	<i>Escherichia coli</i>	>20.000,0	(Kovanda <i>et al.</i> , 2019)
	<i>Salmonella enterica</i>	>20.000,0	
	<i>C. jejuni</i>	2.000,0	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	>20.000,0	
	<i>Clostridium perfringens</i>	18.800,0	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	15.800,0	
Ácido acético	<i>S. suis</i>	11.000,0	(Hsiao y Siebert, 1999)
	<i>E. coli</i>	1.550,0	
	<i>C. jejuni</i>	3.843,2	
	<i>C. coli</i>	3.843,2	
	<i>S. enterica</i>	3.120,0	
Ácido propiónico	<i>B. hyodysenteriae</i>	9.608,0-19.216,0	(Vande Maele <i>et al.</i> , 2016)
	<i>B. hyodysenteriae</i>	11.852,0	(Vande Maele <i>et al.</i> , 2016)
	<i>C. jejuni</i>	2.370,6	(Peh <i>et al.</i> , 2020)
	<i>C. coli</i>	4.741,1	
Ácido butírico	<i>Clostridioides difficile</i>	1.250,0	(Yang <i>et al.</i> , 2018)
	<i>E. coli</i>	1.410,0	(Hsiao y Siebert, 1999)
	<i>S. enterica</i>	2.300,0-2.500,0	(Kovanda <i>et al.</i> , 2019)
	<i>C. jejuni</i>	500,0-800,0	(Kovanda <i>et al.</i> , 2019)
	<i>E. faecalis</i>	2.000,0	
	<i>C. perfringens</i>	1.200,0	
	<i>S. pneumoniae</i>	1.000,0	
	<i>S. suis</i>	700,0	
	<i>B. hyodysenteriae</i>	3.524,4-7048,8	
	<i>C. difficile</i>	25.000,0	(Yang <i>et al.</i> , 2018)
Ácido láctico	<i>E. coli</i>	3.720,0	(Hsiao y Siebert, 1999)
	<i>S. enterica</i>	1.560,0	(El Baaboua <i>et al.</i> , 2018)
	<i>B. hyodysenteriae</i>	14.412,8-28.825,6	(Vande Maele <i>et al.</i> , 2016)
Ácido tartárico	<i>E. coli</i>	50.000,0	(Hsiao y Siebert, 1999)
	<i>S. enterica</i>	3.120,0	(El Baaboua <i>et al.</i> , 2018)
Ácido cítrico	<i>E. coli</i>	38.200,0	(Hsiao y Siebert, 1999)
	<i>S. enterica</i>	6.125,0	(El Baaboua <i>et al.</i> , 2018)
	<i>B. hyodysenteriae</i>	3.842,4-7.684,8	(Vande Maele <i>et al.</i> , 2016)

Actualmente, en la literatura científica existe una dilatada lista de estudios centrados en determinar la concentración específica con actividad antimicrobiana para cada ácido orgánico frente a múltiples especies bacterianas. En este sentido, la concentración mínima capaz de inhibir el crecimiento de las bacterias (CMI) o concentración bacteriostática ha sido ampliamente usada a nivel de laboratorio como medida para definir dicha actividad de una forma relativamente rápida (Yoon *et al.*, 2018). No obstante, existe una amplia variabilidad en los resultados proporcionados por dichos estudios, consecuencia de aspectos técnicos relativos a los métodos empleados para la estimación de la CMI (Balouiri *et al.*, 2016). En la Tabla 2 aparecen recogidos valores de CMI de diferentes AOs y sales aportados por estudios previos frente a múltiples especies bacterianas con relevancia en el sector porcino.

La actividad de los AOs no se limita a su acción contra bacterias, sino que diversos trabajos científicos han descrito su potencial uso como agentes antivirales. Actualmente, existe un amplio número de trabajos que han demostrado su eficacia frente a virus tanto con ADN como con ácido ribonucleico (ARN) con gran relevancia en la salud pública, así como la influencia que ejercen los grupos funcionales presentes en su estructura molecular en esta actividad (Poli *et al.*, 1979; Turner *et al.*, 2004; Balta *et al.*, 2020). Entre los mecanismos de acción por los que los AOs pueden ejercer su actividad viricida se encuentran el bloqueo de la interacción entre la proteína vírica de unión y los receptores celulares específicos (Hansman *et al.*, 2012) o efecto sobre etapas tardías del ciclo replicativo, sin afectar a la síntesis de las proteínas pero si interfiriendo en su inserción en la envoltura viral (Bartolotta *et al.*, 2001). A modo de ejemplo, destaca el efecto del ácido láurico (250  $\mu$ M) sobre el arnavirus Junín, causante de la fiebre hemorrágica argentina (Bartolotta *et al.*, 2001), o el ácido cítrico ( $\geq 2$  %, p/v) sobre el virus de la fiebre aftosa (Hong *et al.*, 2015).

En contraposición a lo que ocurre en el ámbito de la medicina humana, es reseñable el número limitado de estudios centrados en la evaluación de la actividad antivírica de los AOs frente a virus con impacto sobre la salud animal, principalmente sobre aquellos en los que aún no existen vacunas efectivas (Li *et al.*, 2018). Cabe mencionar que la pandemia ocasionada por el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo tipo 2 (SARS-CoV-2) ha puesto de manifiesto la indudable necesidad de investigar potenciales reservorios animales de virus, así como aspectos relevantes en la prevención y control de su transmisión a otras especies (Ye *et al.*, 2020).

### ***1.4.3. Empleo de ácidos orgánicos en ganado porcino***

El uso de acidificantes en el sector porcino persigue dos claros objetivos; por un lado, buscar mejorar las condiciones de conservación de los piensos y, con ello, disminuir el riesgo de transmisión de patógenos a través del alimento (Tugnoli *et al.*, 2020). En este sentido, se ha estimado que la adición de AOs conlleva una disminución del pH de la dieta de 5,95 a 4,71 (Tung y Pettigrew, 2006). Por otro lado, su administración también tiene por objetivo al animal, mejorando su salud y productividad mediante los múltiples efectos beneficiosos asociados al uso de estos AOs (Tung y Pettigrew, 2006).

A nivel del **aparato digestivo**, el impacto positivo de los AOs parece estar asociado a la estimulación de la función digestiva y a su reconocido papel en el control de disbiosis intestinal ocasionada principalmente por coliformes (Tung y Pettigrew, 2006).

Aunque el tipo de ácido, la dosis y el tipo de dieta son factores que influyen en el efecto de los AOs sobre la capacidad del cerdo para digerir los nutrientes, se ha estimado que pueden conllevar incrementos cercanos al 0,82 % y 1,33 % de la digestibilidad de materia seca y de proteína cruda, respectivamente (Tugnoli *et al.*, 2020). De acuerdo con Partanen y Mroz (1999), estos incrementos observados principalmente en cerdos de engorde pueden deberse al incremento del tiempo de retención gástrica, así como a la estimulación de las secreciones gástricas de agua, electrolitos y enzimas digestivas que conlleva el uso de AOs. En la actualidad, no existen resultados definitivos sobre si existe una reducción del pH gástrico tras la administración de AOs (Tugnoli *et al.*, 2020).

Además, el incremento de la digestibilidad de nutrientes puede explicarse también por su participación en el metabolismo intermediario esencial para la síntesis de moléculas biológicamente relevantes, estimulando la actividad de determinadas enzimas (transaminasas, deshidrogenasas, transferasas...) y cediendo la cadena carbonada para la síntesis de aminoácidos no esenciales o actuando como precursores de los mismos (Gabert y Sauer, 1994). Dicho efecto también puede ser explicado por la influencia indirecta que pueden ejercer los AOs sobre la morfología de la mucosa intestinal principalmente debido a su efecto sobre la proliferación de células epiteliales (Partanen y Mroz, 1999). Así, se ha demostrado que ácidos de cadena corta derivados de la fermentación microbiana de carbohidratos como son el ácido acético, propiónico o butírico estimulan la replicación de células epiteliales en el intestino (Partanen y Mroz, 1999). De igual forma, se ha demostrado que la administración de una dieta suplementada

con butirato sódico al 0,17 % (p/p) en cerdos de engorde incrementó un 33,5 % el número de células en el epitelio intestinal y hasta un 30,1 % la altura de las vellosidades en el íleon (Gálfi y Bokori, 1990). La influencia positiva de la altura de las vellosidades sobre la ganancia de peso y, por consiguiente, sobre la reducción del tiempo necesario para que los cerdos alcancen el peso de sacrificio ha sido sugerida previamente (Pluske *et al.*, 1996).

Por otro lado, la absorción y retención de ciertos minerales entre los que se incluyen calcio, fósforo, magnesio o zinc también parece incrementarse tras el uso de AOs (Tugnoli *et al.*, 2020). A modo de ejemplo, el ácido cítrico puede limitar la excreción en las heces de calcio y fósforo, probablemente por favorecer la quelación del calcio, así como la actividad de enzimas encargadas de la digestión del fósforo o fitasas, tanto intrínsecas como de origen microbiano, incrementando la solubilidad del ácido fítico, principal fuente de fósforo en vegetales (Partanen y Mroz, 1999; Boling *et al.*, 2000). Estos últimos efectos pueden ser explicados por la reducción de pH que provoca el ácido cítrico ya que las fitasas muestran dos valores de pH óptimos, un valor bajo de 2,5 y otro pH ácido moderado alrededor de 5,0. Además, el ácido fítico es mucho más soluble a pH ácido (Dibner y Buttin, 2002). No obstante, es importante destacar que la magnitud del efecto de los AOs sobre la absorción de minerales está fuertemente influenciada por el tipo de dieta, así como por el contenido mineral de la misma (Partanen y Mroz, 1999).

El efecto modulador de los AOs sobre la microbiota intestinal viene determinado, una vez más y como ha sido descrito anteriormente, por la reducción de pH que provocan y que inhibe el crecimiento de bacterias sensibles a pH ácido, muchas de ellas englobadas en los grupos de bacterias patógenas y oportunistas, como pueden ser determinados grupos de enterobacterias. Asimismo, estas condiciones favorecen la multiplicación de taxones beneficiosos o deseables, entre ellas las bacterias ácido lácticas y bacterias productoras de ácido butírico (Tugnoli *et al.*, 2020). Las condiciones creadas y la colonización por bacterias deseables también limita y desplaza a potenciales patógenos por mecanismos de exclusión competitiva, ya que estos grupos de bacterias bloquean los sitios de adhesión, compiten por los nutrientes disponibles y producen bacteriocinas y metabolitos que crean un ambiente restrictivo para patógenos (Partanen y Mroz, 1999).

En este sentido, Ahmed *et al.* (2014) demostraron una disminución significativa del recuento de *E. coli* y *Salmonella* spp., así como un incremento de *Lactobacillus* spp., en

muestras de heces de cerdos destetados que fueron tratados con ácido cítrico (0,5 %, (p/p), así como con una combinación de AOs (ácido fórmico 17,2 %, propiónico 4,1 %, láctico 10,2 % y fosfórico 9,5 %) al 0,4 %, (p/p) en comparación a las muestras obtenidas de cerdos no tratados. Del mismo modo, la administración de ácido fórmico a concentraciones iguales o superiores a 1 % se asoció a una disminución de coliformes en el intestino delgado (Tugnoli *et al.*, 2020), al igual que la administración de pienso suplementado con 0,3 % (p/p) de ácidos de cadena media (ácido caprílico y cáprico) en el recuento específico de *E. coli* en el yeyuno o en el ciego de cerdos destetados (Hanczakowska *et al.*, 2016).

Por otro lado, el efecto que presentan los AOs sobre la microbiota, así como sobre la digestibilidad de los nutrientes está fuertemente condicionado por la capacidad de los piensos para neutralizarlos y evitar cambios en el pH en el aparato digestivo (Partanen y Mroz, 1999). Esta eficacia amortiguadora está particularmente influenciada por ingredientes como productos lácteos, proteínas vegetales o minerales; capaces de comprometer los beneficios de los AOs sobre el hospedador. En este sentido, las discrepancias existentes entre los resultados obtenidos en distintos estudios valorando su eficacia pueden explicarse, al menos parcialmente, por las diferencias en la composición de los piensos que los vehiculan (Dibner y Buttin, 2002; Tugnoli *et al.*, 2020).

Los AOs también desempeñan un papel destacable en la regulación del **sistema inmunitario**. A modo de ejemplo, la inclusión de butirato sódico (1 g/kg) en la dieta de cerdos destetados tuvo un efecto positivo sobre la respuesta adaptativa de los lechones tratados, incrementando la concentración sérica de inmunoglobulinas del tipo IgG y de células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas IgA del intestino (Fang *et al.*, 2014). Otros estudios han destacado el impacto sobre el estatus inflamatorio, así como sobre la función de la barrera epitelial del intestino en un momento crítico de la vida de cerdos como es el destete (Grilli *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2019). De acuerdo con Grilli *et al.* (2016), el butirato sódico encapsulado (960 mg/kg de ácido butírico) es capaz de inducir una respuesta diferencial a lo largo del tracto intestinal sobre los niveles de expresión de citoquinas inflamatorias, así como de proteínas involucradas en uniones estrechas de células epiteliales. En concreto, en estos y otros trabajos se describe que el transporte activo de butirato incrementa los niveles de transcripción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y del interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) en el duodeno debido posiblemente a la mayor expresión de proteínas encargadas del transporte activo del butirato a este nivel y,

con ello, a su mayor absorción (Guilloteau *et al.*, 2010; Grilli *et al.*, 2016). Por el contrario, en el colon el efecto sería el contrario, disminuyendo la expresión de estas citoquinas, probablemente a consecuencia de la inhibición que el butirato ejerce sobre el factor nuclear kappa B o NF- $\kappa$ B, involucrado en la regulación de la expresión de genes que codifican citoquinas proinflamatorias, enzimas inductoras de la inflamación, moléculas de adhesión, factores de crecimiento, proteínas de choque térmico y receptores especializados en la detección de patógenos (Vinolo *et al.*, 2011; Leonel y Alvarez-Leite, 2012).

En lo referente a la acción sobre las proteínas de adhesión celular, los resultados también parecen contradictorios. Así, el tratamiento con butirato encapsulado (960 mg/kg de ácido butírico) indujo una menor expresión de las proteínas claudina-1 a lo largo del tracto intestinal y una mayor expresión de las ocludinas, principalmente en el duodeno (Grilli *et al.*, 2016). En contraposición, otro estudio observó una estimulación de la expresión tanto de claudina-1 como de otras proteínas de vital importancia para la integridad de la barrera intestinal a nivel del yeyuno tras la administración de una dieta suplementada con succinato sódico al 1 % (v/p). Además, este compuesto favoreció la expresión de citoquinas inflamatorias como las interleucinas IL-25 o IL-10, capaces de atenuar una respuesta inflamatoria excesiva, mantener la integridad de la barrera intestinal y, con ello, promover la homeostasis intestinal (Li *et al.*, 2019).

Además de los efectos directos sobre el sistema inmunitario mencionados, es importante destacar que los AOs al inhibir el crecimiento de determinados grupos de bacterias de la microbiota digestiva promueven, indirectamente, una reducción de la inflamación local (Guilloteau *et al.*, 2010). Asimismo, la reducción de infecciones promovidas por patógenos sensibles a pH ácido conlleva, a su vez, un descenso de la demanda de nutrientes por parte de las células responsables de la respuesta inmunitaria en el aparato digestivo (Dibner y Buttin, 2002).

## 1. Introducción

**Tabla 3.** Efectos observados en el ganado porcino tras la administración de diferentes AOs en la dieta. Adaptada de Arguello *et al.* (2012).

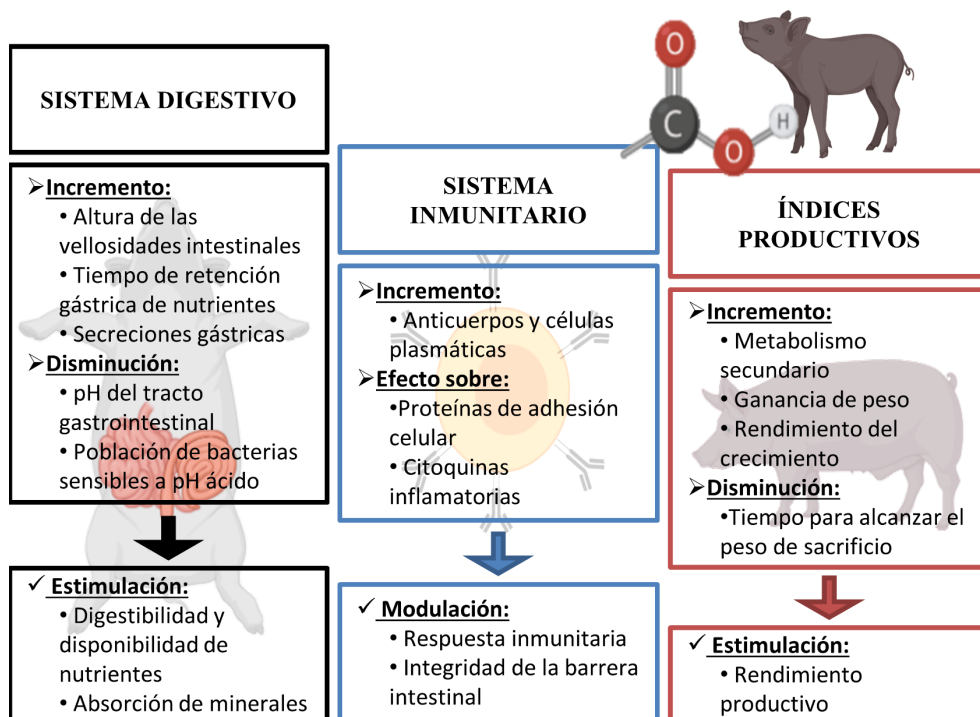
Ácidos orgánicos	Etapas de crecimiento	Vía de administración	Concentración	Duración del tratamiento	Resultados y discusión	Referencia
Mezcla de ácido láctico (56 %), fórmico (23 %), propiónico (13 %) y acético (5 %)	Cebo	Agua	0,035 % (v/v)	60 días	Disminución de la seroprevalencia y prevalencia en heces de <i>Salmonella</i> spp., al final del periodo de engorde.	(Argüello <i>et al.</i> , 2010)
Mezcla de ácido fórmico (50 %) y propiónico (50 %)	Cebo	Pienso	a) 1,2 % (p/p) b) 0,8 % (p/p)	a) 14 semanas b) 8 semanas	a) Reducción de <i>Salmonella</i> spp., en ganglios linfáticos mesentéricos. b) Reducción de <i>Salmonella</i> spp., en ganglios linfáticos mesentéricos y en contenido cecal.	(Creus <i>et al.</i> , 2007)
a) Ácido propiónico b) Ácido málico c) Ácido fórmico d) Ácido láctico e) Ácido cítrico f) Ácido fumárico	Destete	Pienso	a) 1,0 % (v/p) b) 1,2 % (v/p) c) 1,2 % (v/p) d) 1,6 % (v/p) e) 1,5 % (v/p) f) 1,5 % (v/p)	14 días	Todos los tratamientos redujeron la prevalencia en heces de <i>E. coli</i> enterotoxigénica o ETEC, redujeron la incidencia y gravedad de los brotes de diarrea y mejoraron el crecimiento, especialmente los animales que recibieron ácido láctico.	(Tsiloyiannis <i>et al.</i> , 2001)
Ácido cítrico	Destete	Pienso	0,15 % (p/p)	-	Incremento de la GMD.	(Tsiloyiannis <i>et al.</i> , 2001)
Mezcla de ácido láctico (8 %), fórmico (23 %), formiato de amonio (28 %), propiónico (3 %) y sórbico (1 %)	Cebo	Agua	0,2 % (v/v)	12 semanas	Disminución de la seroprevalencia de <i>Salmonella</i> spp.	(van der Wolf <i>et al.</i> , 2001)

Por último, existe un amplio número de trabajos centrados en el estudio del efecto de la inclusión en la dieta de AOs sobre diferentes **parámetros productivos** del ganado porcino. A pesar de la gran variedad en los resultados, influenciados por factores como la dosis, el tiempo de suplementación o la edad de los cerdos, entre otros, existe un claro consenso sobre la eficacia de este tipo compuestos en condiciones de campo sobre el rendimiento productivo de cerdos tanto en la etapa de destete como de engorde, así como de reproductoras (Partanen y Mroz, 1999; Dibner y Buttin, 2002; Mroz, 2005; Tugnoli *et al.*, 2020; Pearlin *et al.*, 2020).

De acuerdo a un metaanálisis llevado a cabo con los datos disponibles antes de 1999, las sales del ácido fórmico parecen ejercer un efecto promotor destacable sobre el crecimiento de cerdos de engorde (Partanen y Mroz, 1999). De igual forma, se ha descrito un incremento del 23,5 % de la ganancia media diaria (GMD) tras la administración de butirato sódico (0,17 %, p/p) en cerdos de 7 a 102 kg de peso (Gálfi y Bokori, 1990). En el caso específico de las cerdas reproductoras, se ha observado un aumento en el rendimiento del crecimiento asociado a la administración de butirato sódico, así como una mayor ingesta media diaria de alimento (IMDA) a partir del tercer día tras el parto, una menor pérdida de peso durante la lactación y una menor reducción de la grasa dorsal tras la inclusión de diformiato de potasio (8 kg/t) en el pienso (Lückstädt, 2011; Pearlin *et al.*, 2020). Además, los lechones de las cerdas expuestas a diformiato potásico (0,8 % y 1,2 %, p/p) mostraron un mayor peso al nacimiento y al destete, así como un incremento de la GMD (Øverland *et al.*, 2009).

Además de los descritos anteriormente, en la Tabla 3 aparecen detallados diferentes efectos observados por otros autores en el ganado porcino tras la inclusión de AOs en la dieta. A modo de resumen, en la figura 3 aparecen detallados los múltiples efectos de los AOs que han sido descritos en el cerdo. Estos efectos nos permiten concluir que la suplementación de piensos con AOs ejerce un efecto sobre el metabolismo general con consecuencias positivas sobre la salud y el crecimiento del ganado porcino (Tugnoli *et al.*, 2020; Pearlin *et al.*, 2020). No obstante, por el momento no existe un claro consenso en aspectos tan significativos como la dosis de administración de este tipo de compuestos, las concentraciones mínimas efectivas, el espectro de actividad o el efecto sobre las células intestinales.





**Figura 3.** Principales efectos asociados a la administración de AOs en el ganado porcino. Adaptada de Pearlin *et al.* (2020) e imágenes obtenidas de *Biorender.com*.

## 1.5. ACEITES ESENCIALES

Los fitobióticos son compuestos con actividad biológica extraídos de plantas (semillas, flores, hojas, frutos, raíces...) y empleados en nutrición animal como aditivos alimentarios por sus múltiples efectos beneficiosos (Cheng *et al.*, 2014). Entre estos fitobióticos se encuentran los aceites esenciales (AEs), mezclas complejas de compuestos volátiles, aromáticos y derivados del metabolismo secundario generalmente de plantas con órganos diferenciados y tejidos vasculares. Estos metabolitos secundarios, inicialmente considerados como compuestos sobrantes de los procesos metabólicos, desempeñan un papel fundamental para la supervivencia de las plantas proporcionando, por ejemplo, protección frente al daño provocado por insectos y bacterias (Díaz-Sánchez *et al.*, 2015).

La biosíntesis de AEs se localiza principalmente en estructuras histológicas especializadas como tricomas glandulares o cavidades secretoras de la superficie de las plantas (Bruneton, 1999). Aunque pueden acumularse en cualquier tipo de órgano vegetal, variando su composición cualitativa y cuantitativa, los AEs se encuentran principalmente en flores, hojas y tallos.

La destilación por vapor es el método de extracción de AEs más empleado. Debe llevarse a cabo inmediatamente tras la obtención y limpieza de la materia prima vegetal de partida con el objetivo de evitar cualquier actividad enzimática o microbiana que pueda alterar su composición (Greathead, 2003).

En la actualidad se han descrito más de 3.000 AEs de los cuales 300 tienen potencial comercial por sus reconocidas propiedades antimicrobianas, antiparasitarias, antiinflamatorias o antioxidantes, entre otras (Brenes y Roura, 2010; Díaz-Sánchez *et al.*, 2015). En el ámbito específico de la medicina veterinaria, los AEs están ampliamente difundidos siendo frecuente su uso como aditivos alimentarios por su actividad antimicrobiana y su efecto sobre el crecimiento animal (Omonijo *et al.*, 2018). Un aspecto importante es el relativo a la variabilidad de la eficacia o actividad de los AEs, consecuencia de diferencias en la calidad y la cantidad de sus compuestos activos específicos que pueden variar en función de diversos factores. Entre los múltiples condicionantes que pueden influir en su actividad destacan los asociados a la planta de origen como pueden ser la especie y el genotipo de la planta, el origen geográfico o las condiciones de recolección, así como las condiciones empleadas para su extracción y conservación (Burt, 2004; Huyghebaert *et al.*, 2011). Además, el estado del animal, el tipo de infección, la composición del pienso y las condiciones ambientales son factores que pueden influir en la actividad asociada a los AEs, al igual que ocurre con cualquier aditivo alimentario (Greathead, 2003).

Por último, existen aspectos aún no completamente estudiados que afectan al uso de AEs en nutrición animal. En este sentido, destacan el estudio de su potencial efecto citotóxico o de sus mecanismos de acción, aspectos de vital importancia para optimizar su uso (Omonijo *et al.*, 2018). Las concentraciones con actividad antibacteriana de la mayoría de los AEs son mucho más elevadas que los niveles habitualmente empleados en el ámbito de la nutrición (Yang *et al.*, 2015). Por otro lado, parámetros como la volatilidad y la limitada solubilidad comprometen la actividad de este tipo de compuestos y hacen que la búsqueda de nuevas formas de administración y conservación, como puede ser la microencapsulación sea de enorme interés (Díaz-Sánchez *et al.*, 2015).

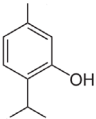
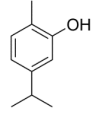
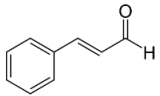
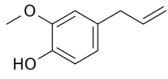
### 1.5.1. Química de los aceites esenciales

La cromatografía de gases y la espectrometría de masas nos permiten analizar y distinguir los diferentes componentes que constituyen los AEs; por un lado, los componentes principales que constituyen más del 85 % de la composición total y, por otro, los componentes secundarios o minoritarios. A pesar de que las propiedades biológicas de los AEs son atribuidas a los componentes principales, se ha postulado que los componentes secundarios presentes en baja concentración pueden jugar un papel importante, potenciando la actividad en la mayoría de los casos. En este sentido, se considera que los AEs en conjunto presentan una mayor actividad antibacteriana que la correspondiente a la mezcla de sus componentes principales (Brenes y Roura, 2010).

Respecto a los componentes principales, se distinguen principalmente dos grandes grupos, los terpenos formados por un número determinado de unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) y los fenilpropenos formados por un anillo aromático de benceno ( $C_6H_6$ ) y una cadena de tres carbonos. Los terpenos pueden clasificarse en función del número de isoprenos, de la orientación espacial de determinados átomos o grupos de átomos, así como de la presencia o no de estructura anular o dobles enlaces (Lee *et al.*, 2004). En nutrición animal destacan el timol y el carvacrol dentro del grupo de los terpenos y el cinamaldehído y el eugenol en el de los fenilpropenos (Omonijo *et al.*, 2018) (Tabla 4).

El **timol** (2-metil-5-(1-metiletil)fenol) y el **carvacrol** (2-metil-5-(1-metiletil)fenol), principales componentes de los AEs de timo o tomillo y orégano, respectivamente, son moléculas análogas que difieren en la localización del grupo hidroxilo responsable de su actividad (Tabla 4). Presentan como precursores biológicos el *p*-cymeno y el  $\gamma$ -terpineno, localizándose en la naturaleza en plantas de la familia de las lamiáceas, principalmente de las especies *Origanum* spp., (*O. vulgare*, *O. intercedens*, *O. ornites* y *O. marjoram*) y *Thymus* spp., (*Thymus vulgaris* y *Thymus zygis*) (Brenes y Roura, 2010). Gracias a sus propiedades conservantes y aromáticas, tanto el AE de tomillo como de orégano se incluyen entre los AEs más utilizados en alimentación (Sakkas y Papadopoulou, 2017). De igual forma, ambos AEs con propiedades antimicrobianas, antioxidantes o antiespasmódicas, entre otras, han sido extensamente empleados en medicina tradicional para el tratamiento de un amplio abanico de enfermedades (Salehi *et al.*, 2018; Sharifi-Rad *et al.*, 2021).

**Tabla 4.** Propiedades químicas de los componentes principales de aceites esenciales (AEs) más utilizados en el ganado porcino. Adaptada de Omonijo *et al.* (2018).

Compuesto	Fórmula molecular	Fórmula química	Peso molecular (g/mol)	Presentación	Solubilidad en etanol
Timol	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O		150,22	Sólida	Altamente soluble
Carvacrol	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O		150,22	Líquida	Muy soluble
Cinamaldehído	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O		132,16	Líquida	Muy soluble
Eugenol	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>		164,20	Líquida	Muy soluble

Por su parte, el **cinamaldehído** (3-fenil-2-propenal) corresponde a una sustancia bioactiva presente en la corteza de diferentes plantas del género *Cinnamomum*, perteneciente a la familia de las lauráceas, entre los que se incluye el árbol de la canela (*C. verum* o *C. zeylanicus*) (Lee *et al.*, 2004). Constituye el principal componente del AE de canela a partir del cual se extrae por hidrodestilación o con diferentes fluidos en condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico (Friedman, 2017). La canela es una especia culinaria que ha sido utilizada durante mucho tiempo como remedio, especialmente para dolencias respiratorias y digestivas (Kawatra y Rajagopalan, 2015).

Finalmente, el **eugenol** (2-metoxi-4-(2-propenil)fenol) es el componente principal del AE del clavo (*Syzygium aromaticum*, perteneciente a la familia de las mirtáceas), extraído principalmente a partir de botones florales por destilación por arrastre de vapor (Rana *et al.*, 2011). Este AE es ampliamente utilizado como sustancia aromática en perfumes y como saborizante y conservante en la comida, así como en la medicina tradicional para

el tratamiento, por ejemplo, de trastornos alérgicos (Cortés-Rojas *et al.*, 2014; Batiha *et al.*, 2020).

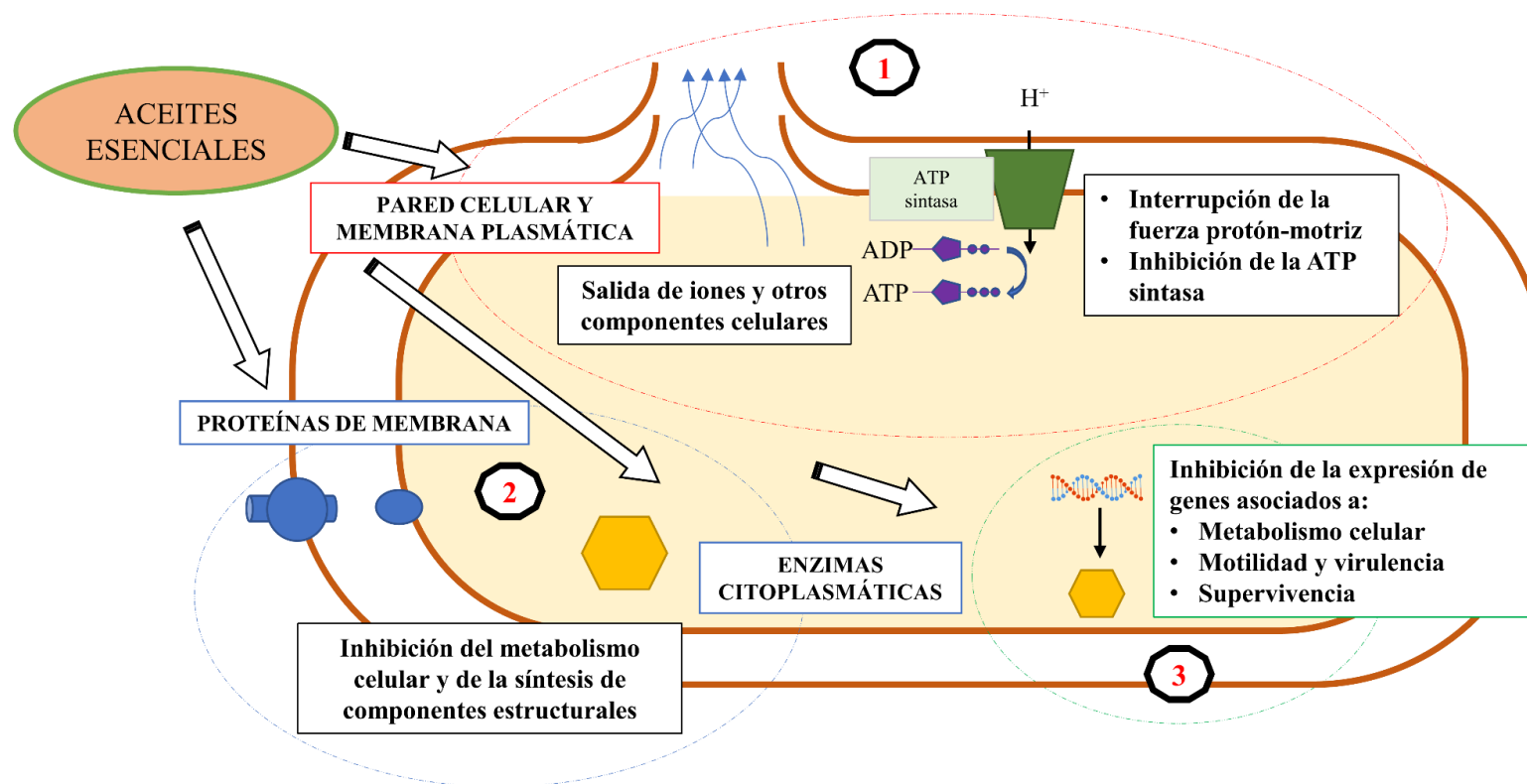
En el caso específico de los terpenos, su marcado carácter lipofílico les permite formar micelas y penetrar fácilmente en las membranas celulares. Además, los polifenoles presentan un marcado carácter hidrofílico que les permite interactuar con otros constituyentes de la dieta, principalmente con los hidratos de carbono (Horky *et al.*, 2019).

Finalmente, los AEs son prácticamente insolubles en agua, pero altamente solubles en etanol y otros disolventes orgánicos (Omonijo *et al.*, 2018). Es importante destacar que la capacidad para interactuar con otros compuestos, así como la solubilidad específica de cada AE influyen tanto en su absorción como en su metabolismo, localizado principalmente en el intestino delgado del hospedador (Horky *et al.*, 2019).

### ***1.5.2. Propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales***

En la literatura científica existe actualmente una dilatada lista de estudios centrados en determinar la actividad antibacteriana de los AEs (Inouye *et al.*, 2001; Prabuseenivasan *et al.*, 2006; Laird y Phillips, 2012; O'Bryan *et al.*, 2015; Ebani *et al.*, 2017; Semeniuc *et al.*, 2017; de Aguiar *et al.*, 2018; Man *et al.*, 2019). Destaca la amplia variabilidad en los resultados obtenidos consecuencia tanto de los factores previamente citados que influyen en la composición de los AEs como de aspectos relativos a las técnicas empleadas para la estimación de esta actividad. Además, es necesario indicar que existe variabilidad en la sensibilidad a los AEs entre cepas de una misma especie (Omonijo *et al.*, 2018). Todo ello hace muy complicada la comparación de los diferentes estudios (Balouiri *et al.*, 2016).

A pesar de que existen ciertas discrepancias, se considera que la actividad de los AEs puede ser ligeramente superior frente a bacterias Gram positivas que frente a Gram negativas (Burt, 2004; Omonijo *et al.*, 2018). De acuerdo a Vaara (1992), la membrana externa compuesta por fosfolípidos y LPS que envuelve la membrana citoplasmática de las bacterias Gram negativas puede conferir cierta resistencia al paso de compuestos hidrófobos como los AEs. Por el contrario, las bacterias Gram positivas presentan una pared celular constituida principalmente por peptidoglicano (90-95 %), con alta permeabilidad a estos compuestos hidrófobos (Omonijo *et al.*, 2018).



**Figura 4.** Principales mecanismos de acción de los aceites esenciales (AEs) que se han postulado hasta la fecha. **1.** Disrupción de la envoltura celular provocando la salida de iones y componentes celulares, así como la interrupción de la fuerza protón-motriz. **2.** Alteración de la actividad tanto de proteínas de membrana como de enzimas citoplasmáticas. **3.** Inhibición de la expresión de genes asociados con el metabolismo, motilidad, virulencia y supervivencia celular.

El carácter hidrofóbico de algunos AEs es responsable de la disrupción de la envoltura celular que altera la estructura de las células bacterianas e incrementa su permeabilidad. Por consiguiente, se produce una interrupción de la fuerza protón-motriz del gradiente de protones y, con ello, la inhibición de la actividad de la ATP sintasa que cataliza la síntesis de ATP, además de la liberación de iones y otros constituyentes celulares desde el citoplasma hacia el exterior, desencadenando finalmente, la muerte celular (Helander *et al.*, 1998; Gill y Holley, 2006; Friedman, 2017) (Figura 4).

Los AEs con un alto grado de compuestos fenólicos como el carvacrol o el timol pueden presentar este mecanismo de acción (Burt, 2004). De acuerdo con Hulánková y Bořilová (2011), la combinación de este tipo de AEs con AOs puede originar un efecto sinérgico al favorecer el paso de estos últimos al interior celular. A su vez, la hidrofobicidad de los AEs se ve incrementada a pH bajo, lo que les permite atravesar los lípidos de la membrana celular con mayor facilidad (Hulánková y Bořilová, 2011). No obstante, es importante señalar que los mecanismos responsables de la potencial sinergia entre AEs y AOs distan mucho de ser bien conocidos (Omonijo *et al.*, 2018).

Además de la pared celular, se han descrito otras hipotéticas dianas celulares para los AEs, como pueden ser proteínas de membrana además de enzimas citoplasmáticas involucradas en el metabolismo energético o en la síntesis de componentes estructurales (Burt, 2004) (Figura 4). En este sentido, se ha descrito que la estructura química específica de cada AE puede determinar su mecanismo de acción preciso (Dorman y Deans, 2000).

En el caso específico del cinamaldehído cuya actividad antibacteriana no parece implicar una desintegración de la membrana plasmática, se ha descrito que puede provocar una alteración en la composición de los ácidos grasos de la membrana lo que origina un incremento de la incorporación celular, tanto del cinamaldehído como de otros compuestos (Di Pasqua *et al.*, 2007). Una vez en el interior celular, se han sugerido diferentes mecanismos de acción involucrados en la actividad de este compuesto. De acuerdo con los resultados alcanzados mediante análisis proteómico, el cinamaldehído puede desencadenar una disminución de la expresión de proteínas involucradas en el metabolismo de aminoácidos, lípidos y carbohidratos. La inhibición del metabolismo de los carbohidratos limita la generación de equivalentes de reducción NADH (dinucleótido de nicotinamida y adenina) o FADH<sub>2</sub> (flavín adenín dinucleótido) necesarios para la fosforilación oxidativa en la síntesis de moléculas de ATP (Amalaradjou y

Venkitanarayanan, 2011). Además de comprometer la obtención de energía celular, la capacidad para inhibir la expresión de transportadores de aminoácidos y porinas de membrana por parte del cinamaldehído hace que su actividad pueda también estar asociada a una disrupción del transporte activo (Di Pasqua *et al.*, 2007). Finalmente, se ha descrito también una reducción de la actividad o expresión de factores asociados a la virulencia o supervivencia de patógenos en el hospedador tras la exposición al cinamaldehído. Por ejemplo, se ha observado una menor expresión de genes que codifican proteínas asociadas con la biosíntesis de componentes flagelares y, con ello, un impacto en la motilidad y la virulencia bacteriana, así como de enzimas esenciales (catalasas, superóxido dismutasas, metaloproteinasas y proteasas de membrana) (Amalaradjou y Venkitanarayanan, 2011) (Figura 4).

Aunque, como acabamos de mencionar, se han postulado algunas potenciales dianas celulares de los AEs, es necesario profundizar en el estudio de los mecanismos de acción específicos de este tipo de compuestos para poder explicar detalladamente sus efectos biológicos y optimizar su aplicación como agentes antibacterianos (Calo *et al.*, 2015; Omonijo *et al.*, 2018; Valdivieso-Ugarte *et al.*, 2019)

Del mismo modo que con los AOs, en la Tabla 5 se detallan valores de CMI obtenidos por estudios previos para diferentes componentes principales de AEs y especies bacterianas.

La actividad antiviral tanto de los AEs como de sus componentes principales también ha sido evaluada por un amplio número de trabajos, centrados principalmente sobre los flavonoides y polifenoles (Wani *et al.*, 2021; Wińska *et al.*, 2019). Ambos grupos de compuestos engloban una dilatada colección de moléculas con capacidad de inhibir la replicación de algunos virus, así como de reducir su virulencia en el hospedador (Tang *et al.*, 2018; Musarra-Pizzo *et al.*, 2019; Fahmy *et al.*, 2020).

Los estudios realizados con algunos antimicrobianos naturales sugieren que la actividad viricida de estos compuestos se puede explicar por el efecto que pueden ejercer sobre distintas dianas de la estructura viral como, por ejemplo, la cápside, la envoltura viral o distintos complejos moleculares esenciales para la replicación viral. Esta actividad también puede estar asociada a los efectos sobre el hospedador a través de la inhibición del estrés oxidativo celular, de la estimulación del sistema inmunitario o incluso de la



## 1. Introducción

modificación de los receptores celulares involucrados en la adhesión del virus (Li *et al.*, 2013; Hwang *et al.*, 2016; Balta *et al.*, 2020; Wani *et al.*, 2021).

**Tabla 5.** Valores de CMI expresados en ppm obtenidos para diferentes componentes principales de AEs.

<b>Aceite esencial</b>	<b>Especie bacteriana</b>	<b>CMI (ppm)</b>	<b>Referencia</b>
<b>Timol</b>	<i>E. faecalis</i>	225,0	(Cosentino <i>et al.</i> , 1999)
		225,0	(Cosentino <i>et al.</i> , 1999)
	<i>E. coli</i>	187,5	(Du <i>et al.</i> , 2015)
		450,7	(Helander <i>et al.</i> , 1998)
	<i>C. perfringens</i>	375,0	(Du <i>et al.</i> , 2015)
		25,0-56,0	(Cosentino <i>et al.</i> , 1999)
	<i>S. enterica</i>	16,0-128,0	(Miladi <i>et al.</i> , 2017)
		375,0	(Du <i>et al.</i> , 2015)
		150,2	(Helander <i>et al.</i> , 1998)
	<i>S. aureus</i>	225,0	(Cosentino <i>et al.</i> , 1999)
<i>B. hyodysenteriae</i>	187.78	(Vande Maele <i>et al.</i> , 2016)	
<b>Carvacrol</b>	<i>E. faecalis</i>	225,0	(Cosentino <i>et al.</i> , 1999)
		225,0	(Cosentino <i>et al.</i> , 1999)
	<i>E. coli</i>	375,0	(Du <i>et al.</i> , 2015)
		450,7	(Helander <i>et al.</i> , 1998)
	<i>C. perfringens</i>	375,0	(Du <i>et al.</i> , 2015)
		225,0	(Cosentino <i>et al.</i> , 1999)
	<i>S. enterica</i>	64,0-512,0	(Miladi <i>et al.</i> , 2017)
		375,0	(Du <i>et al.</i> , 2015)
		150,2	(Helander <i>et al.</i> , 1998)
	<i>S. aureus</i>	450,0	(Cosentino <i>et al.</i> , 1999)
<i>B. hyodysenteriae</i>	187.78	(Vande Maele <i>et al.</i> , 2016)	
<b>Cinamaldehído</b>	<i>E. coli</i>	396,5	(Helander <i>et al.</i> , 1998)
	<i>S. enterica</i>	396,5	
	<i>Campylobacter coli</i>	1.000,0	(Kamel, 2001)
	<i>C. perfringens</i>	1.000,0	
	<i>B. hyodysenteriae</i>	41,0	(Vande Maele <i>et al.</i> , 2016)
<b>Eugenol</b>	<i>E. coli</i>	32.500,0-62.500,0	(Lee <i>et al.</i> , 2009)
	<i>Salmonella</i> spp.	15.625,0-62.500,0	(Lee <i>et al.</i> , 2009)
	<i>S. enterica</i>	128,0-512,0	(Miladi <i>et al.</i> , 2017)
	<i>B. hyodysenteriae</i>	11.852,0	(Vande Maele <i>et al.</i> , 2016)

Todo ello permite hipotetizar el potencial uso tanto de AEs como de AOs frente virus de origen animal de gran relevancia. En este sentido y de acuerdo con otros autores (da Silva *et al.*, 2020; Wani *et al.*, 2021), estos compuestos podrían tener utilidad para minimizar el impacto o controlar algunas infecciones víricas.

### ***1.5.3. Empleo de los aceites esenciales en ganado porcino***

En el ganado porcino, los AEs presentan un amplio abanico de propiedades beneficiosas que repercuten en una estimulación de la salud y la productividad animal (Windisch *et al.*, 2008; Vondruskova *et al.*, 2010; Omonijo *et al.*, 2018; Zhai *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2019). Además, la calidad de la carne obtenida puede verse influenciada no solo por la aplicación directa de este tipo de compuestos, si no también mediante su inclusión en la dieta (Wenk, 2003).

Al igual que los AOs, entre los efectos de los AEs en el **aparato digestivo** destaca la modulación de microbiota intestinal. Este efecto modulador es de vital importancia en lechones que se encuentran inmersos en un proceso de adquisición de una microbiota madura y estable, hecho que les hace particularmente sensibles a cambios en la dieta y a infecciones (Kim y Isaacson, 2015). A modo de ejemplo, tras la administración de una combinación de AEs (0,3 %, p/p) entre los que se incluían el carvacrol (5 %) y el cinamaldehído (3 %) se produjo un incremento de la abundancia relativa de *Lactobacillus* spp., respecto a la de *Enterobacteriaceae* en el ciego de cerdos recién destetados (Castillo *et al.*, 2006). Resultados similares se han descrito en el análisis de muestras de colon de cerdos destetados con una dieta suplementada al 0,01 % (p/p) con una combinación de timol (13,5 %) y cinamaldehído (4,5 %) (Li *et al.*, 2012a), así como en el yeyuno con una combinación de timol y carvacrol (100 mg/kg, 1:1) (Wei *et al.*, 2017). De igual forma, la administración de esta misma combinación de timol y cinamaldehído al 0,025 % (p/p) también produjo una disminución de la concentración de *E. coli* en las heces de cerdos destetados (Zeng *et al.*, 2015).

Este efecto modulador que ejercen los AEs sobre la microbiota intestinal puede ser explicado por su acción disruptiva sobre el *quorum sensing* de bacterias (Carson y Hammer, 2010; Kim y Isaacson, 2015). El *quorum sensing* es un sistema regulatorio dependiente de la densidad de las poblaciones bacterianas que ejerce un papel significativo en la expresión de factores de virulencia importantes para la interacción bacteria-hospedador (Vendeville *et al.*, 2005; Mith *et al.*, 2015; Joshi *et al.*, 2016). En

este sentido, se ha descrito, por ejemplo, que tanto el AE de orégano como el carvacrol (0,05 µl/ml y 0,08 µl/ml), su principal componente, son capaces de inhibir en una cepa de *E. coli*, productora de la toxina Shiga Stx2, la transcripción del gen *luxS* responsable de la regulación del *quorum sensing*. Además, se obtuvo una disminución de la expresión del gen *ler*, involucrado en la regulación de la expresión de genes determinantes de la adhesión y colonización intestinal de la cepa en cuestión, así como de los genes *fliC* y *stx2B*, responsables de la motilidad bacteriana y de la producción de la toxina Shiga Stx2, respectivamente. La menor expresión de estos últimos genes puede ser consecuencia de la inhibición de la transcripción del gen *luxS* promovida por ambos tipos de compuestos (Mith *et al.*, 2015).

En referencia a los efectos que los AEs tienen sobre el **sistema inmunitario**, se ha demostrado el papel que ejercen algunos de estos compuestos en la reducción de la inflamación intestinal a través de la modulación de diferentes vías de señalización celular (Omonijo *et al.*, 2018).

En el ganado porcino, la inflamación intestinal aparece asociada principalmente a la presencia de agentes patógenos o alérgenos en la dieta, así como al proceso de destete (Yang *et al.*, 2015). Las enfermedades inflamatorias agudas y crónicas del intestino pueden conducir a cambios en la fisiología del tracto digestivo y a daño en la mucosa que, finalmente, se traducen en una disminución de la absorción y digestión de nutrientes y, consecuentemente, del rendimiento transformador de los animales (Strober *et al.*, 2002). La capacidad de este tipo de compuestos para modular la respuesta inmunitaria hace que su uso en la dieta constituya una estrategia clave para reducir las considerables pérdidas económicas asociadas a la inflamación intestinal (Omonijo *et al.*, 2018).

Diferentes estudios han demostrado que algunos AEs pueden reducir la inflamación intestinal a través de la modulación de vías de señalización en las que participan los factores de transcripción Nrf2 (factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2) y NF-κB (Kroismayr *et al.*, 2008; Wondrak *et al.*, 2010; Zou *et al.*, 2016). Así, se ha observado que el AE de orégano (2,5-10 µg/ml) en la línea celular del epitelio columnar de yeyuno medio de un lechón (IPEC-J2), así como el cinamaldehído (2-10 µM) en las líneas tumorales humanas derivadas de adenocarcinoma (HT-29) o de carcinoma de colon (HCT116) pueden incrementar tanto la expresión como la translocación desde el citoplasma hacia el núcleo del factor Nrf2 (Wondrak *et al.*, 2010; Zou *et al.*, 2016). Dicho

factor se ha demostrado que ejerce un efecto inhibitorio sobre el complejo de proteínas NF- $\kappa$ B, responsable a su vez de inducir la expresión de diferentes proteínas proinflamatorias entre las que se incluyen citoquinas, moléculas de adhesión celular y enzimas (Barnes y Karin, 1997; Saha *et al.*, 2020). De igual forma, un estudio previo observó una disminución significativa de la expresión del factor NF- $\kappa$ B, tanto en el íleon como en el yeyuno, en cerdos destetados a los que se les administró una combinación de AEs (40 ppm) derivados del orégano, anís (*Pimpinella anisum*) y cáscaras de cítricos (*Cichorium intybus*) (Kroismayr *et al.*, 2008).

En esta regulación de la inflamación también interviene en la supresión de la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos o MAPK. Esta conclusión ha sido alcanzada tras demostrar una reducción de la expresión de genes que codifican mediadores inflamatorios y que son regulados por la vía MAPK en macrófagos activados por LPS y expuestos a AEs (Cha *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2018b). A modo de ejemplo, Kim *et al.* (2018b) demostraron una disminución de la expresión génica de la enzima óxido nítrico (NO) sintasa (NOS) inducible asociada al cinamaldehído (25-100  $\mu$ M) y, con ello, de la producción de NO, así como de citoquinas proinflamatorias, TNF- $\alpha$  o las interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-6.

Además, es importante destacar que tanto el incremento de los niveles de expresión del factor Nrf2 como la disminución de los de citoquinas proinflamatorias promovida por los AEs permite reducir el efecto negativo que conlleva el estrés oxidativo que sufre frecuentemente el ganado porcino (Wondrak *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2015; Zou *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2017; Omonijo *et al.*, 2018). El estrés oxidativo se caracteriza, principalmente, por un incremento excesivo en la producción de especies reactivas del oxígeno o ROS, como son los superóxidos, peróxidos de hidrógeno o radicales hidroxilos, que no puede ser contrarrestada por la acción de antioxidantes propios del organismo, lo que provoca daño en macromoléculas celulares como lípidos, proteínas o incluso el ADN (Pisoschi y Pop, 2015). De acuerdo a algunos autores, este efecto antioxidante es de vital importancia en cerdos debido al gran número de factores estresantes a los que se ven expuestos y que incluyen el destete, enfermedades, temperaturas inadecuadas, presencia de micotoxinas en el pienso, transporte o hacinamiento. Todos estos factores afectan negativamente al sistema inmunitario o a la generación de músculo, incrementan el riesgo de aborto en cerdas, favorecen diarreas, enfermedades cardiovasculares o hepáticas y

causan una disminución del apetito (Franz *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015; Omonijo *et al.*, 2018; Lauridsen, 2019).

En el caso específico del factor Nrf2, su papel en la protección contra el estrés oxidativo viene determinado por la regulación positiva que ejerce sobre una secuencia genética específica o elemento promotor denominado elemento de respuesta antioxidante (ARE). La unión del factor Nrf2 al elemento ARE promueve la expresión de múltiples enzimas detoxificantes y antioxidantes como catalasas, peroxidasas o superóxido dismutasas encargadas de reducir los niveles de ROS y, con ello, el daño oxidativo a nivel celular (Nguyen *et al.*, 2009). En este sentido, un incremento de los niveles celulares de glutatión, el principal compuesto antioxidante endógeno y, por consiguiente, una mayor protección frente al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno o arsénico ha sido también observado en los trabajos previamente citados, en los que se registró una mayor expresión del factor Nrf2 en diferentes líneas celulares tras la exposición a cinamaldehído (Wondrak *et al.*, 2010) o al AE de orégano (Zou *et al.*, 2016). De igual forma, el estrés oxidativo hepático inducido en ratones por la infección por *S. enterica* fue atenuado tras la administración intragástrica de 40 mg por kg de peso corporal de cinamaldehído, obteniendo un incremento de la actividad de la superóxido dismutasa, así como de los niveles de expresión de Nrf2 y de la enzima hemo-oxigenasa 1 (HO-1), involucrada también en el mecanismo de defensa antioxidante (Wang *et al.*, 2021).

Respecto a las citoquinas proinflamatorias como pueden ser el factor TNF- $\alpha$  o las interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-6 se ha descrito que su síntesis es promovida por el estrés oxidativo (Padgett *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2017). Además de inducir la respuesta inflamatoria, estas citoquinas parecen estar asociadas con un incremento de la permeabilidad de la barrera intestinal al comprometer la síntesis y la actividad de las proteínas que constituyen las estructuras intercelulares de uniones adherentes por diferentes mecanismos intracelulares y vías de señalización, favoreciendo con ello el paso de antígenos y microorganismos desde el lumen hacia el tejido intestinal subyacente provocando daño de la mucosa e inflamación intestinal (Al-Sadi *et al.*, 2009). El aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal promovida por las citoquinas puede ser explicada por su efecto sobre la expresión y actividad de las quinasas de la cadena ligera de la miosina o MYLK, implicadas en la regulación de la permeabilidad epitelial, así como de ocludinas y claudinas, entre otras proteínas (Ma *et al.*, 2005; Al-Sadi *et al.*, 2009). En este sentido, un trabajo previo sobre lechones demostró que, tras un destete

precoz, la expresión a nivel del yeyuno de citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-6) se ve incrementada a la vez que la de proteínas de uniones adherentes (occludina, claudina-1 y la fosfoproteína de membrana periférica zónula occludens-1 o ZO-1) disminuyen (Hu *et al.*, 2013). Por consiguiente, el efecto de los AEs sobre los niveles de citoquinas proinflamatorias no solo conlleva una mitigación de la respuesta inflamatoria si no también una mayor protección de la integridad de la barrera intestinal.

Adicionalmente, se ha descrito que determinados AEs pueden presentar directamente propiedades antioxidantes, gracias a su capacidad para capturar radicales libres o inhibir su formación a través de la cesión de electrones (Llana-Ruíz-Cabello *et al.*, 2015). Así, Wei *et al.* (2017) observaron una disminución significativa de la concentración de ROS en el yeyuno de cerdos destetados tratados con 100 mg/kg de una combinación de carvacrol y timol (1:1). De igual forma, la administración en la dieta de AE de orégano (15 mg/kg) permitió disminuir el estrés oxidativo en un grupo de cerdas durante la gestación y lactación, reduciéndose los niveles de ROS y otros indicadores de daño oxidativo en muestras de suero (Tan *et al.*, 2015).

Además de los efectos mencionados sobre el sistema inmunitario, también se ha descrito un efecto potenciador de la respuesta inmunitaria celular y humoral en los cerdos (Zhai *et al.*, 2018). Li *et al.* (2012a) observaron un incremento de los niveles de linfocitos en el plasma sanguíneo tras la administración en la dieta (0,01 %, p/p) de la combinación de timol (13,5 %) y cinamaldehído (4,5 %). Este mismo resultado fue alcanzado en otro estudio con cerdos recién destetados aumentando los niveles de IgG y IgM tras la inclusión en la dieta de polvo ultrafino obtenido de hierbas chinas (2 g/kg) (Kong *et al.*, 2007).

Finalmente, diversos autores han evaluado el potencial efecto de los AEs sobre distintos **parámetros productivos** en el ganado porcino (Vondruskova *et al.*, 2010; Omonijo *et al.*, 2018; Zhai *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2019a). Al igual que ocurre con los AOs, los trabajos existentes muestran una gran variabilidad de resultados, principalmente asociada a todos aquellos factores que pueden influir en la eficacia de los diferentes AEs, así como al enfoque y diseño experimental empleado. No obstante, cabe destacar que estos trabajos muestran resultados mayoritariamente positivos, permitiendo concluir su utilidad potencial como promotores de crecimiento naturales (Tabla 6).

## 1. Introducción

**Tabla 6.** Efectos observados sobre parámetros productivos en cerdos destetados tras la administración de diferentes AEs en la dieta.

Aceites esenciales	Vía de administración	Concentración	Duración del tratamiento	Efecto del tratamiento			Referencias
				IMDA	GMD	ICA	
AE de orégano (81 % de carvacrol y 2 % de timol)	Pienso	25 mg/kg	42 días	nd	+	-	(Günther y Bossow, 1998)
AE de orégano (81 % de carvacrol y 2 % de timol)	Pienso	25 mg/kg	14 días	nd	+	-	(Van Krimpen y Binnendijk, 2001)
AE de orégano	Pienso	a) 12,5 mg/kg b) 25 mg/kg	21 días	a) nd b) +	a) + b) +	a) - b) -	(Kyriakis <i>et al.</i> , 1998)
AE de orégano	Pienso	a) 12,5 mg/kg b) 25 mg/kg	37 días	a) nd b) -	a) + b) +	a) - b) -	(Tsinas <i>et al.</i> , 1998)
AE de orégano	Pienso	a) 500 mg/kg b) 1.000 mg/kg c) 1.500 mg/kg	21 días	a) nd b) + c) +	a) nd b) + c) +	a) - b) - c) -	(Molnar y Bilkei, 2005)
AE de orégano	Pienso	a) 37,5 mg/kg b) 75 mg/kg c) 112,5 mg/kg	35 días	a) - b) - c) +	a) - b) nd c) +	a) + b) - c) -	(Ragland <i>et al.</i> , 2007)
AE de clavo, orégano y eugenol	Pienso	105 mg/kg, 105 mg/kg y 105 mg/kg, respectivamente	24 días	nd	+	nd	(Costa <i>et al.</i> , 2007)
Timol	Pienso	10.000 mg/kg	25 días	-	nd	-	(Trevisi <i>et al.</i> , 2007)

IMDA: ingesta media diaria de alimento, GMD: ganancia media diaria, ICA: índice de conversión de alimento.

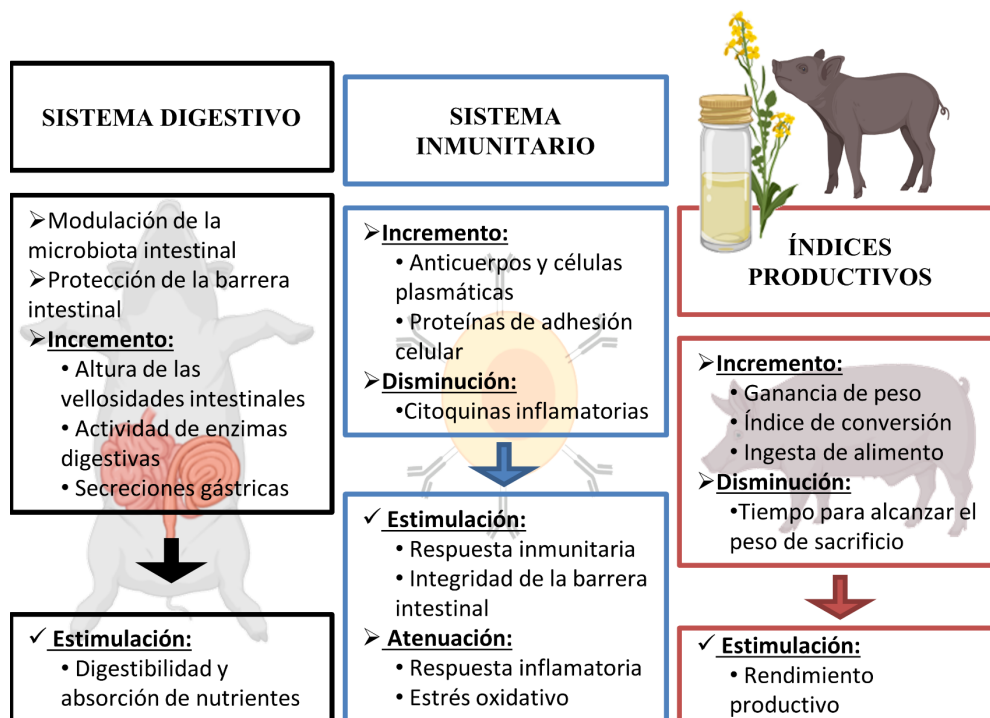
(+) Incremento y (-) disminución estadísticamente significativa respecto al grupo control. Nd: no diferencias significativas respecto al grupo control.

En el estudio llevado a cabo por Li *et al.* (2012) anteriormente citado, los cerdos alimentados con una dieta que contenía una combinación de timol y cinamaldehído presentaron valores significativamente superiores en la ganancia de peso respecto al grupo control. Igualmente, mejoras en la GMD, el índice de conversión de alimento (ICA) o la IMDA han sido descritas tras la administración de diferentes AEs (Cho, 2006; Lien *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2012b). Este efecto sobre el crecimiento de los animales puede ser explicado por una mejora de la capacidad de absorción y digestión asociada a una mejor relación entre la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas en el yeyuno (Montagne *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2009). También la disminución de los niveles de citoquinas proinflamatorias descritos en el párrafo anterior, tales como IL-6 y otras citoquinas asociadas a la pérdida de integridad de la membrana intestinal (Hu *et al.*, 2013), las alteraciones en el metabolismo energético y proteico (Spurlock, 1997) o el efecto modulador sobre la microbiota intestinal (Li *et al.*, 2018a) favorecen un mejor rendimiento transformador.

Finalmente, es importante destacar que la mejora sobre la digestibilidad de nutrientes asociada a ciertos AEs también podría ser explicada por un efecto estimulador sobre la absorción de nutrientes y la actividad de determinadas enzimas digestivas, como las lipasas pancreáticas, amilasas o tripsinas y de secreciones gástricas, bilis y moco (Platel y Srinivasan, 2004; Windisch *et al.*, 2008; Zhai *et al.*, 2018). Además, se ha descrito que los AEs contribuyen a mejorar la palatabilidad de la dieta, por el agradable olor y sabor que presentan a dosis adecuadas, hecho que se asocia a un mayor consumo de alimento (Windisch *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2018a; Mucha y Witkowska, 2021). Asimismo, la capacidad antioxidante de los AEs favorece la preservación de las cualidades de los piensos y evita la liberación de olores desagradables (Franz *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015).

En forma de resumen y al igual que con los AOs, los principales efectos asociados a la inclusión de AEs en la dieta se muestran en la siguiente figura.





**Figura 5.** Principales efectos asociados a la administración de AEs en el ganado porcino. Imágenes obtenidas de *Biorender.com*.

## 1.6. LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN EN LAS GRANJAS

Como se ha indicado anteriormente, la implementación de unas correctas pautas de bioseguridad constituye una importante estrategia para la reducción del uso de antibióticos (Alarcón *et al.*, 2021). En medicina veterinaria, el concepto de bioseguridad resume el conjunto de normas, medidas y protocolos orientados a minimizar el riesgo de introducción (bioseguridad externa) y la posterior propagación (bioseguridad interna) de patógenos dentro de un grupo de animales (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura o FAO, 2008). Con ello, se contribuye a aumentar la salud y el bienestar animal y la rentabilidad de las explotaciones, así como a fomentar la salud pública (Alarcón *et al.*, 2021).

A lo largo de los últimos años, los sistemas de producción animal de los países industrializados han sufrido una significativa transformación evolucionando hacia explotaciones de mayor tamaño. Este proceso de intensificación ha causado, a su vez, un cambio en la percepción de la prevención y el control de enfermedades debido a las graves consecuencias que pueden desencadenarse tras la entrada de un nuevo agente patógeno en estas explotaciones (Woods, 2011). Entre estas consecuencias destaca el incremento

del coste económico de producción (costes de servicios y tratamientos veterinarios o disminución de la productividad de las cerdas y del rendimiento del crecimiento, por ejemplo) (Carr, 2006), así como del riesgo de transmisión al ser humano, de forma directa o indirecta a través de los alimentos, de agentes zoonóticos relevantes, bacterias resistentes a los antimicrobianos, así como genes de resistencia (Wales *et al.*, 2021).

La diarrea epidémica porcina (DEP) (Scott *et al.*, 2016), el síndrome reproductivo y respiratorio (PRRS) (Brookes *et al.*, 2015) o la fiebre aftosa en el 2001 en el Reino Unido (Ellis-Iversen *et al.*, 2011) son claros ejemplos de enfermedades infecciosas del cerdo que han podido propagarse fácilmente por la ausencia de unas correctas medidas de bioseguridad. Por consiguiente, las medidas orientadas a reforzar los programas de bioseguridad de las granjas, la formación y concienciación del personal de las granjas y de los profesionales involucrados, así como el estudio de la epidemiología de las enfermedades (rutas de transmisión, estabilidad de los agentes en el medio ambiente, vectores o fómites involucrados) han adquirido un creciente interés (Alarcón *et al.*, 2021; Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Gobierno de España).

Mientras que el término de bioseguridad externa incluye tanto la normativa como las barreras físicas encaminadas a restringir la entrada de animales, personas y vehículos ajenos a la granja, la bioseguridad interna agrupa todas aquellas medidas relacionadas con la gestión de los grupos o lotes de animales, los estándares de higiene de las instalaciones o de los piensos, etc., los protocolos de limpieza y desinfección, así como el personal que atiende la granja (Filippitzi *et al.*, 2018; Alarcón *et al.*, 2021). La limpieza y desinfección de corrales tras el vaciado de animales y previamente al alojamiento de un nuevo lote es una medida esencial para cortar los ciclos de transmisión de enfermedades infectocontagiosas, proporcionando las condiciones higiénicas y sanitarias necesarias para un rendimiento óptimo, en términos de parámetros de crecimiento, del nuevo lote (Jayaraman y Nyachoti, 2017). En este sentido, la exposición de los cerdos a unas deficientes condiciones sanitarias (elevada concentración de materia orgánica, elevados niveles de amoníaco y dióxido de carbono en el ambiente, etc.) supone un desafío inmunitario para el animal que repercute negativamente en su rendimiento transformador debido a la mayor demanda de nutrientes como los aminoácidos por parte del sistema inmunitario (Lee *et al.*, 2005; Le Floc'h *et al.*, 2009; Kahindi *et al.*, 2014).

De acuerdo con Owen (1995), los protocolos de limpieza y desinfección de los corrales o salas deben comenzar con una retirada de restos de heces, comida y suciedad incrustada. En un segundo paso, los suelos y paredes deben lavarse durante un determinado tiempo, con detergente si es necesario, con el objetivo de ablandar la suciedad y los residuos restantes, y tras ello, aclararse con agua a presión. Finalmente, se debe proceder a la aplicación de un desinfectante aprobado para su uso general en granja y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los protocolos a seguir siempre deben comenzar desde el techo y continuar hacia abajo, una vez que se haya desconectado el suministro eléctrico, desmontado y retirado los comederos y se hayan protegido las tomas de corriente y los interruptores, por ejemplo, con láminas de plástico (Fotheringham, 1995; Owen, 1995). Las zonas complejas como pueden ser esquinas grietas o hendiduras deben ser lavadas y desinfectadas particularmente.

Además, es importante el correcto secado de las instalaciones, previo a la aplicación de los desinfectantes y también a la entrada de un nuevo lote de animales. En el primero de los casos, el secado evita la dilución excesiva del desinfectante mientras que en el segundo, una vez finalizado el protocolo, permite reducir la actividad de agua y el riesgo potencial de supervivencia de microorganismos patógenos (Wirtanen y Salo, 2003; Walia *et al.*, 2017), favoreciendo un ambiente confortable con temperatura y humedad adecuada para los animales. El tiempo requerido para el proceso de secado puede disminuirse si las superficies están pintadas con alguna resina impermeable que evita la absorción de agua por el hormigón (Owen, 1995).

En relación a la limpieza, existen diferentes protocolos en función de la temperatura del agua utilizada, el tiempo de lavado o la inclusión o no de detergente (Wildbrett, 2000). Aspectos relacionados con el tiempo, las características del agua o la fuente de energía empleada para calentar el agua pueden influir en la selección de un protocolo u otro. Respecto a la eficacia de los protocolos, un estudio llevado a cabo en granjas de pollos de engorde demostró que la inclusión de un paso de remojo (8 h) previo al lavado con agua presión puede conllevar una mayor reducción de la carga bacteriana, así como un menor consumo de agua y tiempo de trabajo en los siguientes pasos (Luyckx *et al.*, 2015). Por el contrario, ese mismo estudio no detectó diferencias entre protocolos que empleaban agua fría o caliente (60°C). En cuanto a los detergentes, diversos trabajos científicos

mencionan que las mezclas de sustancias surfactantes, que pueden incluir biocidas y enzimas como proteasas o amilasas, facilitan la eliminación de materia orgánica y bacterias durante procesos de limpieza (Vickery *et al.*, 2004; Hancox *et al.*, 2013; Gosling *et al.*, 2017).

Los protocolos de desinfección de instalaciones suelen seguir un mismo proceso que implica varias etapas; en primer lugar, aplicación del agente desinfectante seleccionado tras la limpieza y siguiendo las recomendaciones del fabricante y, en segundo lugar, secado durante un determinado tiempo hasta la entrada de un nuevo lote de animales. Ocasionalmente, la desinfección también puede llevarse a cabo en presencia de animales a través de un sistema de nebulización (aerosoles, vapores o niebla fina y seca) que permita la aplicación en el ambiente de un desinfectante con baja toxicidad (Wales *et al.*, 2021). Este tipo de desinfección permite mejorar la calidad del aire, reduciendo la concentración de amoníaco o de partículas en suspensión (Fotheringham, 1995; Costa *et al.*, 2014).

Entre los múltiples factores que pueden afectar a la eficacia de los protocolos de limpieza y desinfección, destacan aquellos relacionados con el protocolo de limpieza previamente descritos (presencia de materia orgánica y biofilms, tiempo de secado, utilización o no de detergentes...), el agua empleada (pH, sólidos en suspensión, dureza, tratada con cloro o no...), la superficie (tipo de material, porosidad, presencia de esquinas, fisuras o grietas, drenaje, repelencia al agua...), las condiciones ambientales (flujo de aire, temperatura, humedad relativa...) y la carga microbiana presente (Wales *et al.*, 2021). Evidentemente, todos aquellos aspectos relacionados con el proceso de desinfección como puede ser el tipo de agente desinfectante o la concentración de uso pueden jugar un papel de especial relevancia en la eficacia de los procesos de higienización en las granjas de cerdos (Gosling *et al.*, 2017).

Además de estos factores, es importante destacar también todos aquellos asociados con el personal responsable de ejecutar y evaluar los protocolos de limpieza y desinfección en las granjas (Alarcón *et al.*, 2021). En este sentido, se ha descrito el gran impacto que tiene sobre la prevención y control de las enfermedades tanto el conocimiento adecuado de unas correctas pautas de bioseguridad como la percepción del riesgo de las enfermedades y de sus consecuencias por parte de los ganaderos y veterinarios (Casal *et al.*, 2007; Nöremark *et al.*, 2009; Hernández-Jover *et al.*, 2012).

### ***1.6.1. Agentes desinfectantes***

Los desinfectantes se definen como agentes químicos capaces de matar o inhibir el crecimiento de microorganismos que pueden ser aplicados sobre objetos o superficies inanimadas, siendo significativamente amplio su espectro de actividad (McDonnell y Russell, 1999). La mayor parte de los desinfectantes que se usan en producción animal presentan una toxicidad alta para el hombre y el medio ambiente, existiendo una extensa lista de guías oficiales proporcionadas por autoridades y organizaciones competentes que facilitan la organización de estas operaciones de limpieza y desinfección en el manejo de rutina de las explotaciones animales (Frentzel *et al.*, 2013).

Generalmente, los desinfectantes presentan actividad frente a bacterias, hongos y virus. De forma específica, entre sus principales mecanismos de acción antimicrobiana destacan el daño en la pared y la membrana celular, la alteración de proteínas o ácidos nucleicos, la inhibición de la actividad enzimática o la oxidación de diferentes compuestos (McDonnell y Russell, 1999). No obstante, existe una amplia variedad de factores que pueden comprometer su eficacia como pueden ser la temperatura ambiental, la concentración de uso y el tiempo de contacto con las superficies, así como la presencia de materia orgánica. Respecto a este último factor, debemos destacar que tiene gran importancia ya que puede diluir y neutralizar las sustancias biocidas, siendo la principal razón por la que una exhaustiva limpieza es imprescindible antes de la aplicación de los desinfectantes (Kahrs, 1995).

La estructura, composición o fisiología de los microorganismos pueden influir en su sensibilidad a los desinfectantes. En detalle y al igual a lo que ocurre con los antibióticos, se ha descrito que la actividad de estos agentes puede ser eludida por determinados microorganismos gracias a la presencia de determinantes genéticos que pueden ser constantes y naturales en determinadas especies (resistencia intrínseca o innata) o adquiridos, bien a través de mutaciones o por la incorporación de material genético mediante elementos genéticos móviles como plásmidos o transposones (resistencia adquirida) (McDonnell y Russell, 1999).

En el caso específico de las bacterias, la resistencia intrínseca ha sido principalmente descrita en bacterias pertenecientes al género *Mycobacterium*, en bacterias esporuladas, así como en Gram negativas; por su parte, la resistencia adquirida, generalmente mediada por plásmidos y asociada a desinfectantes derivados del mercurio y otras sales metálicas,

ha sido observada en estafilococos (McDonnell y Russell, 1999). Los mecanismos de resistencia vienen determinados, principalmente, por cambios en la estructura y composición de la envoltura celular que restringen el paso de los desinfectantes hacia el interior celular, así como por la presencia de bombas de eflujo o expulsión activa y la capacidad de producir biofilms, enzimas o compuestos que interfieren con su actividad, entre otros (Bragg *et al.*, 2018; Mc Carlie *et al.*, 2020).

Respecto a las **modificaciones en la envoltura celular**, se ha descrito que una reducción de la carga negativa y un incremento de la rugosidad determinada por la presencia de proteínas y lípidos, de la hidrofobicidad y del contenido de ácidos grasos saturados de la superficie celular resulta en una disminución de la permeabilidad de la membrana celular y, con ello, de la absorción de compuestos como los desinfectantes (Braoudaki y Hilton, 2005; Mangalappalli-Illathu *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2018a). En este sentido, la mayor resistencia a desinfectantes y antisépticos observada en bacterias Gram negativas como *P. aeruginosa* respecto a otros microorganismos parece estar determinada por diferencias en la composición del LPS y el contenido de cationes de magnesio ( $Mg^{2+}$ ) de la membrana externa, así como por el menor tamaño presentado por las porinas (McDonnell y Russell, 1999).

Una absorción reducida de desinfectantes también puede estar causada por la actuación de **bombas de eflujo**, proteínas de la membrana interna presentes tanto en bacterias Gram positivas como negativas que se encargan del transporte de distintos compuestos desde el interior hasta el exterior celular (Piddock, 2006; Ortega Morente *et al.*, 2013). En la actualidad, estas proteínas se clasifican en cinco familias principales en función del modo de transporte utilizado, el sistema energético al que aparecen acopladas, así como de su filogenia: superfamilia casete de unión a ATP o ABC, familia de extrusión de compuestos tóxicos y multifármacos o MATE, superfamilia del máximo facilitador o MFS, familia de resistencia división nodular o RND y familia de resistencia de bajo espectro o SMR (Delmar *et al.*, 2014). A modo de ejemplo, varios estudios llevados a cabo con cepas de *S. enterica* y *P. fluorescens* demostraron que su menor sensibilidad a diferentes agentes desinfectantes es consecuencia de la presencia de un eficaz sistema de eflujo dependiente de la fuerza protón-motriz (Nagai *et al.*, 2003; Mangalappalli-Illathu *et al.*, 2008).

Por último, otro factor clave en la resistencia a los desinfectantes es la capacidad que pueden presentar determinadas bacterias de formar **biofilm** que las protege de diferentes condiciones ambientales como puede ser la exposición a compuestos antimicrobianos (McDonnell y Russell, 1999; Ortega Morente *et al.*, 2013). Los biofilms se definen como agrupaciones de microorganismos de la misma o de diferentes especies organizados en una matriz de proteínas y polisacáridos extracelulares y adheridos a una superficie sólida, viva o inerte (Costerton *et al.*, 1994). Dentro de este ecosistema microbiano, las bacterias están expuestas a determinadas condiciones que afectan a sus propiedades fisiológicas y, con ello, a sus mecanismos de resistencia a los antimicrobianos (Brown y Gilbert, 1993; McDonnell y Russell, 1999). Entre las principales razones que pueden explicar la menor sensibilidad a los desinfectantes de las bacterias presentes en el biofilm destacan el menor acceso a dichos agentes como resultado de la limitada difusión física y química dentro de la matriz de exopolisacáridos, el crecimiento ralentizado debido a la limitada disponibilidad de nutrientes, la modulación del microambiente hacia condiciones que limitan la actividad de los desinfectantes, la secreción de enzimas capaces de degradar o neutralizar a los desinfectantes o el intercambio metabólico y genético entre bacterias (Brown y Gilbert, 1993).

De forma similar a lo que ocurre con los antibióticos, se ha descrito que tanto el uso abusivo como la exposición a largo plazo y a concentraciones subinhibitorias puede favorecer la selección de bacterias resistentes a los desinfectantes (Maertens *et al.*, 2019). En este contexto, es importante destacar que este tipo de agentes, además de aplicarse sobre las superficies de las instalaciones (suelos, techos, paredes...), son ampliamente utilizados en equipos, herramientas, sistemas de suministro de agua, pediluvios para la desinfección de botas o rodaluvios y arcos de desinfección para vehículos en las granjas (Gosling *et al.*, 2017), así como en la industria alimentaria y en el ámbito hospitalario (Wildbrett, 2000; Agüeria *et al.*, 2021; Rutala y Weber, 2021).

Este hecho hace que la evaluación *in vitro* de los desinfectantes frente a bacterias patógenas y aislados de campo adquiera un enorme significado en la elección de los compuestos más adecuados de forma previa a su aplicación.

### 1.7.1.1. Clasificación de los agentes desinfectantes

De acuerdo con diferentes autores, un desinfectante ideal debería de reunir las siguientes características: corto periodo de exposición, amplio espectro de actividad, efecto prolongado, eficacia a bajas temperaturas, inocuo para el medio ambiente, la salud humana y/o animal (baja toxicidad por inhalación y no irritante) y para diferentes materiales (no corrosivo), fácil y ampliamente aplicable, almacenamiento estable a largo plazo, activo en presencia de residuos orgánicos y con aguas duras y económico (Wirtanen y Salo, 2003; Frentzel *et al.*, 2013). Desafortunadamente, ningún compuesto desinfectante presenta todas estas características en su totalidad.

**Tabla 7.** Principales compuestos desinfectantes usados en sanidad animal. Adaptada de Frentzel *et al.* (2013).

Compuestos desinfectantes	Espectro de actividad	Toxicidad		Corrosivo	Efecto en presencia de materia orgánica
		Hombre y animales	Medio ambiente		
<b>Aldehídos</b>	Bacterias, virus, hongos y esporas	Irritante o tóxico	Moderada	No	Alto
<b>Alcalinos</b>	Bacterias y virus	Irritante	Alta	Si	Alto
<b>Alcoholes</b>	Bacterias, hongos y virus	Baja toxicidad	Baja	Si	Alto
<b>Derivados del cloro</b>	Bacterias, virus, hongos y esporas	Irritante	Baja	Si	Bajo
<b>Derivados del yodo</b>	Bacterias, virus, hongos y esporas	Baja toxicidad	Moderada	Si	Bajo
<b>AOs</b>	Bacterias, virus y hongos	Irritante	Baja	Si	Alto
<b>Peroxígenos</b>	Bacterias, hongos, virus y esporas	Baja toxicidad	Baja	Si	Alto
<b>Fenoles y derivados</b>	Bacterias, hongos, virus y esporas	Tóxico	Alta	No	Alto
<b>Amonios cuaternarios</b>	Bacterias, hongos y virus	No irritante	Baja	No	Bajo

En la Tabla 7 se detallan las principales características de los compuestos desinfectantes más utilizados en sanidad animal. Los desinfectantes comerciales que se emplean en las granjas de cerdos generalmente presentan más de uno de estos compuestos activos, lo que permite ampliar su actividad (McDonnell y Russell, 1999). No obstante, algunos compuestos también pueden ser empleados de forma individual como pueden ser



el peróxido de hidrógeno en soluciones acuosas al 7,4 % (p/p) o el glutaraldehído a una concentración de 20 g/l a través de un sistema de nebulización (Kampf, 2018a; b).

### 1. *Aldehídos*

El formaldehído y el glutaraldehído constituyen los compuestos más ampliamente utilizados dentro del grupo de los aldehídos (Mcdonnell y Russell, 1999).

Por un lado, el **formaldehído** o metanal ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) corresponde a un monoaldehído altamente reactivo capaz de interactuar con macromoléculas como proteínas a través de amidas primarias o grupos aminos, así como con los ácidos nucleicos (National Research Council, 2011). Aunque también puede emplearse en estado gaseoso, generalmente es usado como desinfectante y esterilizante en solución acuosa a una concentración aproximada del 40 %, empleando alcohol metílico como estabilizante. No obstante y a pesar de su amplio espectro de actividad, su utilización está limitada principalmente por su olor penetrante, su riesgo tóxico por inhalación, su acción irritante para la piel y mucosas, así como por su posible actividad carcinógena (Cheney y Collins, 1995; Swenberg *et al.*, 2012).

Por otro lado, el **glutaraldehído** ( $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ ) es un dialdehído saturado clasificado dentro del grupo de desinfectantes y esterilizantes químicos de alto nivel dada sus principales características: amplio espectro de actividad, rapidez en su acción, estabilidad en presencia de materia orgánica, bajo poder de corrosión y toxicidad, vida media prolongada, fácil degradación en el medio ambiente y ausencia de olor (Russell, 1994). Se ha descrito que es tres veces más activo que el formaldehído (Jeffrey, 1995). Su mecanismo de acción está asociado a su capacidad para interactuar con grupos sulfhidrilos (-SH), hidroxilos (-OH), carboxilos (-COOH) y grupos aminos (-NH<sub>2</sub>, -NRH o -NR<sub>2</sub>), provocando alteraciones en las membranas celulares de bacterias y hongos, en la cápside de virus y, de forma general, en las proteínas y el material genético microbiano (Mcdonnell y Russell, 1999). Al igual que el formaldehído, se considera un compuesto tóxico por ingestión e inhalación provocando diferentes lesiones en el sistema respiratorio y la piel tras la exposición a concentraciones elevadas (Takigawa y Endo, 2006).

2. Hidróxido de sodio y calcio

Dentro de este grupo de desinfectantes alcalinos se incluyen compuestos como el hidróxido de sodio (NaOH), potasio (KOH) o calcio (CaOH), efectivos principalmente frente a bacterias no esporuladas y virus con envoltura (Jeffrey, 1995). Su actividad viene determinada por el grupo hidroxilo, depende del pH y requiere de elevado tiempo de actuación que puede reducirse si se incrementa la temperatura o su concentración. Por último, son corrosivos para diferentes materiales, siendo necesario tomar precauciones durante su aplicación (Baird, 2004).

3. Alcoholes

Los más frecuentemente utilizados son el etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), el isopropanol y el 1-propanol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O) a una concentración óptima comprendida entre 60 y 90 %. A pesar de su amplio espectro de actividad antimicrobiana, es importante destacar la ausencia de actividad frente a esporas, así como su reducida actividad fungicida (McDonnell y Russell, 1999). Se ha descrito que sus mecanismos de acción podrían estar asociados a la desnaturalización de proteínas y al daño en la membrana celular, con la consiguiente disrupción del metabolismo y lisis celular (Larson y Morton, 1991). A pesar de su elevado coste, su rápida evaporación sin dejar residuos es una de sus principales ventajas permitiendo que puedan ser utilizados como desinfectantes a través de sistemas de nebulización (Jeffrey, 1995).

4. Halógenos

Los desinfectantes halogenados más empleados son compuestos basados en cloro y yodo (McDonnell y Russell, 1999).

Dentro del grupo de **compuestos derivados del cloro** destacan el hipoclorito de sodio (NaClO), ampliamente utilizado en el tratamiento de aguas, el dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>) o compuestos estables en fase sólida como el dicloroisocianurato de sodio (C<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub>) o la cloramina T (C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>ClNO<sub>2</sub>SNa), entre otros. Dichos compuestos en presencia de agua liberan ácido hipocloroso, responsable de su actividad frente un amplio abanico de microorganismos, así como de su efecto esporicida (Dychdala, 1991). Respecto a su mecanismo de acción, cabe destacar que aún no se ha descrito completamente, aunque se especula un efecto sobre la síntesis de proteínas o de ADN bacteriano (McKenna y Davies, 1988) o sobre procesos metabólicos como la fosforilación oxidativa (Barrette *et*

*al.*, 1989). De igual forma, se han asociado a un posible daño en la cápside (O'Brien y Newman, 1979) o a una degradación de los ácidos nucleicos virales (Taylor y Butler, 1982). Como principales desventajas destacan su efecto corrosivo y la pérdida de actividad ante la presencia de materia orgánica (Jeffrey, 1995; Holah, 2014).

En el caso de los **compuestos derivados del yodo**, destacan las sales de yodo estables como el yoduro de potasio (KI) y los yodóforos o soluciones que incluyen yodo y un agente tensioactivo de alto peso molecular como la povidona yodada (1-etenil-2-pirrolidina homopolímero compuesto con yodo) (McDonnell y Russell, 1999). Su mecanismo de acción antimicrobiana aparece asociado al yodo que promueve la oxidación de proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos grasos y ácidos nucleicos microbianos (Gottardi, 1991; Kawana *et al.*, 1997). Se ha comprobado que el yodo puede inhibir el transporte de electrones al reaccionar con enzimas de la cadena respiratoria de microorganismos aerobios (Kampf, 2018c). Además, se ha descrito que la povidona yodada puede inhibir diferentes etapas del ciclo replicativo viral como la unión a receptores celulares y la liberación de nuevos virus de células infectadas (Sriwilajaroen *et al.*, 2009).

Al igual que ocurre con los compuestos de cloro, su actividad es sensible a la presencia de materia orgánica que reduce, en gran medida, el contenido de yodo activo (Frentzel *et al.*, 2013).

### 5. Ácidos orgánicos (AOs)

El hecho de que los AOs sean compuestos GRAS, como se ha descrito previamente, hacen que sean utilizados principalmente en procesos de desinfección de alimentos (Akbas y Ölmez, 2007; Sagong *et al.*, 2011; Huang y Chen, 2011; Ye-Won *et al.*, 2013). Su capacidad para actuar de forma rápida frente a un amplio espectro de microorganismos, sin reaccionar con compuestos orgánicos ni originar residuos tóxicos, a diferencia de otros agentes desinfectantes como los clorados, hacen que este tipo de compuestos hayan ganado protagonismo en los últimos años (Ölmez y Kretzschmar, 2009; Lianou *et al.*, 2012). No obstante, estos ácidos son ligeramente corrosivos y pueden provocar reacciones alérgicas (Marriott y Gravani, 2006). Además, el rango de pH constituye un factor crítico para su eficacia, al igual que ocurría con los desinfectantes alcalinos (Frentzel *et al.*, 2013). Ácidos como el fórmico, acético, benzoico (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>), cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>), láctico (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>) o málico (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>) son algunos ejemplos de AOs incluidos

en diferentes soluciones desinfectantes y cuya actividad puede incrementarse en presencia de detergentes aniónicos del tipo sulfonato o éter sulfato (Jeffrey, 1995).

#### 6. *Peroxígenos*

En este grupo destacan compuestos como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el ácido peracético ( $C_2H_4O_3$ ), así como el ozono ( $O_3$ ), cuyo mecanismo de acción viene determinado por la capacidad de liberar iones hidroxilos y radicales libres que oxidan proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Se ha descrito que los grupos tioles, compuestos por un átomo de azufre y un átomo de hidrógeno, así como enlaces disulfuros y dobles constituyen las principales dianas de estos compuestos (Block, 1991).

El **peróxido de hidrógeno** es un líquido incoloro con actividad contra un amplio espectro de bacterias, hongos, virus y esporas pero que se puede ver comprometida a bajas concentraciones y en presencia de catalasas y otras peroxidasas principalmente de bacterias Gram negativas (McDonnell y Russell, 1999). Este compuesto es considerado como un desinfectante de alto nivel respetuoso con el medio ambiente ya que se descompone rápidamente en productos inocuos como son el agua y el oxígeno. En este sentido, generalmente suele comercializarse en soluciones junto con agentes quelantes como los fosfonatos que permiten ajustar el pH a un valor aproximado de 5 y, con ello, incrementar su estabilidad. Su principal desventaja radica en su elevada toxicidad a concentraciones altas (Jeffrey, 1995).

El **ácido peracético** también es un líquido incoloro pero con un característico olor penetrante y con una eficacia mayor que la del peróxido de hidrógeno (Block, 1991). Además, este compuesto orgánico no se ve afectado por la actividad de las peroxidasas aunque es termodinámicamente inestable, descomponiéndose con relativa facilidad en productos con baja toxicidad para el medio ambiente como el ácido acético y el oxígeno (Luukkonen y Pehkonen, 2017). Por ello, las soluciones de trabajo preparadas a una determinada concentración a partir del ácido puro no deben reutilizarse. Aunque es corrosivo para ciertos materiales, el bajo tiempo de exposición requerido, su actividad a bajas temperaturas y en presencia de materia orgánica, así como el hecho de que no produce reacciones alérgicas ni irritaciones a concentraciones de trabajo lo convierten en uno de los compuestos desinfectantes de alto nivel más empleados (Frentzel *et al.*, 2013).

Por último, el **ozono** es un gas que puede ser generado a través de diferentes equipos como generadores o purificadores de aire electrostáticos y cuya actividad frente a bacterias, hongos, esporas y virus ha sido previamente demostrada (Khadre y Yousef, 2001; Li y Wang, 2003; Najafi y Khodaparast, 2009; Cristiano, 2020). Diferentes autores han obtenido en procesos de desinfección con dicho gas una eficacia superior a la alcanzada con el ácido peracético (Salgot *et al.*, 2002; Gehr *et al.*, 2003; Mezzanotte *et al.*, 2007). Sin embargo, es importante destacar que es muy corrosivo, irritante y tóxico a concentraciones elevadas, pudiendo provocar afecciones en el sistema respiratorio (Luukkonen y Pehkonen, 2017)

### 7. Fenoles y derivados

El fenol (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O) es uno de los primeros agentes antisépticos descritos aunque su uso se ha limitado principalmente a procesos de desinfección debido a sus propiedades irritantes, corrosivas y a su elevada toxicidad (Jeffrey, 1995). Con el objetivo de disminuir su toxicidad e incrementar su eficacia antimicrobiana, los hidrógenos del anillo bencénico han sido sustituidos, por ejemplo, por radicales halogenados o alquílicos obteniéndose diferentes derivados entre los que destaca el grupo de los bisfenoles. Concretamente, los bisfenoles se caracterizan por presentar dos anillos fenólicos en su estructura, baja toxicidad y corrosividad, así como una eficacia de amplio espectro que incluye esporas bacterianas pero no virus sin envoltura, clasificándose por ello dentro del grupo de desinfectantes de nivel intermedio o bajo (McDonnell y Russell, 1999).

Los bisfenoles clorados **triclosán** (2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifeniléter, C<sub>12</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) y **hexaclorofeno** [2,2'-Metilenbis(3,4,6-triclorofenol), C<sub>13</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>6</sub>O<sub>2</sub>] son compuestos pertenecientes a este grupo y ampliamente utilizados. Ambos presentan la membrana plasmática como principal diana molecular (McDonnell y Russell, 1999), aunque también se ha observado que actúan sobre determinadas enzimas como pueden ser la enoil-proteína transportadora de acilo o ACP reductasa involucrada en la síntesis de ácidos grasos en el caso del triclosán (Russell, 2004) o sobre la lactado deshidrogenasa implicada en la cadena de transporte de electrones en el caso del hexaclorofeno (Corner *et al.*, 1971; Silvernale *et al.*, 1971; Frederick *et al.*, 1974). Se han descrito mecanismos específicos de resistencia bacteriana hacia estos compuestos, generalmente asociados al sistema de bombas de eflujo, a cambios en la estructura de las membranas plasmáticas o al uso del triclosán como fuente de carbono (Kampf, 2018d).

## 8. Amonios cuaternarios

Los compuestos de amonio cuaternario, pertenecientes al grupo de tensioactivos catiónicos (agentes surfactantes cargados positivamente), se caracterizan por presentar un catión amonio cuaternario ( $\text{NR}_4^+$ ) constituido por un átomo de nitrógeno (N) unido a cuatro residuos orgánicos (R), como pueden ser cadenas alquílicas o hidrocarburos aromáticos, y un anión inorgánico, generalmente cloro (Bureš, 2019). Sus propiedades espumantes, hidratantes, emulsionantes, tensoactivas, antielectrostáticas, conservantes, así como bactericidas, antifúngicas y viricidas hacen que este grupo de compuestos sea ampliamente utilizado, generalmente, en combinación con otros agentes desinfectantes (Obłąk *et al.*, 2021).

Entre los compuestos que han recibido mayor atención destacan los pertenecientes al grupo de los **cloruros de benzalconio** (n-alkil metil bencil cloruro de amonio) aunque su uso se está limitando gradualmente por sus propiedades corrosivas y su alta toxicidad, especialmente para los organismos acuáticos y a concentraciones elevadas. A modo de ejemplo, su uso como antisépticos para el lavado de manos y cuerpo ha sido recientemente prohibido en la UE (Pereira y Tagkopoulos, 2019).

Al igual que ocurre con los desinfectantes derivados de cloro y yodo, la actividad antimicrobiana de los compuestos de amonio cuaternario se ve significativamente afectada por la presencia de materia orgánica (Frentzel *et al.*, 2013). Dicha actividad antimicrobiana viene determinada principalmente por la carga positiva permanente e independiente del pH del catión amonio cuaternario que les permite interactuar con las membranas biológicas cargadas negativamente (Chauret, 2014). A través de dicha interacción así como de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas específicas con proteínas y lípidos de las membranas, estos compuestos producen alteraciones en la bicapa de fosfolípidos (Dubničková *et al.*, 2006). Por consiguiente, se originan cambios en la estructura, morfología y composición de las membranas de bacterias, hongos y virus, además de una inhibición de la actividad de diferentes enzimas (Prince *et al.*, 1993; Dubničková *et al.*, 2006; Obłąk *et al.*, 2016; Sokolova *et al.*, 2021).

En el caso específico de las bacterias, se ha descrito que determinados grupos muestran cierta tolerancia a estos compuestos principalmente por presentar un eficiente sistema de eflujo o modificaciones en la composición de la membrana plasmática y la carga superficial (Obłąk *et al.*, 2021). Así, diferentes estudios han demostrado una alta

prevalencia de genes asociados al sistema de bombas de eflujo en cepas con baja sensibilidad a los compuestos de amonio cuaternario (Furi *et al.*, 2013; Babaei *et al.*, 2015). De igual forma, se han descrito cepas resistentes asociadas a cambios en el perfil de ácidos grasos de la membrana plasmática (To *et al.*, 2002). Por último, un estudio realizado sobre un amplio número de granjas de cerdos comprobó que todos los aislados de SARM obtenidos en corrales desinfectados con protocolos en los que se incluyeron amonios cuaternarios mostraron al menos un gen de resistencia hacia estos compuestos (Slifierz *et al.*, 2015).

Adicionalmente, cabe destacar que con el objetivo de ampliar su rango de actividad biocida, principalmente en presencia de materia orgánica y/o aguas duras, así como disminuir su toxicidad, a lo largo de los años se han desarrollado nuevas generaciones de compuestos de amonio cuaternario a través de la incorporación en su estructura de cationes orgánicos o aniones inorgánicos (Oblak *et al.*, 2021). En este sentido, la incorporación de enlaces éster en su estructura les permite ser biodegradados eficazmente (García *et al.*, 2019).

## 2. OBJETIVOS

---

Considerando las actuales restricciones al uso de antibióticos para el tratamiento y control de enfermedades infecciosas en el cerdo, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral se centra en evaluar el potencial de algunas estrategias o alternativas para el control de infecciones que permitan avanzar en el abordaje global de la problemática asociada a la emergencia de bacterias resistentes.

Este objetivo general se divide en los siguientes objetivos específicos:

1.- Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de una selección de ácidos orgánicos (AOs), aceites esenciales (AEs) y componentes principales de AEs, así como de combinaciones de los mismos, frente a una colección de aislados de campo de patógenos entéricos con importancia en medicina veterinaria y en algún caso con un potencial zoonótico.

2.- Determinación de los mecanismos de acción y de las principales dianas en la célula bacteriana de los componentes de AEs con mayor actividad antibacteriana.

3.- Evaluación *in vitro* del efecto citotóxico de una selección de AOs y componentes de AEs con mayor actividad antibacteriana.

4.- Evaluación *in vitro* del efecto viricida de una selección de AOs y componentes de AEs con mayor actividad antibacteriana frente al virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP).

5.- Evaluación *in vitro* y en condiciones de campo de la eficacia de una selección de desinfectantes comerciales frente a *Brachyspira hyodysenteriae*, agente etiológico de la disentería porcina.





### 3. COPIA COMPLETA DE LAS PUBLICACIONES PRESENTADAS

---

A continuación, se incluye una copia completa de los trabajos publicados o en fase de revisión que constituyen la presente Tesis Doctoral.

**Primera publicación.** Antimicrobial activity of a selection of organic acids, their salts and essential oils against swine enteropathogenic bacteria.

<https://porcinehealthmanagement.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40813-019-0139-4>

**Segunda publicación.** In-depth *in vitro* evaluation of the activity and mechanism of action of organic acids and essential oils against swine enteropathogenic bacteria.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2020.572947/full>

**Tercera publicación.** *In vitro* assessment of antiviral effect of natural compounds on porcine epidemic diarrhea coronavirus.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2021.652000/full>

**Cuarta publicación (En revisión).** Combined *in-vitro* and on-farm evaluation of commercial disinfectants against *Brachyspira hyodysenteriae*.



## **3.1. PRIMERA PUBLICACIÓN**

---

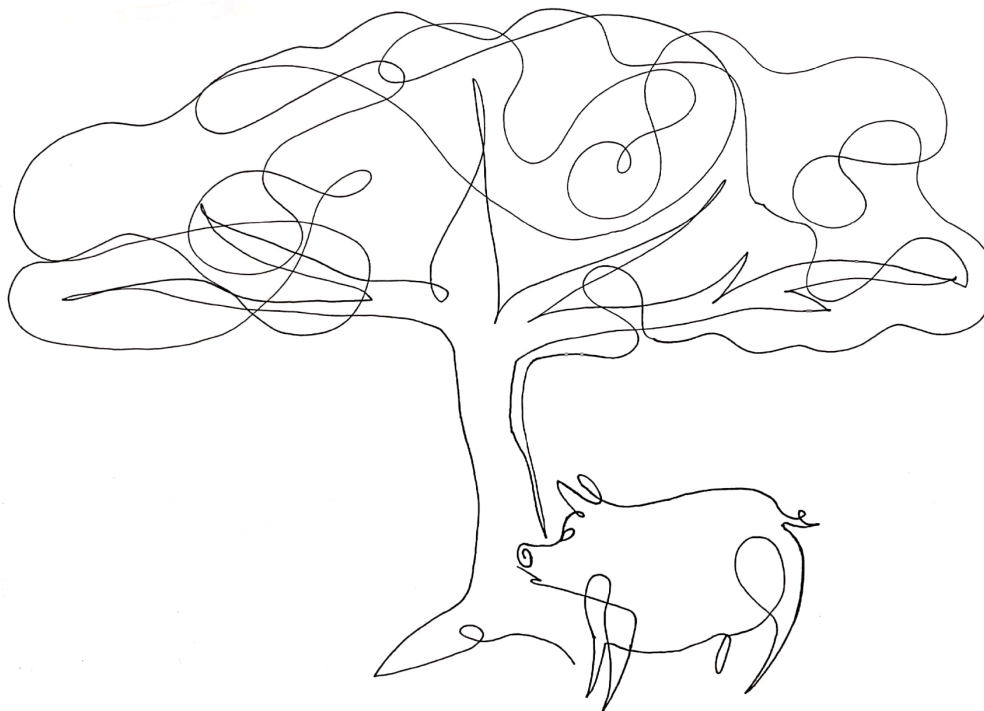
Antimicrobial activity of a selection of organic acids, their salts and essential oils against swine enteropathogenic bacteria.

---

---

**Manuel Gómez-García**, Cinta Sol, Pedro J. G. de Nova, Mónica Puyalto, Luis Mesas, Héctor Puente, Óscar Mencía-Ares, Rubén Miranda, Héctor Argüello, Pedro Rubio y Ana Carvajal.

Porcine Health Management. 5, 32. DOI: 10.1186/s40813-019-0139-4.





## **3.2. SEGUNDA PUBLICACIÓN**

---

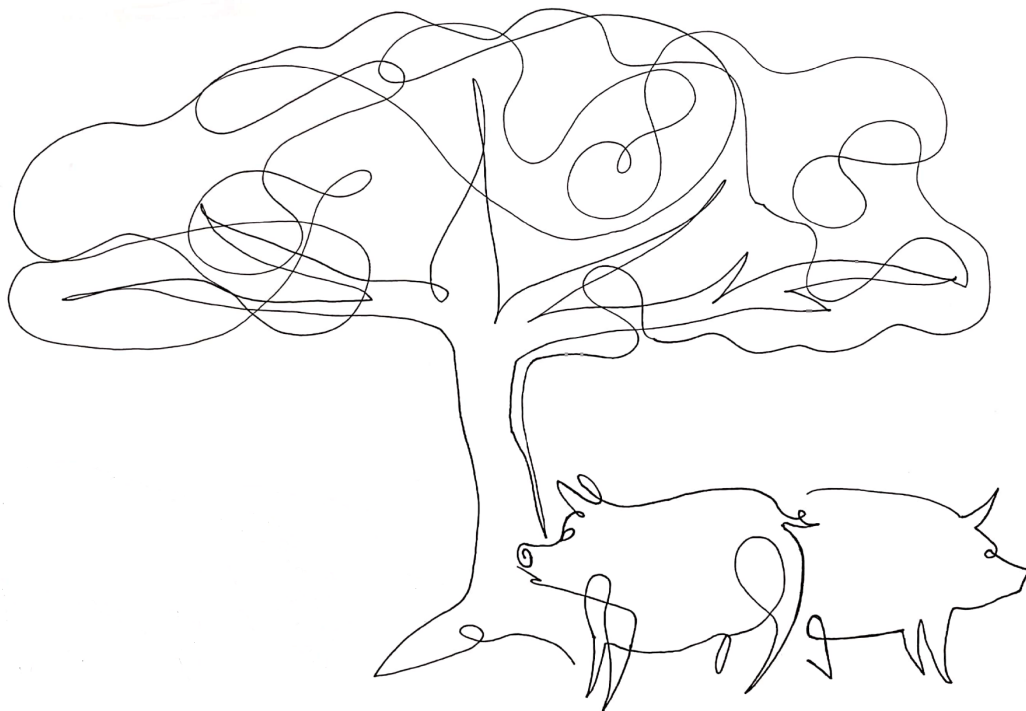
In-depth *in vitro* evaluation of the activity and mechanism of action of organic acids and essential oils against swine enteropathogenic bacteria.

---

---

**Manuel Gómez-García**, Héctor Argüello, Héctor Puente, Óscar Mencía-Ares, Sandra González, Rubén Miranda, Pedro Rubio y Ana Carvajal.

Frontiers in Veterinary Science. 7:572947. DOI: 10.3389/fvets.2020.572947





## **3.3. TERCERA PUBLICACIÓN**

---

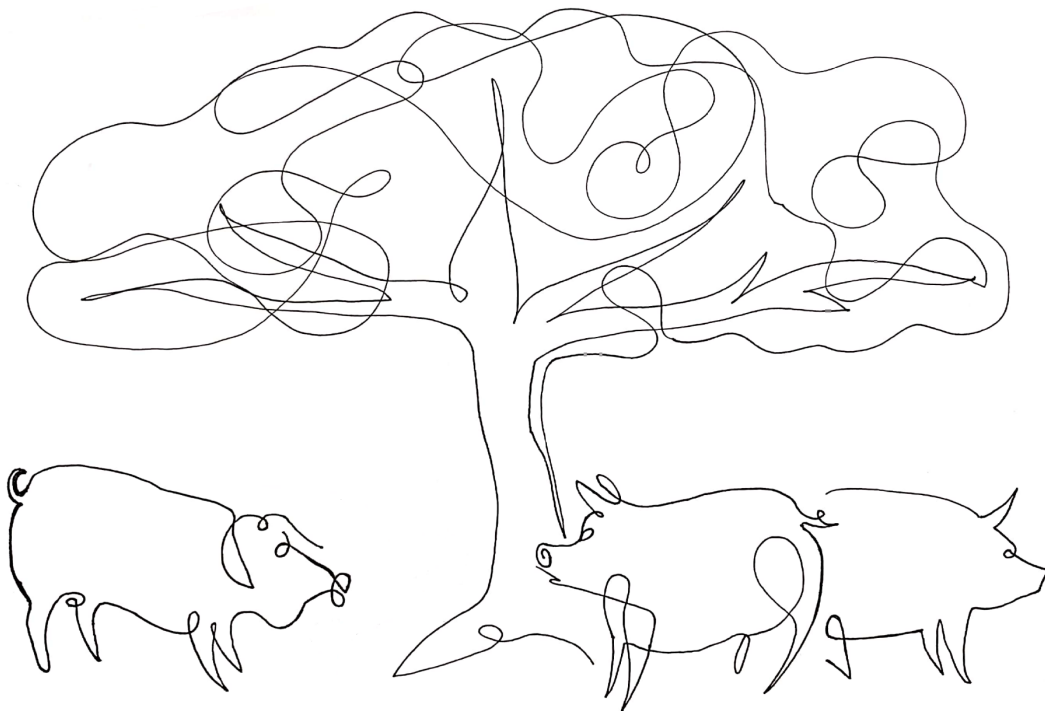
*In vitro* assessment of antiviral effect of natural compounds on porcine epidemic diarrhea coronavirus.

---

---

**Manuel Gómez-García**, Héctor Puente, Héctor Argüello, Óscar Mencía-Ares, Pedro Rubio y Ana Carvajal.

Frontiers in Veterinary Science. 8:652000. DOI: 10.3389/fvets.2021.652000.







## **3.4. CUARTA PUBLICACIÓN**

---

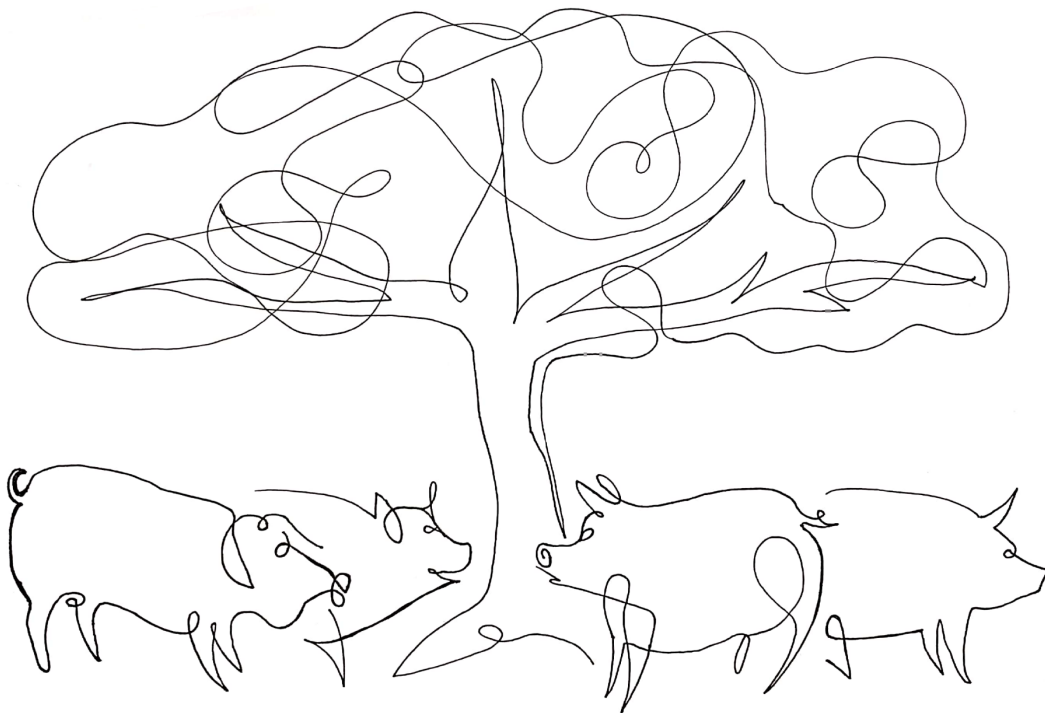
Combined *in-vitro* and on-farm evaluation of commercial disinfectants against *Brachyspira hyodysenteriae*.

---

---

**Manuel Gómez-García**, Héctor Argüello, Lucía Pérez-Pérez, Clara Vega, Héctor Puente, Óscar Mencía-Ares, Pedro Rubio y Ana Carvajal.

Porcine Health Management. – EN REVISIÓN –





1 **PORCINE HEALTH MANAGEMENT**

2

3 **Research article**

4

5 **Combined *in-vitro* and on-farm evaluation of commercial disinfectants used against**

6 ***Brachyspira hyodysenteriae***

7

8 Manuel Gómez-García\*, Héctor Argüello, Lucía Pérez-Pérez, Clara Vega, Héctor Puente, Óscar

9 Mencía-Ares, Pedro Rubio, Ana Carvajal

10

11 Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Universidad de León, León, Spain

12

13

14

15 \* Correspondence: [mgomg@unileon.es](mailto:mgomg@unileon.es)

16

## 17 **Abstract**

18 **Background:** Swine dysentery (SD) is a severe infectious disease with a relevant impact on pig  
19 production usually caused by *Brachyspira hyodysenteriae*, although *B. hampsonii* causes an  
20 identical clinical picture. SD control relies on antimicrobials, good management practices and  
21 strict biosecurity with cleaning and disinfection as crucial tools to avoid the pathogen transmission.  
22 This study evaluates the *in-vitro* efficacy of an array of commercial disinfectants against a  
23 collection of *B. hyodysenteriae* isolates using broth tests. The efficacy of cleaning and disinfection  
24 protocols was also evaluated on two farms with endemic SD using surface swabs collected in  
25 emptied pens before and after cleaning and disinfection procedures, using both real-time PCR and  
26 bacterial microbiological culture.

27 **Results:** Most of the commercial disinfectants evaluated were effective against all  
28 *B. hyodysenteriae* isolates tested, with a reduction of more than 5.00 log<sub>10</sub> CFU/mL (bactericidal  
29 efficacy of 99.999%). However, some isolates exhibited reduced susceptibility to Virkon-S and  
30 Limoseptic disinfectants. The evaluation of cleaning and disinfection protocols on farms with SD  
31 outbreaks showed that approximately half the pens tested (n=25) were positive by real-time PCR  
32 after pigs removal (mean *B. hyodysenteriae* counts 5.72 ± 1.04 log<sub>10</sub> CFU/mL) while almost 20%  
33 of the pens remained positive after cleaning (n=7) and disinfection (n=5) procedures although with  
34 significantly lower, mean estimates (4.31 ± 0.43 log<sub>10</sub> CFU/mL and 4.01 ± 0.55 log<sub>10</sub> CFU/mL,  
35 respectively).

36 **Conclusions:** These results show the efficacy of disinfectants against *B. hyodysenteriae* but also  
37 stress the need adequately implement the cleaning and disinfection protocols on pig farms but they  
38 may not completely eliminate contamination.

39 **Keywords**

40 Swine dysentery, Disinfection, Cleaning, Internal biosecurity

41 **Background**

42 Swine dysentery (SD) is a severe mucohaemorrhagic enteric disease, which causes important losses  
43 in the pig industry due to mortality and sub-optimal performance [1,2]. The disease is more  
44 frequently observed in the growing and finishing stages [3]. The classical etiological agent is  
45 *Brachyspira hyodysenteriae*, a Gram-negative, motile, helically coiled, beta-haemolytic and  
46 anaerobic bacteria [4]. *Brachyspira hyodysenteriae* colonizes the lumen and crypts of the porcine  
47 caecum and colon causing mucohemorrhagic diarrhoea [1]. *Brachyspira hamptonii* infection is  
48 mainly confined to North America and can cause the same clinical signs [5,6]. The transmission  
49 by the faecal-oral route occurs by direct contact through the introduction of infected animals into  
50 uninfected herds [7] and by indirect contact with contaminated surfaces, where the pathogen is  
51 capable of surviving under favourable conditions such as organic matter, humidity and darkness  
52 [3].

53 Limitations in disease treatment, linked to the emergence of strains with reduced susceptibility to  
54 antibiotics or the lack of commercial vaccines, highlight the relevance of other strategies in SD  
55 prevention and control [8–10]. High standards in biosecurity are crucial in prevention and  
56 amelioration of diseases in pig production [11,12] and management strategies such as all-in /all-  
57 out (AI/AO) attempt to be effective firewalls to prevent the transmission of diseases such as SD.  
58 Undoubtedly the effectiveness of AI/AO depends on the efficacy of cleaning and disinfection  
59 protocols put in place [2,3,11].

60 Disinfectant choice depends on factors such as microorganism spectrum, surfaces to be treated,  
61 applicable temperature range, toxicity or economic constraints [13]. Despite the theoretical  
62 efficacy of disinfectants, their misuse favours the emergence and spread of disinfectant tolerance  
63 [14] by the selection of resistant clones/strains and the horizontal spread of disinfectant resistance  
64 genes [15]. Field studies also reveal the need to implement efficient protocols, which remove the  
65 pathogens from the environment successfully [16]. Despite the environmental component in SD  
66 epidemiology, there are no studies which particularly combine the assessment of the *in-vitro*  
67 susceptibility of *B. hyodysenteriae* to disinfectants and the efficacy of these agents under the usual  
68 cleaning and disinfection protocols implemented in field conditions [2,17,18]. With this aim in  
69 mind, this study evaluates the *in-vitro* efficacy of an array of different commercial disinfectants  
70 against a collection of ten field isolates of *B. hyodysenteriae* and the efficacy of hygiene protocols,  
71 under field conditions, on farms with SD.

72

## 73 **Results**

### 74 ***In-vitro* efficacy of disinfectants against *B. hyodysenteriae***

75 The results of disinfectants activity against *B. hyodysenteriae* are shown in Table 1. Mean  
76 *B. hyodysenteriae* counts in control tests (without disinfectant) was  $7.6 \pm 0.2 \log_{10}$  colony forming  
77 units (CFU)/mL and we observed that disinfectants activity was not inhibited by the interfering  
78 substance. All disinfectants, except for Virkon-S and Limoseptic, were capable of inhibiting the  
79 *B. hyodysenteriae* viability completely (reduction of more than  $5.00 \log_{10}$  CFU/mL or 99.999%  
80 efficacy) with no differences among the isolates tested. However, reduced efficacy was observed  
81 with VIRKON-S against the isolate IT-40 (average reduction of  $2.9 \pm 0.3 \log_{10}$  CFU/mL), IT-67

82 (2.2 ± 0.8 log<sub>10</sub> CFU/mL) and IT-85 (3.1 ± 0.9 log<sub>10</sub> CFU/mL) and with Limoseptic against IT-45  
 83 (3.9 ± 0.6 log<sub>10</sub> CFU/mL).

84

85 **Table 1.** Surviving population of each *B. hyodysenteriae* isolate after exposure to the disinfectant  
 86 tested.

Disinfectant	Mean counts (log <sub>10</sub> CFU/mL) and standard deviation (±)										
	Isolate										
	IT-1	IT-18	IT-39	IT-40	IT-45	IT-48	IT-67	IT-68	IT-83	IT-85	QC strain <sup>b</sup> B204
ET-70% <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Virkon-S	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	4.7 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	5.0 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	4.8 ± 0.6	0.0 ± 0.0
CR-36	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Yodermin	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Poliformo	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Limoseptic	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.5 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
MS Megades Oxy	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
MS Megades Novo	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Control (without disinfectant)	7.8 ± 0.3	7.7 ± 0.6	7.4 ± 0.3	7.5 ± 0.0	7.5 ± 0.1	7.5 ± 0.5	7.5 ± 0.6	7.4 ± 1.0	7.6 ± 1.0	8.0 ± 0.4	8.1 ± 0.1

87 <sup>a</sup> Positive control

88 <sup>b</sup> Quality control strain

89

## 90 On-farm efficacy of cleaning and disinfection protocols

91 As shown in Table 2, detection of *B. hyodysenteriae* by real-time PCR revealed that 44.6% of the  
 92 pens tested (n=56) were positive to *B. hyodysenteriae* after being emptied of pigs and before they  
 93 were cleaned (BC). In contrast, only 12.5% and 8.9% of the pens tested were positive after cleaning  
 94 (AC) and after disinfection procedures (AD), respectively. Similar percentages were obtained in



95 the analysis of results for each farm, despite the number of pens tested on farm B (n=48) was  
 96 considerably higher than on farm A (n=8).

97

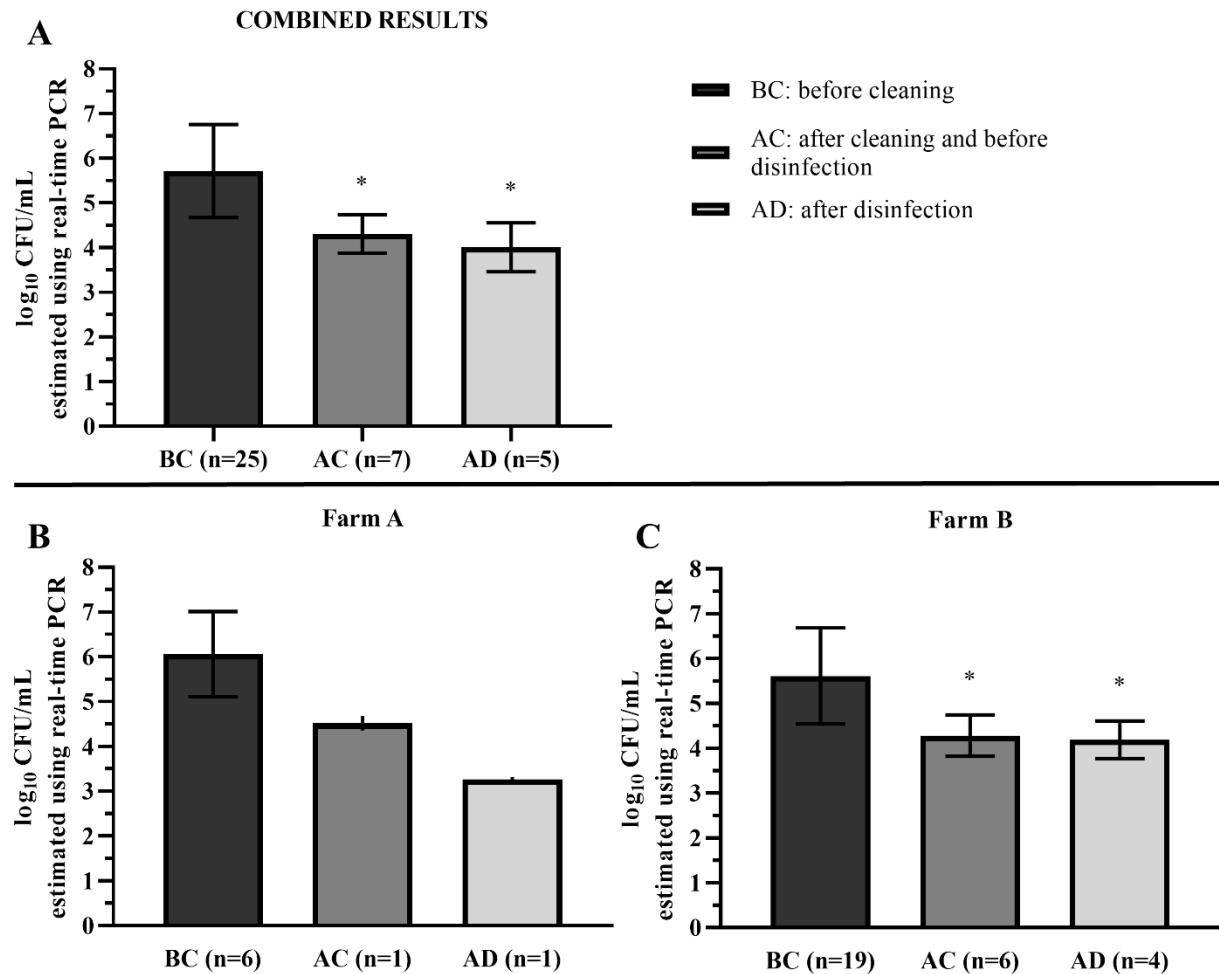
98 **Table 2.** Results of *B. hyodysenteriae* detection by real-time PCR in the pens sampled.

	Before cleaning (BC)			After cleaning and before disinfection (AC)			After disinfection (AD)		
	Sampled pens			Sampled pens			Sampled pens		
	Total	Positive	%	Total	Positive	%	Total	Positive	%
<b>COMBINED RESULTS</b>	<b>56</b>	<b>25</b>	<b>44.6</b>	<b>25</b>	<b>7</b>	<b>28.0</b>	<b>25</b>	<b>5</b>	<b>20.0</b>
Farm A #	8	6	75.0	6	1	16.7	6	1	16.7
Farm B #	48	19	39.6	19	6	31.6	19	4	21.1

99 # A two-step protocol including power washing and disinfection with Hypred Force 7 was carried  
 100 out on Farm A while Farm B cleaning and disinfection protocol included pre-soaking with cold  
 101 water and detergent, power washing with cold water and final disinfection with MS Megades Oxy.  
 102

103 When only *B. hyodysenteriae*-positive pens BC (n=25) were included in the analysis, the  
 104 percentage of pens which remained positive AC and AD increased to 28.0% and 20.0%,  
 105 respectively. The proportion of positive pens on farm A both AC and AD was lower than on farm  
 106 B (Table 2), although results did not reach statistical significance ( $p>0.05$ ).

107 By using real-time PCR, we also aimed at establishing the *B. hyodysenteriae* counts  
 108 ( $\log_{10}$  CFU/mL) in positive samples (Figure 1). Estimated mean counts of the pathogen in positive  
 109 swabs from emptied pens were  $5.7 \pm 1.0 \log_{10}$  CFU/mL. Mean counts obtained AC ( $4.3 \pm 0.4 \log_{10}$   
 110 CFU/mL) and AD ( $4.0 \pm 0.6 \log_{10}$  CFU/mL) were significantly lower ( $p < 0.05$ ) than  
 111 *B. hyodysenteriae* values BC (Figure 1A). However, we did not observe any significant variation  
 112 of  $\log_{10}$  CFU/mL between cleaning and disinfection protocols ( $p>0.05$ ).



113

114 **Figure 1.** Mean *B. hyodysenteriae* counts estimated using real-time PCR in the pens sampled.

115 Mean values  $\pm$  standard deviations of log<sub>10</sub> CFU/mL estimated using real-time PCR in all  
 116 *B. hyodysenteriae*-positive pens before cleaning (BC) included in this study (A) as well as on farm  
 117 A (B) and farm B (C). A two-step protocol including power washing and disinfection with Hypred  
 118 Force 7 was carried out on Farm A while Farm B cleaning and disinfection protocol included pre-  
 119 soaking with cold water and detergent, power washing with cold water and final disinfection with  
 120 MS Megades Oxy.

121 \* Denotes statistically significant differences when compared with the *B. hyodysenteriae* counts  
 122 before cleaning protocol ( $p < 0.05$ ). Statistical analysis could not be made for Farm A because  
 123 only one *B. hyodysenteriae*-positive pen was identified after cleaning and before disinfection (AC)  
 124 and after disinfection (AD).

125

126 On farm A (Figure 1B), the only *B. hyodysenteriae*-positive pen AC showed a lower value of  
127 *B. hyodysenteriae* counts ( $4.5 \pm 0.2 \log_{10}$  CFU/mL) than the values obtained BC ( $6.1 \pm 0.9 \log_{10}$   
128 CFU/mL) and the bacterial load clearly decreased after disinfection with Hyper Force 7 ( $3.3 \pm 0.1$   
129  $\log_{10}$  CFU/mL). Farm B (Figure 1C), using MS Megades Oxy, showed similar *B. hyodysenteriae*  
130 estimations. In detail, the means of  $\log_{10}$  CFU/mL estimated BC, AC and AD were  $5.6 \pm 1.1$ ,  $4.3$   
131  $\pm 0.5$  and  $4.2 \pm 0.4$ , respectively.

132 *Brachyspira hyodysenteriae* could only be isolated from one of all environmental samples  
133 collected which were *B. hyodysenteriae*-positive by real-time PCR (n=37; 25 samples BC, 7  
134 samples AC and 5 samples AD). The positive culture sample was obtained from an environmental  
135 sample collected in the first sampling (BC) from farm B. The quantification of *B. hyodysenteriae*  
136 by real-time PCR revealed that the bacterial load in that sample was the highest estimated in our  
137 study ( $7.47 \pm 0.01 \log_{10}$  CFU/mL).

138

## 139 **Discussion**

140 Preventive medicine is essential to combat livestock infectious diseases in the post-antibiotic era  
141 and biosecurity has gained relevance in difficult-to-control diseases such as SD [19]. Within  
142 biosecurity schemes, implementation of effective cleaning and disinfection protocols are  
143 mandatory as part of those strategies, which aim at breaking the disease transmission among  
144 batches [11]. This fact is supported by observational studies such as the one carried out by  
145 Neiryneck et al. [2], who only found successful eradication programmes for *B. hyodysenteriae* on  
146 the four farms, which implemented properly cleaning and disinfection procedures, among other  
147 biosecurity measures. This efficacy relies on the selection of the most appropriate compounds

148 [14,15] and their application through effective protocols. In this way, there exist only a few  
149 research studies focusing on the susceptibility of *B. hyodysenteriae* to disinfectants and the  
150 efficacy of current cleaning and disinfection protocols on farms with endemic SD.

151 The results of our study under laboratory conditions confirmed the antibacterial activity of most  
152 commercial disinfectants tested against field isolates of *B. hyodysenteriae*. Earlier studies  
153 evaluating the *in-vitro* activity of disinfectants from different chemical groups against a type strain  
154 and a field *B. hyodysenteriae* isolate [20] or a collection of seven *B. pilosicoli* [21] converged in  
155 the conclusion that disinfectants were effective against *Brachyspira* spp., even at concentrations  
156 lower than that recommended by manufacturers. Our results show that following the European  
157 Norm (EN) 1656:2009, most disinfectants can be considered as effective products under the assay  
158 conditions, as they reduced 99.999% of bacteria in suspension after 30 min of contact. However,  
159 the fact that a few numbers of isolates experienced lower sensitivity against Virkon-S, a peroxygen  
160 disinfectant and Limoseptic, an ammonium derivate shows that slight strain-dependent variations  
161 can occur. It is worth mentioning that two of the four isolates exhibiting higher tolerance to Virkon-  
162 S and Limoseptic disinfectants also showed high antibiotic MIC values. The increase and the  
163 potential spread of isolates with reduced susceptibility to antibiotics and disinfectants limits two  
164 of the most efficient strategies in SD control and highlights the relevance of early detection of  
165 these problematic strains.

166 Sterile faeces are usually included in the *in-vitro* evaluation of disinfectants. Despite the fact that  
167 it has been shown than faeces can increase the MIC of a disinfectant needed to inhibit the growth  
168 of *Brachyspira* spp. [20,21], our results show, as in other studies [22], that the presence of faeces  
169 did not affect the *in-vitro* activity of the compounds at the recommended concentrations. However,

170 we must point out that under field conditions, large amounts of faeces or organic matter can inhibit  
171 disinfectant activity [23].

172 We further researched the efficacy of disinfectants in practice by monitoring routine cleaning and  
173 disinfection protocols on two farms with endemic SD. Environmental detection of  
174 *B. hyodysenteriae* in pens from grower and finisher pig batches with clinical outbreaks of SD  
175 showed the presence of relevant concentrations of the pathogen in at least half of the pens tested  
176 using real-time PCR. Despite the fact that this molecular diagnostic technique does not  
177 differentiate viable from non-viable *B. hyodysenteriae*, the DNA mean values reached ( $5.72 \pm 1.04$   
178  $\log_{10}$  CFU/mL) are not far from the experimental dose in SD challenges [24] and provide an idea  
179 of the load of pathogen in emptied pens after animals have been moved. However, the parallel  
180 culture of fresh samples did not support our PCR results. *Brachyspira hyodysenteriae* is a  
181 fastidious anaerobe and factors such as antimicrobial treatments, time lapse between shedding and  
182 sample collection and/or dilution of pathogen concentration by dejections may hamper its further  
183 laboratory isolation, an experience shared with a previous environmental study of *B.*  
184 *hyodysenteriae* viability [18]. The fact that subsequent batches of pigs experienced SD on both  
185 farms points out the viability of the *B. hyodysenteriae* detected in the pens.

186 Surface sampling of pens AC and AD highlighted the presence of the pathogen in almost a third  
187 of the positive pens, with no improvement of the disinfection step compared to power washing  
188 (farm A) or washing with detergent (farm B), a result which contrasts with our *in-vitro* results and  
189 shows the failure of the protocols put in place, particularly on farm B, where the visual inspection  
190 of pens evidenced dirty areas after finishing the cleaning protocol (data not shown). Despite that  
191 the cleaning and disinfection protocols reduced 80% of initial *B. hyodysenteriae*-positive pens,

192 viable *B. hyodysenteriae* remaining on pen surfaces, feeders, corridors or equipment are potential  
193 source of infection for the forthcoming batches of animals [3,20]. *Brachyspira hyodysenteriae*  
194 quantification estimates in pens remaining positive revealed a log reduction of counts after  
195 cleaning (1.40 log<sub>10</sub> CFU/mL), with no further improvement AD. A similar reduction in  
196 *Enterobacteriaceae* counts was achieved by a similar protocol including high-pressure washing in  
197 the lairage environment of a pig abattoir [16]. Disinfection and drying also removed *Salmonella*  
198 and reduced *Enterobacteriaceae* counts in the aforementioned study. We did not observe such  
199 benefit in *B. hyodysenteriae* estimates, with a reduction after disinfectant application on farm A  
200 positive pen (1.79 log<sub>10</sub> CFU/mL) and had no effect on pens from farm B either.

201

## 202 **Conclusions**

203 This study shows the susceptibility of *B. hyodysenteriae* field isolates to currently used commercial  
204 disinfectants under laboratory conditions. However, in practice, the cleaning and disinfection  
205 protocols evaluated in this study frequently failed to remove *B. hyodysenteriae*, probably, as a  
206 consequence of deficient pen faecal removal. Using real-time PCR, we showed a high load of the  
207 pathogen in emptied pens and a low reduction achieved using protocols tested. The result is a  
208 warning for farms with endemic SD that the cleaning and disinfection protocols in use should be  
209 evaluated.

210

211

212

213

214 **Methods**215 **Bacterial strains and disinfectants**

216 A set of ten isolates of *B. hyodysenteriae* kept in the bacteriological collection from the  
 217 DIGESPORC research group at the University of León was used in this study. The isolates were  
 218 recovered from the diagnosis submissions from diarrhoea outbreaks on Spanish swine farms  
 219 between January 2018 and December 2019. Table 3 gives the list of isolates used and their  
 220 antimicrobial profile, determined using a broth microdilution procedure as previously described  
 221 [25] using VetMIC Brachy antibiotic panels (SVA, Sweden).

222  
 223 **Table 3.** MIC values ( $\mu\text{g/mL}$ ) of six antimicrobial agents obtained against the 10  
 224 *B. hyodysenteriae* isolates tested.

Antimicrobial agent and concentration range ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )									
	Isolate									
	IT-1	IT-18	IT-39	IT-40	IT-45	IT-48	IT-67	IT-68	IT-83	IT-85
<b>Tiamulin</b> (0.063–8)	8	0.125	1	>8	>8	4	>8	1	0.125	0.5
<b>Valnemulin</b> (0.031–4)	>4	<0.031	0.5	4	0.25	4	>4	1	<0.031	0.5
<b>Doxycycline</b> (0.125–16)	1	1	0.25	2	16	1	16	2	1	0.5
<b>Tylvalosin</b> (0.25–32)	>32	4	0.5	>32	1	2	16	8	8	1
<b>Lincomycin</b> (0.5–64)	32	32	32	>64	>64	>64	32	32	32	16
<b>Tylosin</b> (2–128)	>128	>128	4	>128	>128	>128	8	>128	>128	>128

225

226 We collected information on disinfectants commonly used from nearby farms within our region,  
 227 finally selecting eight commercial disinfectants and ethanol (used as effective disinfectant control).  
 228 Details of disinfectants composition and use conditions are detailed in Table 4.

229

230 **Table 4.** Composition and final concentration of the working solution of the disinfectants tested.

Disinfectant	Main bactericidal components and concentration	Working concentration
<b>ET-70% (alcohol)</b>	70% ethanol	100% <sup>a</sup>
<b>Virkon-S (peroxygen compound)</b>	49.7% Pentapotassium bis(peroxymonosulphate) bis(sulphate) and organic acids	1%
<b>CR-36 (alcohol and quaternary ammonium)</b>	0.256% 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol	100% <sup>a</sup>
<b>Yodermin (povidone-iodine)</b>	10% Polyvinylpyrrolidone iodine (equal to 1% available iodine)	100% <sup>a</sup>
<b>Poliformo (Phenol)</b>	10% p-chloro-m-cresol	2%
<b>Limoseptic (glutaraldehyde and quaternary ammonium)</b>	5% glutaraldehyde and 4.5% didecyldimethylammonium chloride	1%
<b>MS Megades Novo (glutaraldehyde and quaternary ammonium)</b>	15% glutaraldehyde and 10% quaternary ammonium	0.75%
<b>MS Megades Oxy (peroxygen compound and peracetic acid)</b>	7.8% hydrogen peroxide and 2.4%peracetic acid	0.5%
<b>Hypred Force 7 * (glutaraldehyde and quaternary ammonium)</b>	13% glutaraldehyde, 1.5% didecyldimethylammonium chloride and 8% quaternary ammonium compounds, benzylalkyldimethyl and chlorides	2%

231 \*HYPRED FORCE 7 was only tested under field conditions.

232 <sup>a</sup> not diluted.

233

#### 234 *In-vitro* efficacy of disinfectant against *B. hyodysenteriae*

235 The evaluation of bactericidal activity of disinfectants was carried out using a dilution-  
 236 neutralization method according to the recommendations of EN 1656:2009. In brief, 100 µL of a



237 bacterial suspension (approximately  $10^7$  CFU/mL) and 100  $\mu$ L of sterile faeces (121°C, 15 min in  
238 autoclave) as interfering substance were added to 800  $\mu$ L of each disinfectant diluted in hard water  
239 to obtain the concentration recommended by the manufacturers (Table 4). After 30 min incubation  
240 at 10°C, 100  $\mu$ L of the mixture was mixed with 100  $\mu$ L of sterile water and 800  $\mu$ L of Dey-Engley  
241 neutralizing broth (BD Difco, United States) and again incubated for 5 min at 20°C.

242 Estimation of the survival population was performed by plating ten-fold serial dilutions in  
243 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) into Trypticase Soy Agar (TSA) supplemented with 5%  
244 sheep blood (Oxoid, Spain). Finally, plates were incubated in a bug box anaerobic workstation  
245 (Baker Ruskinn, United States) with an oxygen-free anaerobic gas mixture (80% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub> and  
246 10% CO<sub>2</sub>) at 39°C for four-six days, the period after which the surviving population (log<sub>10</sub>  
247 CFU/mL) was estimated. Each test was carried out in duplicate using a fresh culture suspension.  
248 *B. hyodysenteriae* reference strain B204 (ATCC 31212) and ethanol (ET-70%) were also included  
249 as a quality control strain and disinfectant control, respectively.

250 Finally, the viability of *B. hyodysenteriae* in sterile faeces and neutralizing broth was confirmed  
251 and the neutralizing capacity of the Dey-Engley neutralizing broth against each disinfectant was  
252 also checked before running the experiment.

### 253 **On farm efficacy of cleaning and disinfection protocols**

254 Field efficacy of cleaning and disinfection protocols was evaluated on two commercial pig farms  
255 with endemic SD. A two-step protocol including power washing and disinfection with Hypred  
256 Force 7 was carried out on Farm A while Farm B cleaning and disinfection protocol included pre-  
257 soaking with cold water and detergent, power washing with cold water and final disinfection with

258 MS Megades Oxy. Farm characteristics, the specific soapy detergent and disinfectant used and  
 259 number of pens per farm are detailed in Table 5.

260

261 **Table 5. Details of farms participating in the evaluation of the cleaning and disinfection**  
 262 **against *B. hyodysenteriae*.**

FARM	Type of swine production	N° pens initially included	Floor type	Weight of animals	Soapy detergent	Disinfectant
A	Finishing unit	8	Part slatted (concrete)	72 kg	Not used	<b>Hypred Force 7</b>
B	Farrow to grower	48	Fully slatted (plastic)	20 kg	MS TopFoam LC Alk	<b>MS Megades Oxy</b>

263

264 Following the same procedure, four squares of each pen evaluated (approximately 25 cm<sup>2</sup> each)  
 265 were swabbed BC and AC using a sterile gauze per pen placed into 50 mL of PBS (pH 7.4) and  
 266 AD using a cellulose sponge per pen supplied in sterile bags with 10 mL of neutralizing buffer  
 267 (3M HydraSponge, United States). In both AC and BD sampling, the pens were visually inspected  
 268 before sampling and dirty areas were selected for swabbing if detected. Samples were handled  
 269 aseptically under cooling conditions and processed within 24 h in the laboratory.

#### 270 *Brachyspira hyodysenteriae* detection and quantification by real-time PCR

271 Gauzes and sponges embedded with PBS or neutralizing buffer were placed into sterile bags and  
 272 homogenized using a stomacher (Seward 400, UK) for 5 min. From each sample, a final volume  
 273 of 500 µL were further used to extract DNA using GeneMATRIX Stool DNA Purification Kit  
 274 (EurX, Poland), following the manufacturer's recommendations.

275 A species-specific real-time PCR assay was carried out to detect the presence of *B. hyodysenteriae*  
276 using the primers, probes and the cycling conditions previously described [26]. Each reaction  
277 mixture (20  $\mu$ L final volume) contained 8  $\mu$ L of Maxima Probe real-time PCR Master Mix 2X  
278 (Thermo Scientific, Stockholm, Sverige), 0.3  $\mu$ L of 10  $\mu$ M each primer, 0.15  $\mu$ L of 10  $\mu$ M Taq-  
279 Man probe, 0.12  $\mu$ L of Rox (diluted 1:10 in nuclease-free water, Thermo Scientific, Sweden),  
280 9.28  $\mu$ L of nuclease-free water and 2  $\mu$ L of extracted DNA. The assay was carried out in a  
281 QuantStudio 1 thermal cycler (Applied Biosystems, United States) and the *B. hyodysenteriae*  
282 counts in targeted samples was estimated using a standard curve which was prepared using ten-  
283 fold serial dilutions of a *B. hyodysenteriae* B204 pure culture (initial load 8 log<sub>10</sub> CFU/mL and  
284 range 8 to 2 log<sub>10</sub> CFU/mL). DNA extraction of standard curve broth was carried out as described  
285 above for environmental samples. The detection limit was defined by the linear portion of the  
286 standard curve and was set at 3 log<sub>10</sub> CFU/mL (Cycle threshold value of 35.7). Each DNA sample  
287 was analysed in duplicate.

#### 288 ***Brachyspira hyodysenteriae* detection and isolation in selective media**

289 In parallel to real-time PCR detection and quantification of *B. hyodysenteriae*, samples were  
290 cultured to detect, isolate and purify *B. hyodysenteriae* following the methodology described [27].  
291 In brief, TSA plates (Scharlab, Spain) supplemented with 5% ovine blood (Oxoid, Spain) and  
292 antibiotics (400  $\mu$ g/mL spectinomycin, 8  $\mu$ g/mL colistin and 20  $\mu$ g/mL vancomycin, Sigma-  
293 Aldrich, United States) was used for primary isolation. Suspected positive samples showing strong  
294  $\beta$ -haemolysis and spirochaetes in phase-contrast microscopy were confirmed using species-  
295 specific PCR based on the *tlyA* gene [28]. TSA supplemented with 5% ovine blood agar (Oxoid,  
296 Spain) was further used for subsequent subcultures until a pure growth was confirmed by phase-

297 contrast microscopy. All cultures were carried out under optimal conditions for the growth of  
298 *B. hyodysenteriae* previously described.

### 299 **Statistical analysis**

300 The analysis was carried out with IBM SPSS Statistics version 26 at the 5% significance level.  
301 The *B. hyodysenteriae* counts ( $\log_{10}$  CFU/mL) estimated by real-time PCR were tested for  
302 normality (Kolmogorov-Smirnov test) and statistical differences among different samplings (BC,  
303 AC and AD) were evaluated using the ANOVA test. Differences in proportions of positive pens  
304 among farm A and farm B were checked using chi-square or Fisher's exact tests where appropriate.

305

### 306 **List of abbreviations**

307 SD: Swine dysentery, AI/AO: All-in/all-out, EN: European Norm, CFU: Colony forming units,  
308 BC: Before cleaning, AC: after cleaning and before disinfection, AD: After disinfection, PBS:  
309 Phosphate-buffered saline, TSA: Trypticase Soy Agar, ATCC: American Type Culture Collection.

310

### 311 **Declarations**

#### 312 **Ethics approval and consent to participate**

313 Not applicable.

#### 314 **Consent for publication**

315 Not applicable.

#### 316 **Availability of data and materials**

317 The authors declare that they did not apply new software and databases.

#### 318 **Competing interests**

319 The authors declare that they have no competing interests.

320

### 321 **Funding**

322 This study was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2019-110662RB-I00)  
323 and the Castilla y León Rural Development Programme co-financed by EAFRD (47/18/125/G02)

### 324 **Authors' contributions**

325 Study design and direction: MGG, HA, PR and AC. *In-vitro* experiments: MGG, LPP, CV, HP  
326 and OM. Analysis of the results and writing of the manuscript: MGG, HA and AC. All authors  
327 read and approved the final manuscript.

### 328 **Acknowledgements**

329 We acknowledge the excellent technique assistance provided by Diana Molina, as well as the help  
330 and willingness of veterinary practitioners and farmers.

### 331 **Authors' information**

332 Manuel Gómez (LE131-18) and Clara Vega (workplace ULE-02-B) were supported by grants  
333 from Junta de Castilla y León co-financed by the European Social Fund and Youth Employment  
334 Initiative. Héctor Argüello is supported by the Spanish Ministry of Education under the  
335 programme “Beatriz Galindo” (BEAGAL-18-106). Lucía Pérez-Pérez (PRE2020-093762), Óscar  
336 Mencía-Ares (FPU16/03485), Héctor Puente (FPU17/00466) are also supported by the Spanish  
337 Ministry of Education.

338

339

340

341

342 **References**

- 343 1. Burrough ER. Swine Dysentery: Etiopathogenesis and Diagnosis of a Reemerging  
344 Disease. *Vet Pathol.* 2017; doi: 10.1177/0300985816653795.
- 345 2. Neiryneck W, Boyen F, Chantziaras I, Vandersmissen T, Vyt P, Haesebrouck F, et al.  
346 Implementation and evaluation of different eradication strategies for *Brachyspira*  
347 *hyodysenteriae*. *Porc Heal Manag.* 2020; doi: 10.1186/s40813-020-00162-2.
- 348 3. Alvarez-Ordóñez A, Martínez-Lobo FJ, Arguello H, Carvajal A, Rubio P. Swine  
349 dysentery: Aetiology, pathogenicity, determinants of transmission and the fight against the  
350 disease. *Int. J. Environ.* 2013; doi: 10.3390/ijerph10051927.
- 351 4. Paster BJ, Dewhirst FE. Phylogenetic foundation of spirochetes. *J Mol Microbiol*  
352 *Biotechnol.* 2000. p. 341–4.
- 353 5. Mirajkar NS, Phillips ND, La T, Hampson DJ, Gebhart CJ. Characterization and  
354 recognition of *Brachyspira hampsonii* sp. Nov., a novel intestinal spirochete that is pathogenic to  
355 pigs. *J Clin Microbiol.* 2016; doi: 10.1128/JCM.01717-16.
- 356 6. Rubin J, Costa M, Hill J, Kittrell H, Fernando C, Huang Y, et al. Reproduction of  
357 mucohaemorrhagic diarrhea and colitis indistinguishable from swine dysentery following  
358 experimental inoculation with ‘*Brachyspira hampsonii*’ strain 30446. *PLoS One.* 2013; doi:  
359 10.1371/JOURNAL.PONE.0057146.
- 360 7. Desrosiers R. Transmission of swine pathogens: different means, different needs.  
361 *Anim. Health Res. Rev.* 2011; doi: 10.1017/S1466252310000204.
- 362 8. Rugna G, Bonilauri P, Carra E, Bergamini F, Luppi A, Gherpelli Y, et al. Sequence

363 types and pleuromutilin susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Italian pigs  
364 with swine dysentery: 2003-2012. *Vet J.* 2015; doi: 10.1016/j.tvjl.2014.10.033.

365 9. Carvajal A, de Arriba ML, Rodríguez H, Vidal AB, Duhamel GE, Rubio P, et al.  
366 Prevalence of *Brachyspira* species in pigs with diarrhoea in Spain. *Vet Rec.* 2006; doi:  
367 10.1136/vr.158.20.700.

368 10. Hidalgo Á, Carvajal A, Vester B, Pringle M, Naharro G, Rubio P. Trends towards  
369 lower antimicrobial susceptibility and characterization of acquired resistance among clinical  
370 isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; doi:  
371 10.1128/AAC.01749-10.

372 11. Bragg RR, Meyburgh CM, Lee JY, Coetzee M. Potential treatment options in a post-  
373 antibiotic era. *Adv Exp Med Biol.* 2018; doi: 10.1007/978-981-10-7572-8\_5.

374 12. Jayaraman B, Nyachoti CM. Husbandry practices and gut health outcomes in weaned  
375 piglets: A review. *Anim. Nutr.* 2017; doi: 10.1016/j.aninu.2017.06.002

376 13. Frenzel H, Menrath A, Tomuzia K, Braeunig J, Appel B. Decontamination of High-  
377 risk Animal and Zoonotic Pathogens. *Biosecurity Bioterrorism Biodefense Strateg Pract Sci.*  
378 2013; doi: 10.1089/bsp.2012.0069.

379 14. Bragg R, Jansen A, Coetzee M, van der westhuizen W, Boucher C. Bacterial  
380 resistance to quaternary ammonium compounds (QAC) disinfectants. *Adv Exp Med Biol.* 2014;  
381 doi: 10.1007/978-81-322-1774-9\_1.

382 15. Mc Carlie S, Boucher CE, Bragg RR. Molecular basis of bacterial disinfectant  
383 resistance. *Drug Resist Updat.* 2020; doi: 10.1016/j.drup.2019.100672.

384 16. Walia K, Argüello H, Lynch H, Grant J, Leonard FC, Lawlor PG, et al. The efficacy

385 of different cleaning and disinfection procedures to reduce *Salmonella* and *Enterobacteriaceae*  
386 in the lairage environment of a pig abattoir. *Int J Food Microbiol.* 2017; doi:  
387 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.002.

388 17. Cadetg RSS, Vidondo B, Nathues H, Schüpbach G, Zeeh F. Retrospective study on  
389 the eradication of Swine Dysentery (*Brachyspira hyodysenteriae*) in Switzerland. *Schweiz Arch*  
390 *Tierheilkd.* 2019; doi: 10.17236/sat00202.

391 18. Giacomini E, Gasparri S, Lazzaro M, Scali F, Boniotti MB, Corradi A, et al. The  
392 role of transportation in the spread of *Brachyspira hyodysenteriae* in fattening farms. *BMC Vet*  
393 *Res.* 2018; doi: 10.1186/s12917-017-1328-5.

394 19. Alarcón LV, Allepuz A, Mateu E. Biosecurity in pig farms: a review. *Porc Heal*  
395 *Manag.* 2021; doi: 10.1186/S40813-020-00181-Z.

396 20. Lobo D, Cizek A. Bactericidal efficacy of two disinfectants against *Brachyspira*  
397 *hyodysenteriae* and one feed supplement against *B. hyodysenteriae* and *B. pilosicoli*. *Vet Med*  
398 (Praha). 2004; doi: 10.17221/5690-VETMED.

399 21. Corona-Barrera E, Smith DGE, Murray B, Thomson JR. Efficacy of seven  
400 disinfectant sanitisers on field isolates of *Brachyspira pilosicoli*. *Vet Rec.* 2004; doi:  
401 10.1136/vr.154.15.473

402 22. Martínez-Martínez S, Ryubero-Delgado S, Rodríguez-Ferri EF, Frandoloso R,  
403 Álvarez-Estrada Á, Gutiérrez-Martín CB. *In vitro* efficacy of several disinfectants against  
404 *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and *Escherichia coli* strains from poultry. *Cienc Rural.*  
405 2016; doi: 10.1590/0103-8478cr20151288.

406 23. Wales A, Breslin M, Davies R. Assessment of cleaning and disinfection in



407 *Salmonella*-contaminated poultry layer houses using qualitative and semi-quantitative culture  
408 techniques. *Vet Microbiol.* 2006; doi: 10.1016/j.vetmic.2006.04.026.

409 24. Jacobson M, Fellström C, Lindberg R, Wallgren P, Jensen-Waern M. Experimental  
410 swine dysentery: comparison between infection models. *J Med Microbiol.* *J Med Microbiol*;  
411 2004; doi: 10.1099/JMM.0.05323-0.

412 25. Karlsson M, Fellström C, Gunnarsson A, Landén A, Franklin A. Antimicrobial  
413 susceptibility testing of porcine *Brachyspira (Serpulina)* species isolates. *J Clin Microbiol.* 2003;  
414 doi: 10.1128/jcm.41.6.2596-2604.2003

415 26. Song Y, Hampson DJ. Development of a multiplex qPCR for detection and  
416 quantitation of pathogenic intestinal spirochaetes in the faeces of pigs and chickens. *Vet*  
417 *Microbiol.* 2009; doi: 10.1016/j.vetmic.2008.12.020

418 27. Hidalgo Á, Carvajal A, García-Feliz C, Osorio J, Rubio P. Antimicrobial  
419 susceptibility testing of Spanish field isolates of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Res Vet Sci.* 2009;  
420 doi: 10.1016/j.rvsc.2008.10.017.

421 28. Råsbäck T, Fellström C, Gunnarsson A, Aspán A. Comparison of culture and  
422 biochemical tests with PCR for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira*  
423 *pilosicoli*. *J Microbiol Methods.* *J Microbiol Methods*; 2006; doi: 10.1016/j.mimet.2005.12.008.

424

---

## 4. DISCUSIÓN

---

Actualmente, el desarrollo de estrategias que permitan reducir el uso de antibióticos y ofrezcan una alternativa terapéutica es de vital importancia para evitar o minimizar las consecuencias que la limitación del uso de antibióticos va a tener en el sector porcino. En este sentido, el uso de antimicrobianos no antibióticos y la mejora de medidas de bioseguridad, como puede ser la implementación de una estricta limpieza y desinfección, constituyen estrategias que pueden prevenir o mitigar los procesos infectocontagiosos, reduciendo el impacto negativo que tienen en la sanidad y bienestar animal, así como en la viabilidad económica de las explotaciones (Omonijo *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2019a).

Para poder obtener el máximo rendimiento de estas estrategias primero debemos adquirir un adecuado conocimiento sobre diversos aspectos asociados con su uso, como pueden ser las concentraciones efectivas, sus mecanismos de acción o el espectro de microorganismos patógenos frente a los que presentan actividad, incluyendo bacterias con tendencia a desarrollar multiresistencia frente a antibióticos o virus. Por este motivo, en esta Tesis Doctoral se ha tratado de abordar, en el ámbito específico de la producción porcina, algunos de estos aspectos aún no profundamente estudiados con el fin de obtener información relevante que permita optimizar el empleo de estas estrategias.

### **4.1. ESTUDIO *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE UNA SELECCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS, ACEITES ESENCIALES Y COMPONENTES DE ACEITES ESENCIALES**

Ante la falta de consenso en torno a las concentraciones a las cuales los AEs y AOs presentan actividad antimicrobiana y la variabilidad de resultados, tanto en los estudios *in vitro* como en trabajos de campo, en un primer lugar se ha tratado de determinar mediante ensayos *in vitro* los valores de CMI y de concentración mínima bactericida (CMB) de una selección de AOs y AEs, así como de algunos de sus componentes. Para ello, se han empleado especies bacterianas de importancia clínica y/o zoonótica para la ganadería porcina como son *E. coli*, *S. enterica* y *Clostridium perfringens*. Las infecciones por cepas patógenas de la especie *E. coli* o por *S. enterica* se asocian con cuadros clínicos de diarrea en cerdos de distintas edades. Por su parte, *C. perfringens* es

#### 4. Discusión

---

un componente habitual de la microbiota de los lechones que puede causar cuadros entéricos cuando se multiplica de forma excesiva, asociado a procesos de disbiosis. En lo que respecta a los tratamientos, todas estas infecciones son causa importante de utilización de antibióticos en el sector porcino, lo que indudablemente favorece la selección de bacterias resistentes (Songer y Uzal, 2005; Boyen *et al.*, 2008a; Fairbrother y Gyles, 2012; Posthaus *et al.*, 2020).

En relación a los aspectos metodológicos de esta primera investigación, cabe destacar que se utilizaron colecciones de aislados de campo obtenidos de muestras remitidas para el diagnóstico al grupo de investigación DIGESPORC. De esta forma, los resultados pueden ser representativos y extrapolables para las cepas que circulan en las granjas. También se ha empleado una técnica de microdilución que permite obtener resultados particularmente precisos y reproducibles. Así, entre sus múltiples ventajas podemos destacar que la concentración bacteriana empleada para la evaluación de cada uno de los compuestos se mantiene constante, de forma similar a lo que ocurre en las técnicas cuantitativas para el estudio de la actividad antimicrobiana de antibióticos (Wiegand *et al.*, 2008).

Con el fin de estudiar las interacciones entre distintos compuestos, cuando se combinaron a diferentes ratios, empleamos el valor del índice de la concentración inhibitoria fraccionada o CIF. Dicho valor se calculó a través de la técnica de tablero de ajedrez o “*checkerboard*” que permite estudiar múltiples combinaciones de diluciones seriadas de los compuestos a evaluar de forma conjunta. La metodología utilizada y la interpretación de los resultados obtenidos se han basado en trabajos publicados previamente (Odds, 2003; Fratini *et al.*, 2017). Tanto los valores de CMI y CMB obtenidos para cada AO, AE y componente de AEs evaluado como los del índice de CIF aparecen recogidos en la primera publicación que compone la presente Tesis Doctoral.

Finalmente, la actividad antibacteriana ejercida por la fracción volátil de todos los compuestos, así como la sensibilidad de las tres especies bacterianas tras una corta exposición a diferentes concentraciones de los compuestos con mayor actividad fueron evaluadas en la segunda publicación.

En cuanto a los resultados obtenidos, todos los compuestos evaluados presentaron actividad antimicrobiana frente al menos uno de los aislados evaluados, con la excepción del AE de pimienta. Con el objetivo de conocer si la falta de actividad del AE de pimienta

era debida a una baja dispersión del mismo en medios de cultivo líquidos, como ha sido descrito previamente (Tan y Lim, 2015), se recurrió a la técnica de microdilución en agar. Esta técnica permite obtener una solución de trabajo homogénea y estable entre el compuesto en estudio y el medio de cultivo específico. El crecimiento bacteriano en la superficie del agar es fácilmente visible, independientemente de los cambios en la opacidad o en el color del medio de cultivo ocasionados por el compuesto a evaluar (Golus *et al.*, 2016). No obstante, el AE de pimienta tampoco demostró inhibición sobre el crecimiento en el rango de concentraciones estudiado empleando esta técnica. Es por ello que consideramos que la falta de actividad de este AE es, probablemente, consecuencia de la baja proporción de su principal componente o piperina (40 %) ya que sus propiedades antimicrobianas han sido descritas previamente (D'Souza *et al.*, 2017).

Teniendo como referencia los valores de CMI capaces de inhibir el crecimiento del 50 % de los aislados de cada especie bacteriana (CMI<sub>50</sub>), el carvacrol fue el producto con mayor actividad frente a las tres especies bacterianas en estudio (300 ppm). Ninguno de los compuestos evaluados presentó una actividad antimicrobiana superior a la presentada por el formaldehído, un potente desinfectante con alta capacidad bactericida que se empleó como control positivo, con la única excepción de la sal sódica de ácidos grasos destilados de coco frente a los aislados de *C. perfringens* (16 ppm). En concordancia con nuestro resultado, se ha demostrado una actividad significativa del ácido láurico, el principal componente de dicha sal, frente a bacterias Gram positivas (Timbermont *et al.*, 2010; Yoon *et al.*, 2018). Esta potente actividad frente a bacterias con una estructura compleja de peptidoglicano en su pared contrasta con la ausencia de actividad frente a *E. coli* y *S. enterica* en el rango de concentraciones estudiado (>5.000 ppm). En consonancia con este resultado, se ha descrito una escasa actividad del ácido láurico sobre enterobacterias (Anzaku *et al.*, 2017).

Los resultados de nuestro estudio demuestran la influencia del peso molecular de los AOs sobre la sensibilidad de las bacterias Gram positivas y Gram negativas a estos compuestos (Kang *et al.*, 2013; Stanojević-Nikolić *et al.*, 2016). En este sentido, las enterobacterias fueron más sensibles a los AOs de menor peso molecular, como es el ácido fórmico con un peso molecular de 46,03 g/mol. Este hecho se puede explicar por la menor resistencia que presenta la membrana externa de las bacterias Gram negativas hacia este tipo de ácidos en comparación con los de mayor peso molecular, como el ácido láurico (200,32 g/mol) (Partanen y Mroz, 1999; Raftari *et al.*, 2009; Stanojević-

#### 4. Discusión

---

Nikolić *et al.*, 2016). Las discrepancias entre los resultados observados en nuestro estudio y los obtenidos anteriormente en otros trabajos que indican que los ácidos de cadena corta son menos efectivos que los de cadena media, como puede ser el ácido caproico (Nakai y Siebert, 2003; Van Immerseel *et al.*, 2004), hacen necesarias más investigaciones que determinen el efecto del peso de la molécula sobre la permeabilidad de membrana.

Como se ha indicado anteriormente en la introducción, otro factor clave a tener en cuenta en la actividad antimicrobiana de los AOs es el valor pKa. En este sentido, Sprong *et al.* (2001) demostraron actividad del ácido láurico frente a *E. coli* y *S. enterica* a pH 5. Dicho resultado puede ser explicado por el hecho de que al presentar un pKa igual a 5,3, el ácido puede presentar su forma no disociada a ese valor de pH y, con ello, su naturaleza lipofílica. De esta forma, el ácido puede atravesar más fácilmente la membrana de las bacterias Gram negativas disminuyendo la resistencia ejercida por la presencia de LPS hacia los ácidos de cadena larga (Sheu y Freese, 1973).

El efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana, tanto de AOs como de AEs, fue también evaluado en nuestro estudio frente a *E. coli* y *S. enterica*. Los resultados obtenidos demuestran que los valores de CMI a pH 4,8 fueron inferiores a los obtenidos a pH 6, particularmente en los AOs, corroborando la mayor eficacia de estos compuestos a pH ácido (Partanen y Mroz, 1999; Omonijo *et al.*, 2018). A modo de ejemplo, se alcanzaron valores CMI<sub>50</sub> de 32 ppm en lugar de 1.562,5 ppm para el heptanoato sódico frente a ambas especies bacterianas o de 32 ppm en lugar de 300 ppm para el carvacrol frente a *S. enterica*. En el caso específico de los AEs, el incremento de su actividad podría ser explicado por el hecho de que al disminuir el pH, su hidrofobicidad se ve incrementada favoreciendo el paso al interior celular (Omonijo *et al.*, 2018). Sin duda, nuestros resultados demuestran la importancia del factor pH en la actividad de los AOs y AEs y, por ello, antes de aplicar tratamiento en las granjas, es necesario revisar el pH del agua con el fin de maximizar el efecto del producto a la concentración empleada.

Cabe mencionar que, a diferencia de lo observado para los AOs, el crecimiento de los aislados tanto de las enterobacterias como de *C. perfringens* fue inhibido a concentraciones muy similares por los AEs y sus componentes. Concretamente, tres diluciones dobles seriadas fueron las mayores variaciones obtenidas entre los valores de CMI<sub>50</sub> de las diferentes especies bacterianas incluidas. Aunque nuestro resultado se encuentra en concordancia con lo descrito previamente para los aceites de canela, clavo

y lima (Prabuseenivasan *et al.*, 2006), otros autores han descrito una mayor sensibilidad a los AEs de las bacterias Gram positivas en comparación con las Gram negativas (Burt, 2004; Brenes y Roura, 2010; Omonijo *et al.*, 2018). Estas diferencias podrían ser explicadas por distintos aspectos técnicos relacionados con los métodos usados para la estimación de la actividad antimicrobiana (Balouiri *et al.*, 2016), así como con las especies bacterianas o aislados incluidos (Vande Maele *et al.*, 2016). Del mismo modo, los factores biológicos como son la especie, edad, localización geográfica o condiciones de recolección de la planta de origen; los procesos químicos empleados para su obtención o las condiciones de almacenaje son los factores que pueden influir tanto en la composición como en la concentración y actividad de los AEs (Huyghebaert *et al.*, 2011).

En nuestro caso, los componentes de AEs inhibieron el crecimiento de los aislados a concentraciones inferiores a las presentadas por los AEs. Concretamente, los componentes de AEs con mayor efecto sobre las enterobacterias fueron el carvacrol frente a *E. coli* (CMI<sub>50</sub> igual a 300 ppm) y carvacrol y timol frente a *S. enterica* (CMI<sub>50</sub> igual a 300 ppm para ambos compuestos). Dicha actividad ha sido ampliamente demostrada con anterioridad con valores de CMI muy similares a los obtenidos en nuestro trabajo (Pei *et al.*, 2009; Ivanovic *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2015). En el caso de *C. perfringens*, cinamaldehído y de nuevo carvacrol (CMI<sub>50</sub> de 300 ppm) fueron los AEs más eficaces, aunque mostraron valores de CMI más elevados que los descritos por otros autores (Timbermont *et al.*, 2010; Du *et al.*, 2015).

En lo que respecta a la CMB, es necesario indicar que los valores obtenidos no fueron significativamente superiores a los de CMI, con la única excepción del ácido propiónico frente a *E. coli*. En este sentido, la ratio CMI<sub>50</sub>/CMB<sub>50</sub> (CMB capaz de eliminar al 50 % de los aislados de cada especie bacteriana) para la mayoría de los compuestos frente a las tres especies bacterianas estuvo comprendida entre 1 y 2, corroborando el efecto bactericida de estos compuestos a concentraciones inhibitorias. Resultados similares han sido previamente obtenidos por otros autores tras la evaluación *in vitro* de productos comerciales basados en extractos de cítricos (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2013; de Nova *et al.*, 2019). Además, es necesario indicar que las ratios CMI<sub>50</sub>/CMB<sub>50</sub> obtenidas para los AEs y sus componentes corroboran las hipótesis previas sobre la mayor resistencia de las bacterias Gram negativas a la acción de compuestos altamente hidrofóbicos, como son los AEs, respecto a las Gram positivas (Burt, 2004; Brenes y Roura, 2010; Omonijo *et al.*, 2018). De forma detallada, la mayoría de las ratios CMI<sub>50</sub>/CMB<sub>50</sub> obtenidas para las

#### 4. Discusión

---

enterobacterias fueron iguales a 2 (ratios comprendidas entre 1 y 4), en contraste a las obtenidas para *C. perfringens* que fueron iguales a 1, con la única excepción del AE de clavo. En este sentido, la barrera altamente hidrofílica presente en las bacterias Gram negativas constituida, por la fina capa de peptidoglicano y la membrana externa de LPS en contraste con los extremos lipofílicos del ácido lipoteicoico de la membrana celular de las Gram positivas podría justificar dichas diferencias (Cox *et al.*, 2000; Trombetta *et al.*, 2005). Por todo ello, nuestros resultados sugieren que la actividad bacteriostática de los AEs es independiente del tipo de pared celular presentada por los diferentes grupos bacterianos, a diferencia de la actividad bactericida que es mayor para las bacterias Gram negativas.

Antes de discutir los resultados obtenidos a través de la técnica de “*checkerboard*” es necesario indicar que la metodología descrita por Fratini *et al.* (2017) fue la seleccionada tras llevar a cabo una revisión bibliográfica. Dicha metodología permitió determinar de forma simultánea tanto los valores de CMI individuales de los compuestos incluidos en cada ensayo, como los valores de CMI de sus diferentes combinaciones binarias. Así, fue posible minimizar los errores a la hora de calcular el índice de la CIF al obtener los valores necesarios para dicho cálculo en la misma placa de cultivo y bajo las mismas soluciones iniciales, tanto de inóculo bacteriano como de compuesto.

La interpretación de los índices de CIF nos permitió confirmar la ausencia de sinergismo o, lo que es lo mismo, un efecto de los compuestos en combinación superior a la suma de los efectos individuales (índices de CIF inferiores a 0,5) para las combinaciones evaluadas, incluso en aquellas en las que se incluyó el control positivo o formaldehído. Dicho resultado contradice lo observado en un estudio previo en el que se demostró sinergismo tras la combinación, por ejemplo, del carvacrol y su precursor *p*-cimeno (Ultee *et al.*, 2000). Como ha sido descrito anteriormente, la existencia de efecto sinérgico podría estar justificada por el hecho de que uno de los compuestos evaluados podría ser responsable de provocar cambios significativos en la permeabilidad de la membrana citoplasmática favoreciendo la actividad bactericida del segundo compuesto incluido en la combinación (Burt, 2004). No obstante, demostramos un efecto de la combinación igual a la suma de los efectos individuales o efecto aditivo (índices de CIF comprendidos entre 0,5 y 1) para la mayoría de las combinaciones estudiadas. En concordancia con nuestros resultados, se han descrito efectos aditivos para algunas combinaciones de AEs frente a diferentes especies bacterianas (Pei *et al.*, 2009;

Du *et al.*, 2015; Ouedrhiri *et al.*, 2017), así como para combinaciones de AEs y AOs frente a *B. hyodysenteriae* (Vande Maele *et al.*, 2016). Por consiguiente, nuestro estudio corrobora la estrategia ventajosa de administrar este tipo de compuestos de forma combinada con el objetivo de obtener resultados positivos sin necesidad de recurrir a concentraciones elevadas. En este sentido, diferentes autores han demostrado que concentraciones altas de compuestos aromáticos en la dieta pueden provocar cambios organolépticos en los piensos y, con ello, modificar la palatabilidad así como promover una disminución de la IMDA (Trevisi *et al.*, 2007; Cross *et al.*, 2007). Por el contrario y a modo de ejemplo, un estudio previo ha confirmado los beneficios sobre el rendimiento del crecimiento de lechones destetados asociada a la suplementación de la dieta con una mezcla de AOs que incluyó ácido fumárico (13,5 %), cítrico (10 %), sórbico (10 %) y málico (6,5 %), cinamaldehído (15 %) y timol (5 %) a una concentración de 1 kg/t (Yang *et al.*, 2019b).

El empleo de la técnica de la placa de Petri invertida, previamente descrita (Maruzzella y Sicurella, 1960; Ross *et al.*, 2001; de Aguiar *et al.*, 2018), nos permitió confirmar que parte de la actividad antimicrobiana presentada por la mayoría de los compuestos evaluados es debida a sus componentes volátiles. Por un lado, este hecho corrobora la potencial utilidad de este tipo de compuestos en el tratamiento de enfermedades respiratorias y en la desinfección de instalaciones, previniendo la formación de biofilms como ha sido previamente indicado por otros autores (Laird y Phillips, 2012; de Aguiar *et al.*, 2018). Por otro lado, nos señala la relevancia del diseño de los ensayos para determinar la actividad antimicrobiana individual en estudios que incluyan compuestos con elevada volatilidad. En este sentido, es de vital importancia la evaluación de los compuestos en diferentes placas de cultivo o suficientemente separados entre sí de forma que su actividad solo se vea influenciada por la fracción volátil específica de cada uno de ellos.

Igualmente, es importante destacar la ausencia de actividad de los componentes volátiles de la sal sódica de ácidos grasos destilados de coco frente a *C. perfringens*, un resultado que sorprende puesto que previamente habíamos demostrado una elevada actividad con inhibición del crecimiento a bajas concentraciones. Además de poder ser justificada por la baja concentración a la que realmente se evaluó el compuesto, esta escasa actividad pudo ser debida a la pérdida de su fracción volátil por absorción en el agar o por degradación, como ha sido señalado por varios autores para otros compuestos



#### 4. Discusión

---

(Inouye *et al.*, 2001; de Aguiar *et al.*, 2018). Sin embargo, el mismo resultado fue obtenido de nuevo en el test de supervivencia tras la exposición durante 90 min a incluso el doble del máximo valor de CMB obtenido frente a los seis aislados de *C. perfringens* (62 ppm). En contraposición a nuestro resultado, una significativa actividad frente a dos cepas de esta especie bacteriana ha sido descrita en un estudio previo tras la exposición durante 30 min a 1.000 ppm de ácido láurico, el principal componente de la sal sódica de ácidos grasos destilados de coco (Skrivanova *et al.*, 2005). El estudio por microscopía electrónica de transmisión (TEM) demostró una separación entre las membranas celulares externas e internas, así como una desorganización del citoplasma bajo dichas condiciones (Skrivanova *et al.*, 2005). Estos resultados nos permiten concluir que el ácido láurico puede ser efectivo frente a *C. perfringens* a bajas concentraciones, pero únicamente tras la exposición directa y durante un cierto periodo de tiempo.

A diferencia de lo obtenido para la sal sódica de ácidos grasos destilados de coco, todos los compuestos restantes presentaron actividad antimicrobiana tras una corta exposición frente al menos una de las tres especies bacterianas. De forma general, los componentes de AEs, cinamaldehído, timol y carvacrol, fueron más efectivos que el ácido fórmico, y los aislados de las enterobacterias presentaron mayor sensibilidad al cinamaldehído que los de *C. perfringens*. Aunque las concentraciones de cinamaldehído evaluadas frente a *E. coli* y *S. Typhimurium* (rango 600 a 4.800 ppm) fueron superiores a las evaluadas frente a *C. perfringens* (rango 150 a 1.200 ppm), nuestros resultados parecen señalar diferencias en la actividad de este componente de AEs en función del tipo de pared celular de las bacterias.

Finalmente, un dato de interés dentro de los resultados obtenidos mediante la técnica de la placa de Petri invertida y el test de supervivencia es la diferencia observada tanto para los valores de diámetro de la zona de inhibición como de reducción de colonias viables, respectivamente, para la cepa de la Colección Española de Cultivos Tipo CECT 443 y el aislado SP 11 de *S. Typhimurium*. Este hecho refleja una respuesta intra-especie no tan homogénea como la obtenida para las especies *E. coli* y *C. perfringens* que no incluyeron cepas procedentes de colecciones de cultivo. Además, nuestro estudio refuerza la idea sugerida por otros autores (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2013; de Nova *et al.*, 2017, 2019) sobre la importancia de incluir aislados de campo en este tipo de estudios con el objetivo de obtener información relevante que pueda ser extrapolada a las condiciones de campo.

## **4.2. DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN BACTERICIDA DE LOS COMPONENTES DE ACEITES ESENCIALES CON MAYOR ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

A pesar del amplio número de trabajos existentes sobre la actividad antimicrobiana de los AEs (Inouye *et al.*, 2001; Trombetta *et al.*, 2005; Prabuseenivasan *et al.*, 2006; Pei *et al.*, 2009; Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016; Vande Maele *et al.*, 2016; Semeniuc *et al.*, 2017; de Nova *et al.*, 2019; Sim *et al.*, 2019), diferentes autores han recalcado la necesidad de seguir investigando dichos compuestos con el objetivo de obtener mayor información sobre sus dianas celulares específicas y detallar completamente sus mecanismos de acción (Calo *et al.*, 2015; Chouhan *et al.*, 2017; Omonijo *et al.*, 2018). Ambos aspectos son de vital importancia para la optimización de sus dosis efectivas y, con ello, mejorar su aplicación en alimentación animal (Omonijo *et al.*, 2018).

Por este motivo, en esta Tesis Doctoral se ha tratado de terminar el mecanismo de acción del timol y del cinamaldehído a través del uso de diferentes técnicas previamente validadas por nuestro grupo de investigación como son la citometría de flujo (CF), la espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) y la microscopía electrónica de barrido (SEM). Dichas técnicas permiten obtener información sobre los cambios en la fisiología, composición y estructura que tienen lugar, principalmente en la envoltura bacteriana, tras el tratamiento con diferentes compuestos (de Nova *et al.*, 2019), pero no han sido ampliamente utilizadas en la caracterización de componentes o principios activos principales de los AEs. En relación con esto, la evaluación específica de los componentes de AEs en lugar de las mezclas complejas como son los AEs permite evitar el efecto de los numerosos factores previamente mencionados que pueden influir en su composición y actividad, haciendo que los resultados sean más precisos y reproducibles (Burt, 2004; Huyghebaert *et al.*, 2011).

La selección de los componentes de AEs a estudiar se realizó en base a su estructura química más que a su actividad, debido a la posible influencia de determinados grupos funcionales sobre el mecanismo de acción (Burt, 2004). De esta forma, el cinamaldehído clasificado dentro del grupo de los fenilpropenos y con una menor actividad a la obtenida para los terpenos timol y carvacrol, fue incluido en nuestro trabajo. Por el contrario, el carvacrol, con una actividad significativa a bajas concentraciones, fue excluido debido a

#### 4. Discusión

---

que la posición del grupo hidroxilo en el anillo fenólico no parece influir en su actividad, lo que sugiere un mecanismo de acción similar al de su isómero el timol (Helander *et al.*, 1998; Ultee *et al.*, 2002; Nowotarska *et al.*, 2017; Kachur y Suntres, 2020).

Cabe destacar que el estudio del mecanismo de acción del timol y el cinamaldehído se llevó a cabo bajo las mismas condiciones empleadas en el test de supervivencia (exposición en oscuridad durante 90 min a diferentes concentraciones bactericidas) en concordancia con estudios previos (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2013; de Nova *et al.*, 2017, 2019). Esto nos permitió comprobar si los cambios determinados por las diferentes técnicas empleadas implicaban alteraciones en la viabilidad de las bacterias. Además, la ausencia de centrifugación en los pasos previos al tratamiento con los diferentes compuestos permitió obtener resultados mínimamente influenciados por aspectos metodológicos (de Nova *et al.*, 2019).

En lo que respecta a los resultados obtenidos por CF, fue evidente que los dos componentes de AEs evaluados presentaron un mecanismo de acción diferente, en concordancia con lo descrito previamente (Burt, 2004). A diferencia del cinamaldehído, el timol causó cambios significativos en la permeabilidad de la membrana celular, lo que favoreció la acumulación del ioduro de propidio (IP) en el interior celular, especialmente en las enterobacterias. Al igual que ocurría en el test de supervivencia, dicho efecto fue directamente proporcional a la concentración del timol, salvo para el aislado de *E. coli* EC 67. En este caso, el hecho de que la población de bacterias marcadas con IP fuese mayor tras la exposición a timol a 1.200 ppm que la obtenida a 2.400 ppm puede ser explicado por el hecho de que parte de las bacterias bajo esta última concentración se encontrasen desintegradas, imposibilitando la retención de IP, tal y como se ha propuesto previamente para otros productos (de Nova *et al.*, 2019). La alteración de la integridad de la membrana ha sido también propuesta por otros autores como principal mecanismo de acción del timol, así como del carvacrol frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas empleando tanto la CF (Hammer y Heel, 2012; Manzoor *et al.*, 2016) como otras técnicas (Lambert *et al.*, 2001b; Chauhan y Kang, 2014). Nuestros resultados en lo que respecta al cinamaldehído contrastan con los obtenidos recientemente por Olszewska *et al.*, (2020), quienes describen una significativa población bacteriana marcada con IP, próxima al 90 %, tras la exposición a una concentración inferior a la evaluada en nuestro trabajo. No obstante, las diferencias encontradas pueden ser explicadas por aspectos metodológicos ya que la solución bacteriana empleada en dicho trabajo fue centrifugada

a alta velocidad tanto *a priori* como *a posteriori* del tratamiento con el cinamaldehído. Como se ha indicado anteriormente, este hecho puede afectar a la integridad celular favoreciendo así la absorción del IP (de Nova *et al.*, 2019).

El análisis de los espectros obtenidos por FTIR corrobora los resultados obtenidos por otras técnicas. Por un lado, se evidenciaron cambios significativos dependientes de la concentración del timol en grupos funcionales presentes en carbohidratos y polisacáridos de la pared celular en las tres especies bacterianas evaluadas. Por otro lado, el cinamaldehído a las concentraciones más altas evaluadas provocó alteraciones en grupos funcionales distintos entre las enterobacterias y *C. perfringens*. Este hecho, de nuevo, coincide con lo postulado anteriormente por los resultados del test de supervivencia sobre la posibilidad de que el cinamaldehído presente un mecanismo de acción diferente para bacterias Gram negativas y Gram positivas.

A pesar de emplear un método diferente para la selección de las regiones espectrales de rayos infrarrojos (IR), diferentes autores centrados en valorar otros compuestos como potenciales alternativas a los antibióticos han demostrado también alteraciones en los mismos grupos funcionales afectados, tanto tras la exposición al timol como al cinamaldehído (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2013; de Nova *et al.*, 2017, 2019). A diferencia de estos autores, la alta reproducibilidad entre réplicas (coeficiente de correlación de Pearson o  $\rho > 0,95$ ) obtenida en nuestro estudio nos permitió emplear el algoritmo “*random forest*” para la selección de las regiones espectrales más variables tras la comparación de los espectros de los cultivos tratados con la mayor concentración evaluada y los espectros de los cultivos no tratados.

Por último, el uso de SEM permitió confirmar los resultados aportados por el resto de técnicas empleadas, en concordancia con lo descrito previamente por otros autores (Chauhan y Kang, 2014; Shen *et al.*, 2015; de Nova *et al.*, 2017, 2019). La ausencia de daño celular en las imágenes obtenidas en las muestras control ratifica la importancia de seguir una metodología que no comprometa la integridad celular y verifique la información obtenida en el estudio de los mecanismos de acción. En este sentido, las discrepancias existentes entre nuestros resultados y los obtenidos por Shen *et al.* (2015) sobre el efecto del cinamaldehído frente a *E. coli* y *S. Typhimurium* podrían de nuevo ser explicadas por dicho aspecto metodológico.

En su conjunto, los resultados obtenidos corroboran aportaciones previas sobre las diferencias entre el mecanismo de acción del timol y el cinamaldehído (Helander *et al.*, 1998; Gill y Holley, 2006). Con todo ello, y aunque son necesarios más estudios para dilucidar otros mecanismos que pueden estar también involucrados en su actividad, la información obtenida es de gran utilidad para la caracterización detallada de la actividad antimicrobiana de estos componentes de AEs.

### **4.3. ESTUDIO *in vitro* DEL EFECTO CITOTÓXICO DE UNA SELECCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y COMPONENTES DE ACEITES ESENCIALES**

Debido a que en la actualidad los AEs y AOs son considerados como aditivos naturales seguros para su administración en piensos, el interés por estudiar los efectos nocivos sobre el organismo diana ha sido relativamente limitado hasta la fecha. Sin embargo, se ha descrito su toxicidad sobre células epiteliales o incluso sobre el hígado, riñones y tejidos gastrointestinales de animales monogástricos (Sakurazawa y Ohkusa, 2005; Horky *et al.*, 2019). Por consiguiente y en concordancia con Horky *et al.* (2019), se deben llevar a cabo estudios *in vitro* que aborden aspectos relevantes de la citotoxicidad de este tipo de compuestos, determinando las concentraciones y tiempos de exposición a los que se presentan estos efectos o incluso sus mecanismos. Teniendo en cuenta esto, el efecto citotóxico asociado a dos AOs y a dos componentes de AEs con elevada actividad antimicrobiana ha sido objeto de estudio en este trabajo de Tesis Doctoral.

Los resultados obtenidos tras la exposición de células de la línea Vero (células epiteliales del riñón de mono verde africano) se muestran en la tercera publicación. Todos los compuestos evaluados indujeron apoptosis de forma dependiente a la concentración evaluada, con la única excepción de la sal sódica de ácidos grasos destilados de coco. Las concentraciones capaces de reducir el número de células viables al 50 % (CC<sub>50</sub>) fueron similares en esa línea celular y en dos líneas celulares porcinas de distintos linajes, la línea celular IPEC-J2, derivada de células de epitelio intestinal de yeyuno neonatal, y la línea IPI-21, procedente del epitelio intestinal de íleon de cerdo adulto (datos no incluidos). Concentraciones incluso inferiores a las obtenidas en nuestro trabajo han sido descritas como citotóxicas en trabajos previos para el ácido fórmico (437 ppm) frente a células Vero (Sakurazawa y Ohkusa, 2005), para el timol (22,5 ppm) frente a células esqueléticas musculares (Haeseler *et al.*, 2002) o para diferentes AEs (110 ppm y 215

ppm), entre los que se incluía el cinamaldehído como componente mayoritario frente a fibroblastos de pulmón (Houdkova *et al.*, 2018a; b). Al igual que ocurre frente a bacterias, entre los mecanismos de citotoxicidad se han incluido alteraciones en el gradiente electroquímico de las células en el caso de los AOs, así como daño en la membrana plasmática tras la exposición a AEs (Karuri *et al.*, 1993; Mehdizadeh y Moghaddam, 2018).

De acuerdo con otros autores (Tamargo *et al.*, 2015; Houdkova *et al.*, 2018a; Juretić *et al.*, 2020), podemos estimar la seguridad de un determinado compuesto a través de su índice terapéutico (IT), definido como la relación entre su concentración citotóxica y su concentración con actividad antibacteriana. Teniendo en cuenta esta información, los valores de IT calculados a partir de los resultados obtenidos en los ensayos frente a células Vero y frente a las especies bacterianas *E. coli*, *S. enterica* y *C. perfringens* (cociente  $CC_{50}/CMI_{50}$ ) demuestran que, en las condiciones de estudio, el ácido fórmico (valores de IT comprendidos entre 1,32 y 2,64) presenta un mejor perfil de seguridad que los AEs evaluados, con valores de IT significativamente bajos (rango comprendido entre 0,20 y 0,82). Por consiguiente, la exposición directa de células epiteliales a concentraciones con actividad antimicrobiana, principalmente de timol y cinamaldehído, puede conllevar un cierto riesgo toxicológico, propiciando por ejemplo el desarrollo de úlceras o complicaciones gastrointestinales, como ha sido señalado para otros compuestos con elevada citotoxicidad (Sakurazawa y Ohkusa, 2005).

En este sentido, los resultados alcanzados en el presente trabajo demuestran la necesidad señalada previamente por otros autores de desarrollar estrategias que permitan aumentar el abanico de concentraciones en las que este tipo de compuestos presentan actividad sin causar efectos adversos hacia el hospedador diana (Omonijo *et al.*, 2018; Horky *et al.*, 2019). Entre las estrategias existentes que permiten una optimización de la dosis requerida tanto de AEs como AOs destacan las orientadas a formular emulsiones, sistemas isotrópicos, termodinámicamente estables y transparentes o translúcidos del compuesto activo, agua y sustancias tensioactivas (Solans *et al.*, 2005). En detalle, microemulsiones y nanoemulsiones con un tamaño de comprendido entre 10 y 100 nm, constituyen uno de los sistemas más atractivos de encapsulación y administración de este tipo de compuestos debido a su estabilidad a largo plazo, así como a su fácil preparación (Franklyne *et al.*, 2016). Además de incrementar la solubilidad de los compuestos de interés, generalmente insolubles en agua, ambos tipos de estructuras micelares permiten

su liberación gradual y dirigida en el tracto gastrointestinal y, por consiguiente, disminuir el riesgo de irritación intestinal que conlleva su administración (Pouton, 1985; Fahr y Liu, 2007; Franklyne *et al.*, 2016; Horky *et al.*, 2019).

### **4.4. ESTUDIO *in vitro* DEL EFECTO VIRICIDA DE UNA SELECCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y COMPONENTES DE ACEITES ESENCIALES FRENTE AL VIRUS DE LA DIARREA EPIDÉMICA PORCINA**

En el ámbito específico del ganado porcino, la DEP constituye una de las principales enfermedades víricas del tracto digestivo, junto con las infecciones por rotavirus y la gastroenteritis transmisible porcina. Para ninguna de estas infecciones víricas entéricas existen tratamientos etiológicos específicos (Jung *et al.*, 2020). En los años más recientes, la DEP ha adquirido un enorme interés debido a su emergencia y re-emergencia a nivel mundial, lo que ha favorecido la búsqueda de tratamientos alternativos eficaces entre los que se incluyen algunos compuestos naturales (Lee *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018b).

Esta enfermedad altamente contagiosa afecta a cerdos de cualquier edad, aunque es particularmente grave en los lechones de menos de 1-2 semanas de edad, entre los que puede producir mortalidades de hasta el 90-100 %. Cursa con una diarrea acuosa, de color amarillo-verdoso y con una duración que oscila entre 7 y 10 días (Carvajal *et al.*, 2015). El agente etiológico es el VDEP que corresponde a un coronavirus constituido por una nucleocápside de simetría helicoidal, envoltura lipídica y un genoma formado por una única cadena de ARN con polaridad positiva (Sekhon *et al.*, 2016).

La principal herramienta para el control de la DEP es la bioseguridad externa de las explotaciones que debe minimizar los riesgos de entrada del patógeno. Tras la entrada de la enfermedad, podemos llevar a cabo un tratamiento sintomático con medidas orientadas a minimizar los efectos del cuadro de diarrea, favoreciendo la rehidratación y restringiendo la ingesta de alimentos (de Arriba Martín, 2000). La exposición de toda la población al virus, fundamentalmente de las cerdas gestantes, a través de una estrategia *feedback* es de gran importancia, minimizando el impacto en lechones y limitando en el tiempo las cadenas de transmisión. A través de la exposición al material infeccioso, intestinos o heces, proveniente de animales con cuadros clínicos agudos, dicha estrategia se centra en promover la inmunidad en las cerdas de manera que pueda ser transferida a

los lechones mediante el calostro y la leche. Aunque su eficacia está realmente contrastada, este manejo no está exento de riesgos y puede favorecer la diseminación en las explotaciones de otros patógenos, tanto bacterianos como víricos, con consecuencias claramente negativas para la producción (Allepuz y Casal, 2014; Weng *et al.*, 2016).

Finalmente, la inmunidad también puede ser adquirida a través de programas de vacunación en aquellos países donde están disponibles vacunas comerciales (De Arriba *et al.*, 2002). Sin embargo, la eficacia de estas vacunas en condiciones de campo suele clasificarse como moderada o baja debido posiblemente a las diferencias antigénicas y genéticas existentes entre las cepas utilizadas para el desarrollo de las vacunas y las cepas circulantes (Lin *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2018). Actualmente, las vacunas comerciales disponibles frente a VDEP se basan en la incorporación de virus vivos atenuados o de virus inactivos o muertos. Generar nuevas vacunas con las cepas prevalentes en una determinada área geográfica o en un momento temporal no parece ser una solución viable desde el punto de vista clínico (Kim *et al.*, 2016; Gerdtts y Zakhartchouk, 2017). Al respecto, en esta y en otras infecciones víricas cobra especial sentido el desarrollo de vacunas de nueva generación, con un proceso de desarrollo y producción a gran escala más simple y rápido (Jorge y Dellagostin, 2017; Gerdtts y Zakhartchouk, 2017; van Riel y de Wit, 2020).

Teniendo en cuenta esta situación, la identificación de nuevos tratamientos con actividad antiviral que permitan minimizar las manifestaciones clínicas de la DEP es prioritaria. En este sentido, compuestos naturales con reconocida actividad frente a bacterias patógenas relevantes y de fácil administración pueden ser de gran interés (Balta *et al.*, 2020). En la presente Tesis Doctoral se ha evaluado la actividad viricida frente al VDEP de los AOs y componentes de AEs con mayor actividad antibacteriana.

Este estudio se llevó a cabo con la cepa CV777 del VDEP y estuvo fuertemente condicionado por la significativa citotoxicidad mostrada por la mayoría de los compuestos. A este respecto, el hecho de no poder incrementar el rango de concentraciones a evaluar imposibilitó la estimación del índice de selectividad (IS) específico de cada compuesto. Dicho valor obtenido a partir de la relación  $CC_{50}/CE_{50}$  (concentración requerida de un determinado compuesto para inhibir el efecto citopático inducido por VDEP en un 50 %) ha sido ampliamente utilizado en estudios similares y constituye uno de los mejores parámetros para la evaluación de la actividad antiviral



#### 4. Discusión

---

potencial de un determinado compuesto de interés (Choi *et al.*, 2009; Pritchett *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015). No obstante, los resultados alcanzados en el presente trabajo demuestran que el ácido fórmico a una concentración de 1.200 ppm presenta actividad frente al VDEP, especialmente sobre la síntesis del ácido ribonucleico o ARN viral. Además, dicha actividad ha sido demostrada para unos índices de multiplicidad de infección (MOI) o número de partículas virales infectivas por célula relativamente altos en comparación a los de estudios previos (Li *et al.*, 2018b).

Consecuentemente, la actividad antiviral *in vitro* presentada por este ácido podría tenerse en cuenta en el desarrollo de nuevas estrategias para combatir la DEP de forma similar a lo propuesto para un compuesto natural derivado de la planta *Eupatorium chinense* (Wang *et al.*, 2016), con un valor de IS relativamente bajo en comparación a otros compuestos fitobióticos (Choi *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2015), o para el cloruro de litio (Li *et al.*, 2018b).

Además, el hecho de que el ácido fórmico pueda comprometer el éxito de las infecciones inducidas en cerdas mediante la exposición a material infeccioso debe ser tenido en cuenta. En base a nuestros resultados, la presencia de ácido fórmico en la dieta o el agua de bebida podría hacer fracasar las estrategias de *feedback*, ampliamente utilizadas en las explotaciones infectadas por VDEP (Weng *et al.*, 2016; Jung *et al.*, 2020).

Finalmente, los resultados obtenidos para el resto de compuestos evaluados confirman su falta de actividad frente a VDEP, observándose únicamente un débil efecto de la sal sódica de ácidos grasos destilados de coco y del cinamaldehído sobre la formación de nuevas partículas vírales infectivas. Dichos resultados discrepan con los publicados previamente por otros autores que determinaron un efecto inhibitorio del ácido láurico, el principal componente de la sal sódica estudiada, sobre el arenovirus Junín (Bartolotta *et al.*, 2001), así como de diferentes AEs, entre los que se incluía el timol, sobre el virus del herpes simples tipo 1 (Astani *et al.*, 2010).

#### **4.5. ESTUDIO *in vitro* Y EN CONDICIONES DE CAMPO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE DESINFECTANTES COMERCIALES FRENTE A *B. hyodysenteriae***

La aplicación de protocolos de limpieza y desinfección en las granjas de cerdos juega un papel relevante en el control de patógenos, limitando o incluso previniendo la transmisión entre lotes de animales. En esta Tesis Doctoral hemos incluido un capítulo relativo a la eficacia de desinfectantes y de protocolos de limpieza y desinfección de granjas, utilizando como modelo la disentería porcina, una de las enfermedades más relevantes del ganado porcino en la actualidad durante la fase final de engorde. El agente etiológico de esta enfermedad entérica caracterizada por una colitis muco-hemorrágica son espiroquetas fuertemente hemolíticas del género *Brachyspira*, destacando particularmente en nuestro ámbito *B. hyodysenteriae* (Paster y Dewhirst, 2000; Hartnack *et al.*, 2014; Nathues *et al.*, 2015; Burrough, 2017).

En cuanto a los signos clínicos, los cerdos afectados muestran diarrea muco-hemorrágica de moderada a grave, deshidratación, acidosis metabólica e hipercalcemia, pérdida de peso e incluso la muerte asociada a la presencia de lesiones en el intestino grueso (Burrough, 2017). No obstante, existen múltiples factores que influyen en la manifestación y persistencia de dichos signos clínicos como pueden ser la edad, el estrés, el tipo de dieta, las condiciones de hacinamiento o la dosis infectiva y la virulencia de la cepa implicada (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2013).

El tratamiento y control de la disentería porcina implica, principalmente, el uso de antibióticos ya que no existen vacunas comerciales y la inmunoprofilaxis queda limitada al empleo de autovacunas (Carvajal *et al.*, 2006; Hidalgo *et al.*, 2011; Rugna *et al.*, 2015; Burrough, 2017). Cambios en la dieta, particularmente la incorporación de carbohidratos altamente fermentables así como de aditivos alimentarios, como los AOs y AEs, son otras medidas que pueden ayudar en el control de esta enfermedad (Hansen *et al.*, 2010; Vande Maele *et al.*, 2016).

Aunque estas medidas permiten reducir o prevenir los signos clínicos, generalmente no suelen ser suficientes para erradicar la enfermedad (Neiryneck *et al.*, 2020). En este marco, el limitado número de antibióticos con indicación para el tratamiento de la disentería porcina, la emergencia de aislados de *B. hyodysenteriae* resistentes a los

#### 4. Discusión

---

mismos y la implementación de incorrectas pautas de bioseguridad están entre las principales razones que explican el incremento del diagnóstico de esta enfermedad durante los últimos años en Norteamérica (Burrough, 2017), así como en Europa y España (Díez, 2019).

Entre las medidas inadecuadas de bioseguridad que pueden jugar un papel fundamental en el establecimiento y la transmisión de la disentería porcina destacan la ausencia de pediluvios/rodaluvios para la desinfección de vehículos y botas del personal en las entradas de las granjas y de las naves, la inexistencia de barreras físicas que impidan la entrada o el contacto con animales silvestres infectados como jabalíes o aves, fundamentalmente anátidas consideradas como un auténtico reservorio de espiroquetas intestinales, con vectores como roedores, ratas y ratones, o con incluso con cucarachas y otros insectos, así como el inadecuado control sobre las entradas de cerdos o de camiones de transporte en las explotaciones (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2013; Zeeh *et al.*, 2020).

En este sentido, es importante destacar que *B. hyodysenteriae* puede sobrevivir durante largos periodos de tiempo en ambientes y materiales que hayan podido estar en contacto con heces que incluyan este patógeno (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2013). En detalle, se ha comprobado que *B. hyodysenteriae* puede sobrevivir en heces húmedas durante 48 días en un rango de temperaturas comprendido entre los 0°C y 10°C, ambos inclusive, 7 días a 25°C y menos de 24 h a 37°C (Chia y Taylor, 1978). Así pues, la falta de limpieza y desinfección de las instalaciones, equipamiento, vehículos de transporte, ropa y calzado de trabajo o incluso de los propios animales tiene relevancia en la transmisión y el mantenimiento de la enfermedad (Lobova y Cizek, 2004).

Teniendo en cuenta la importancia de implementar estrictos protocolos de limpieza y desinfección para el control de la disentería porcina y ante el incremento de casos previamente citado, hemos decidido incluir un capítulo en la presente Tesis Doctoral que aborda la sensibilidad de aislados de campo de *B. hyodysenteriae* a distintos desinfectantes. En este sentido, el número de trabajos experimentales existentes en la actualidad es realmente insignificante (Lobova y Cizek, 2004), hecho que probablemente es consecuencia de la dificultad que conlleva el cultivo y manejo de este patógeno fastidioso en condiciones de laboratorio (Vande Maele *et al.*, 2016). En consonancia con lo mencionado en varios trabajos centrados en otros microorganismos patógenos relevantes en veterinaria (Mannion *et al.*, 2007; Chandler-Bostock y Mellits, 2015), el

estudio de la eficacia de los protocolos rutinarios de limpieza y desinfección sobre *B. hyodysenteriae* en granjas comerciales de cerdos es de gran importancia, permitiendo identificar los aspectos críticos para la prevalencia y transmisión de la disentería porcina. Así, en segundo lugar y en condiciones de campo, hemos evaluado los protocolos de limpieza y desinfección de corrales tras el vaciado de los animales en granjas con disentería porcina.

En lo que respecta al estudio llevado a cabo bajo condiciones de laboratorio, debemos destacar que los aislados empleados se recuperaron de muestras de heces de cerdos afectados por disentería en diferentes granjas de la región de Castilla y León entre el año 2018 y 2019. Los resultados obtenidos a partir de los antibiogramas realizados mediante el método de microdilución en caldo descrito por Karlsson *et al.* (2003) con las placas comerciales VetMIC Brachy (ver.2) de SVA (Statens Veterinärmedicinska Anstalt, Suecia) demostraron una baja sensibilidad de los aislados a los antibióticos de diferentes familias. En detalle, estas placas comerciales incluyen los principales antibióticos con indicación para el tratamiento de la disentería porcina como son la tiamulina y la valnemulina (antibióticos pertenecientes a la familia de las pleuromutilinas), la tilvalosina (macrólidos), así como la lincomicina (lincosamidas). En concordancia con estudios previos sobre resistencia antimicrobiana de este patógeno en nuestro país (Hidalgo *et al.*, 2011), así como en otros países con una producción porcina relevante (Karlsson *et al.*, 2003a; Lobová *et al.*, 2004; Šperling *et al.*, 2011; Rugna *et al.*, 2015; Kirchgässner *et al.*, 2016; Mirajkar *et al.*, 2016; Joerling *et al.*, 2018; Massacci *et al.*, 2018), la mayoría de los aislados incluidos en nuestro estudio fueron resistentes o mostraron sensibilidad reducida a estos antibióticos. La alta prevalencia de aislados resistentes justifica encarecidamente la búsqueda de alternativas a la antibioterapia para el control de esta enfermedad.

A diferencia de otros trabajos en los que la eficacia de agentes desinfectantes se evalúa a través de la determinación de la CMI y/o la CMB empleando técnicas de dilución en caldo (Maertens *et al.*, 2019) o en agar (Aarestrup y Hasman, 2004), la evaluación de los diferentes desinfectantes comerciales incluidos en el presente trabajo se realizó de acuerdo a la Norma Europea EN 1656:2009. Esta norma, aplicable a productos desinfectantes y antisépticos utilizados en el área veterinaria, especifica un ensayo cuantitativo de suspensión que permite determinar si los desinfectantes diluidos en agua dura (con alto nivel de minerales disueltos, en particular, sales de magnesio y calcio) a la

#### 4. Discusión

---

concentración recomendada por sus fabricantes presentan actividad bactericida bajo condiciones estandarizadas. Dichas condiciones se establecen teniendo en cuenta múltiples factores que pueden influir sobre la acción de los desinfectantes en situaciones prácticas, como el tiempo de contacto, la temperatura o las sustancias interfirientes. Por consiguiente, permite que los resultados alcanzados por distintos productos o en diferentes laboratorios puedan ser comparados.

La mayoría de los desinfectantes evaluados cumplió los requisitos establecidos por la norma frente a todos los aislados de *B. hyodysenteriae* valorados, demostrando una reducción de al menos cinco unidades logarítmicas de los recuentos de unidades formadoras de colonias o UFC por ml tras la exposición durante 30 min a 10°C en presencia de heces estériles, simulando condiciones de alto nivel de suciedad. En este sentido, nuestros resultados parecen corroborar la eficacia teórica de este tipo de productos comerciales en la desinfección tanto de superficies de instalaciones como de herramientas y equipos, incluso aunque estén recubiertos de materia orgánica (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2013).

Sin embargo, en el caso específico del Virkon-S, un desinfectante a base de peroxígenos, y de Limoseptic, a base de compuestos aldehídicos y amonios, no se alcanzó este nivel de reducción frente a algunos de los aislados. Un estudio previo mencionó la influencia de la materia orgánica sobre actividad del Virkon-S frente a *B. pilosiloci* (Corona-Barrera *et al.*, 2004). No obstante, cabe destacar que el Limoseptic frente al único aislado con menor sensibilidad y el Virkon-S frente a uno de los tres aislados con cierta resistencia, consiguieron reducir en más de tres logaritmos los recuentos, un valor que ha sido asociado con una actividad bactericida aceptable por algunos autores (Gutiérrez *et al.*, 1995; Zadrazilova *et al.*, 2015).

Cabe destacar el hecho de que dos de los cuatro aislados previamente indicados, cuya viabilidad fue menos afectada por la actividad de los desinfectantes, también presentaron un perfil resistente a los antibióticos muy similar, con elevados valores de CMI. En este sentido, se ha descrito tolerancia cruzada a ambos tipos de agentes antimicrobianos, específicamente en bacterias Gram negativas (Lambert *et al.*, 2001a; Murtough *et al.*, 2001; Braoudaki y Hilton, 2004; Condell *et al.*, 2012). Dicha tolerancia podría estar explicada, por ejemplo, por una reducción de la permeabilidad celular o por la presencia de un sistema de eflujo que evite la entrada o la acumulación de diferentes compuestos

químicamente no relacionados en las bacterias resistentes (Tattawasart *et al.*, 1999). Sin embargo, la ausencia de correlación entre la resistencia a los antibióticos y a los desinfectantes ha sido el resultado obtenido en numerosos trabajos llevados a cabo con aislados de diferentes géneros bacterianos recuperados tanto de granjas de cerdos y pollos (Gantzhorn *et al.*, 2014; Maertens *et al.*, 2019), como del ambiente hospitalario (Herruzo *et al.*, 2015). Por todo ello, son necesarios más estudios que incluyan un mayor número de aislados con diferente perfil de resistencia a diferentes agentes antimicrobianos, así como a desinfectantes, para poder abordar con mayor profundidad el estudio de esta resistencia cruzada.

Respecto al estudio llevado a cabo en condiciones de campo, el elevado número de corrales en los que se detectó *B. hyodysenteriae* en concentraciones relevantes por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR tras el vaciado pone de manifiesto la importancia de los protocolos de limpieza y desinfección para evitar la transmisión de este patógeno entre lotes. De acuerdo con esto, un trabajo recientemente publicado centrado en la evaluación de diferentes programas de erradicación de *B. hyodysenteriae* en granjas con disentería porcina endémica describió resultados exitosos únicamente en aquellas granjas en las que se implementaron unos exhaustivos protocolos de limpieza y desinfección (Neiryneck *et al.*, 2020).

En el presente estudio, detectamos *B. hyodysenteriae* en muestras recogidas tras haber aplicado los protocolos de higiene de las instalaciones. Teniendo en cuenta la elevada eficacia demostrada *in vitro* por los desinfectantes frente a la mayor parte de los aislados de *B. hyodysenteriae* y ante la presencia de elevada materia orgánica en dichas muestras, la falta de eficacia observada podría ser consecuencia de una inadecuada aplicación de los protocolos de limpieza y desinfección (limpieza inadecuada, uso incorrecto de los agentes desinfectantes, tiempo de secado insuficiente, etc.). De acuerdo a Davidson y Harrison (2002), la presencia de materia orgánica o de agua de aclarado junto con el uso de desinfectantes subdosificados permite que las bacterias se expongan a concentraciones inferiores a las efectivas, favoreciendo la selección de aislados con una sensibilidad reducida. En este sentido, un número significativo de estudios llevados a cabo en condiciones de laboratorio han demostrado que bacterias con perfil sensible pueden desarrollar, tras la exposición gradual a concentraciones subinhibitorias de diferentes desinfectantes, una mayor tolerancia a estos agentes, así como a múltiples antibióticos

#### 4. Discusión

---

(Davidson y Harrison, 2002; Braoudaki y Hilton, 2004; Randall *et al.*, 2004; Karatzas *et al.*, 2007; Webber *et al.*, 2015).

Como ha sido indicado anteriormente, el incremento de poblaciones bacterianas con perfil resistente a los desinfectantes, adquirido a través de adaptación fenotípica, mutaciones y transferencia genética horizontal (Cloete, 2003) constituye una amenaza para la salud animal y humana (Tong *et al.*, 2021). Por consiguiente y ante los resultados alcanzados en el presente estudio tanto en condiciones de campo como *in vitro*, se recomienda que los protocolos de limpieza y desinfección de las granjas sean evaluados con cierta periodicidad con el doble objetivo de crear conciencia sobre las debilidades o fallos de estos procesos y mejorar su eficacia. Con ello, podemos mitigar el riesgo de transmisión de microorganismos patógenos como *B. hyodysenteriae* entre lotes sucesivos de animales, así como la presión selectiva ejercida por los desinfectantes sobre distintas bacterias ambientales.

## 5. CONCLUSIONES

---

A partir de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

### **Conclusión primera**

La mayoría de los ácidos orgánicos (AOs), aceites esenciales (AEs) o componentes de AEs evaluados en condiciones *in vitro* muestran una actividad antibacteriana concentración-dependiente frente a bacterias de las especies *E. coli*, *S. enterica* y *C. perfringens*. Los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) pueden ser de gran utilidad a la hora de determinar la dosis de administración adecuada para el control de infecciones por estos patógenos entéricos.

### **Conclusión segunda**

A pesar de que el mecanismo de acción de los AEs no esté completamente dilucidado, hemos podido demostrar que la principal diana celular del timol frente a *E. coli*, *S. enterica* y *C. perfringens* corresponde a la pared celular, mostrando alteraciones significativas en grupos funcionales de carbohidratos y polisacáridos, incremento de su permeabilidad, así como cambios en su estructura y morfología tras la exposición a diferentes concentraciones. Por el contrario, el mecanismo de acción del cinamaldehído parece diferir entre bacterias Gram positivas y Gram negativas, observándose alteraciones principalmente en proteínas, ácidos grasos y compuestos con grupos fosfatos en los aislados de *C. perfringens* y daño en la pared celular frente a *E. coli* y *S. enterica*, pero sin comprometer significativamente su permeabilidad, estructura y morfología.

### **Conclusión tercera**

Tanto el ácido fórmico como los dos componentes de AEs evaluados, timol y cinamaldehído, presentaron efecto citotóxico a concentraciones bactericidas, lo que pone de manifiesto la necesidad de estudiar y desarrollar estrategias que permitan optimizar las dosis requeridas, así como evitar la exposición directa de la pared gastrointestinal a concentraciones elevadas de dichos compuestos con el fin de disminuir el riesgo toxicológico.



## 5. Conclusiones

---

### Conclusión cuarta

A diferencia de la sal sódica de ácidos grasos destilados de coco, el timol y el cinamaldehído, el ácido fórmico a una concentración de 1.200 ppm tuvo un efecto inhibitorio sobre la replicación de la cepa CV777 del VDEP en células de la línea Vero. Son necesarios más estudios para conocer con mayor detalle el potencial de dicho ácido en el control de la DEP, así como si su uso en granja puede afectar a medidas rutinarias en el control de esta enfermedad como las infecciones inducidas en cerdas para promover la inmunidad de los lechones lactantes o sistemas de *feedback*.

### Conclusión quinta

La evaluación de ocho desinfectantes comerciales frente a una batería de aislados de campo de *B. hyodysenteriae* demostró en un ensayo *in vitro* la eficacia de estos productos frente a dicho patógeno, eliminando por completo la presencia de bacterias viables en la gran mayoría de los casos. Este resultado contrasta con la permanencia de *B. hyodysenteriae* en el ambiente de las granjas tras la limpieza y desinfección demostrada en el estudio realizado en condiciones de campo, hecho que refleja la ineficacia de los protocolos de limpieza y desinfección aplicados y la necesidad de mejorar y monitorizar la eficacia de los mismos.

---

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---

Aarestrup FM 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* 370, 20140085.

Aarestrup F y Hasman H 2004. Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. *Veterinary microbiology* 100, 83-89.

Agüeria D, Libonatti C y Civit D 2021. Cleaning and disinfection programmes in food establishments: a literature review on verification procedures. *Journal of applied microbiology* 131, 23-35.

de Aguiar FC, Solarte AL, Tarradas C, Luque I, Maldonado A, Galán-Relaño Á y Huerta B 2018. Antimicrobial activity of selected essential oils against *Streptococcus suis* isolated from pigs. *MicrobiologyOpen* 7, e00613.

Ahmed S, Hwang J, Hoon J, Mun H y Yang C 2014. Comparison of single and blend acidifiers as alternative to antibiotics on growth performance, fecal microflora, and humoral immunity in weaned piglets. *Asian-Australasian journal of animal sciences* 27, 93-100.

Akbas MY y Ölmez H 2007. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. *Letters in Applied Microbiology* 44, 619-624.

Al-Sadi R, Boivin M y Ma T 2009. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 14, 2765.

Alarcón LV, Allepuz A y Mateu E 2021. Biosecurity in pig farms: a review. *Porcine Health Management* 2021 7:1 7, 1-15.

Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J y Handelsman J 2010. Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology* 8, 251-259.

Allepuz A y Casal J 2014. Protocolo de bioseguridad para la diarrea epidémica porcina. Accedido 2 de noviembre de 2021, a partir de [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/protocolodebioseguridaddep\\_tcm30-111893.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/protocolodebioseguridaddep_tcm30-111893.pdf)

Álvarez-Ordóñez A, Carvajal A, Arguello H, Martínez-Lobo FJ, Naharro G y Rubio P 2013. Antibacterial activity and mode of action of a commercial citrus fruit extract. *Journal of Applied Microbiology* 115, 50-60.

Alvarez-Ordóñez A, Martínez-Lobo FJ, Arguello H, Carvajal A y Rubio P 2013. Swine dysentery: Aetiology, pathogenicity, determinants of transmission and the fight against the disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10, 1927-1947.

Amalaradjou M y Venkitanarayanan K 2011. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of trans-cinnamaldehyde against *Cronobacter sakazakii* 415. *Foodborne pathogens and disease* 8, 1095-1102.

Anzaku AA, Akyala JI y Juliet A 2017. Antibacterial activity of lauric acid on some selected clinical isolates. *Antibacterial Activity of lauric acid on some selected clinical isolates. Annals of Clinical and Laboratory Research* 5, 2.

Argudín MA, Deplano A, Meghraoui A, Dodémont M, Heinrichs A, Denis O, Nonhoff C y Roisin S 2017. Bacteria from animals as a pool of antimicrobial resistance genes. *Antibiotics* 6, 12.

Argüello H, Carvajal A, Osorio J, Martín D y Rubio P 2010. Evaluation of a commercial acid mixture administered in drinking water as a control measure in swine salmonellosis. En *Proceedings of International Symposium Salmonella and Salmonellosis*, pp. 455-466. Saint Malo, France.

Arguello H, Rubio P y Carvajal A 2012. *Salmonella* control measures at farm in swine production. En *Salmonella-Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies* (eds. B. Annous y J. Gurtler), pp. 99-122. IntechOpen.

De Arriba ML, Carvajal A, Pozo J y Rubio P 2002. Mucosal and systemic isotype-specific antibody responses and protection in conventional pigs exposed to virulent or attenuated porcine epidemic diarrhoea virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 85, 85-97.

## 6. Bibliografía

---

- de Arriba Martín ML 2000. Inmunidad inducida por las variantes virulenta y atenuada de la cepa CV-777 del virus de la diarrea epidémica porcina. Universidad de León, pp. 20-21.
- Astani A, Reichling J y Schnitzler P 2010. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. *Phytotherapy Research* 24, 673-679.
- El Baaboua A, El Maadoudi M, Bouyahya A, Belmehdi O, Kounoun A, Zahli R y Abrini J 2018. Evaluation of antimicrobial activity of four organic acids used in chicks feed to control *Salmonella* Typhimurium: Suggestion of Amendment in the Search Standard. *International Journal of Microbiology* 2018, 7352593.
- Babaei MR, Sulong A, Hamat RA, Nordin SA y Neela VK 2015. Extremely high prevalence of antiseptic resistant Quaternary Ammonium Compound E gene among clinical isolates of multiple drug resistant *Acinetobacter baumannii* in Malaysia. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 14, 1-5.
- Baird BE 2004. Decontamination of Sites & Carcasses. En *Carcass Disposal: A Comprehensive Review*. National Agricultural Biosecurity Center Consortium, pp. 49-51. USDA APHIS Cooperative Agreement Project.
- Balouiri M, Sadiki M y Ibsouda SK 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6, 71-79.
- Balta I, Stef L, Pet I, Ward P, Callaway T, Ricke SC, Gundogdu O y Corcionivoschi N 2020. Antiviral activity of a novel mixture of natural antimicrobials, *in vitro*, and in a chicken infection model *in vivo*. *Scientific Reports* 10, 1-10.
- Barko PC, McMichael MA, Swanson KS y Williams DA 2017. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 45, 9-25.
- Barnes PJ y Karin M 1997. Nuclear Factor- $\kappa$ B-a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *The New England Journal of Medicine* 336, 1066-1071.
- Barrette W, Hannum D, Wheeler W y Hurst J 1989. General mechanism for the bacterial toxicity of hypochlorous acid: abolition of ATP production. *Biochemistry* 28, 9172-9178.
- Bartolotta S, García C, Candurra NA y Damonte E 2001. Effect of fatty acids on arenavirus replication: Inhibition of virus production by lauric acid. *Archives of Virology* 146, 777-790.
- Batiha GE-S, Alkazmi LM, Wasef LG, Beshbishy AM, Nadwa EH y Rashwan EK 2020. *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, Pharmacological and Toxicological Activities. *Biomolecules* 10, 202.
- Van Den Berg B 2005. The FadL family: Unusual transporters for unusual substrates. *Current Opinion in Structural Biology* 15, 401-407.
- Block SS 1991. Peroxygen compounds. En *Disinfection, sterilization, and preservation* (ed. S. Block), pp. 167-181. Lea & Febiger.
- Van Boeckel TP, Glennon EE, Chen D, Gilbert M, Robinson TP, Grenfell BT, Levin SA, Bonhoeffer S y Laxminarayan R 2017. Reducing antimicrobial use in food animals. *Science* 357, 1350-1352.
- Boling SD, Weibel DM, Mavromichalis I, Parsons CM y Baker DH 2000. The effects of citric acid on phyate-phosphorus utilization in young chicks and pigs. *Journal of Animal Science* 78, 682-689.
- Boyen F, Haesebrouck F, Maes D, Van Immerseel F, Ducatelle R y Pasmans F 2008a. Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: A closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Veterinary Microbiology* 130, 1-19.
- Boyen F, Haesebrouck F, Vanparys A, Volf J, Mahu M, Van Immerseel F, Rychlik I, Dewulf J, Ducatelle R y Pasmans F 2008b. Coated fatty acids alter virulence properties of *Salmonella* Typhimurium and decrease intestinal colonization of pigs. *Veterinary microbiology* 132, 319-327.
- Bragg RR, Meyburgh CM, Lee JY y Coetzee M 2018. Potential treatment options in a post-antibiotic era. En *Advances in Experimental Medicine and Biology* (eds. R. Adhikari y S. Thapa), pp. 51-61. Springer.
- Braoudaki M y Hilton AC 2004. Adaptive Resistance to Biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and Cross-Resistance to Antimicrobial Agents. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 73-78.

- Braoudaki M y Hilton AC 2005. Mechanisms of resistance in *Salmonella enterica* adapted to erythromycin, benzalkonium chloride and triclosan. *International Journal of Antimicrobial Agents* 25, 31-37.
- Brenes A y Roura E 2010. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology* 158, 1-14.
- De Briyne N, Atkinson J, Pokludová L, Borriello SP y Price S 2013. Factors influencing antibiotic prescribing habits and use of sensitivity testing amongst veterinarians in Europe. *Veterinary Record* 173, 475.
- Brookes V, Hernández-Jover M, Holyoake P y Ward M 2015. Industry opinion on the likely routes of introduction of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome into Australia from south-east Asia. *Australian Veterinary Journal* 93, 13-19.
- Brown M y Gilbert P 1993. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *The Journal of Applied Bacteriology* 74 Suppl, 87S-97S.
- Bruneton J 1999. *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants* (ed. Intercept). Lavoisier.
- Bureš F 2019. Quaternary ammonium compounds: Simple in structure, complex in application. *Topics in Current Chemistry (Cham)* 377, 14.
- Burrough ER 2017. Swine Dysentery: Etiopathogenesis and diagnosis of a reemerging disease. *Veterinary Pathology* 54, 22-31.
- Burt S 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223-253.
- Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA y Ricke SC 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control* 54, 111-119.
- Carr J 2006. The maintenance of health. En *Whittenmore's Science and Practice of Pig Production* (eds. I. Kyriazakis y C.T. Whittemore), pp. 263-315. Blackwell.
- Carson CF y Hammer KA 2010. Chemistry and bioactivity of essential oils. En *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents* (ed. H. Thormar), pp. 203-238. John Wiley & Sons, Ltd.
- Carvajal A, Argüello H, Martínez-Lobo FJ, Costillas S, Miranda R, de Nova PJG y Rubio P 2015. Porcine epidemic diarrhoea: New insights into an old disease. *Porcine Health Management* 1, 12.
- Carvajal A, de Arriba ML, Rodríguez H, Vidal AB, Duhamel GE, Rubio P, Vidal AB, Duhamel GE y Rubio P 2006. Prevalence of *Brachyspira* species in pigs with diarrhoea in Spain. *Veterinary Record* 158, 700-701.
- Casal J, De Manuel A, Mateu E y Martín M 2007. Biosecurity measures on swine farms in Spain: Perceptions by farmers and their relationship to current on-farm measures. *Preventive Veterinary Medicine* 82, 138-150.
- Castillo M, Martín-Orúe SM, Roca M, Manzanilla EG, Badiola I, Perez JF y Gasa J 2006. The response of gastrointestinal microbiota to avilamycin, butyrate, and plant extracts in early-weaned pigs. *Journal of Animal Science* 84, 2725-2734.
- Cha J, Moon S, Kim H, Lee J y Lee K 2009. The essential oil isolated from *Artemisia capillaris* prevents LPS-induced production of NO and PGE(2) by inhibiting MAPK-mediated pathways in RAW 264.7 macrophages. *Immunological Investigations* 38, 483-497.
- Chan BK, Abedon ST y Loc-Carrillo C 2013. Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiology* 8, 769-783.
- Chandler-Bostock R y Mellits KH 2015. Efficacy of disinfectants against porcine rotavirus in the presence and absence of organic matter. *Letters in Applied Microbiology* 61, 538-543.
- Chauhan AK y Kang SC 2014. Thymol disrupts the membrane integrity of *Salmonella* ser. typhimurium *in vitro* and recovers infected macrophages from oxidative stress in an *ex vivo* model. *Research in Microbiology* 165, 559-565.
- Chauret CP 2014. Sanitization. En *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, (eds. C. Batt y P. Patel), pp. 360-364. Academic Press.

## 6. Bibliografía

---

- Cheney J y Collins C 1995. Formaldehyde disinfection in laboratories: limitations and hazards. *British Journal of Biomedical Science* 52, 195-201.
- Cheng G, Hao H, Xie S, Wang X, Dai M, Huang L y Yuan Z 2014. Antibiotic alternatives: The substitution of antibiotics in animal husbandry? *Frontiers in Microbiology* 5, 217.
- Chia SP y Taylor DJ 1978. Factors affecting the survival of *Treponema hyodysenteriae* in dysenteric pig faeces. *The Veterinary record* 103, 68-70.
- Cho JH;Chen. YJ;Min. BJ;Kim. HJ ;Kwon. OS ;Shon. KS ;Kim. IH ;Kim. SJ;Asamer. A. 2006. Effects of essential oils supplementation on growth performance, IgG concentration and fecal noxious gas concentration of weaned pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 19, 80-85.
- Choi HJ 2018. Chemical constituents of essential oils possessing anti-influenza A/WS/33 virus activity. *Osong Public Health and Research Perspectives* 9, 348-353.
- Choi HJ, Kim JH, Lee CH, Ahn YJ, Song JH, Baek SH y Kwon DH 2009. Antiviral activity of quercetin 7-rhamnoside against porcine epidemic diarrhea virus. *Antiviral Research* 81, 77-81.
- Chouhan S, Sharma K y Guleria S 2017. Medicines antimicrobial activity of some essential oils-Present Status and future perspectives. *Medicines* 4, 58.
- Clark DP y Cronan JE 2005. Two-Carbon Compounds and Fatty Acids as Carbon Sources. *EcoSal Plus* 1.
- Cloete TE 2003. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation* 51, 277-282.
- Condell O, Iversen C, Cooney S, Power KA, Walsh C, Burgess C y Fanning S 2012. Efficacy of biocides used in the modern food industry to control *Salmonella enterica*, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 3087-3097.
- Corner T, Joswick H, Silvernale J y Gerhardt P 1971. Antimicrobial actions of hexachlorophene: lysis and fixation of bacterial protoplasts. *Journal of Bacteriology* 108, 501-507.
- Corona-Barrera E, Smith DGE, Murray B y Thomson JR 2004. Efficacy of seven disinfectant sanitisers on field isolates of *Brachyspira pilosicoli*. *Veterinary Record* 154, 473-474.
- Cortés-Rojas D, de Souza C y Oliveira W 2014. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4, 90-96.
- Cosentino S, Tuberoso C, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E y Palmas F 1999. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 29, 130-135.
- Costa A, Colosio C, Gusmara C, Sala V y Guarino M 2014. Effects of disinfectant fogging procedure on dust, ammonia concentration, aerobic bacteria and fungal spores in a farrowing-weaning room. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine : AAEM* 21, 494-499.
- Costa PM da, Loureiro L y Matos AJF 2013. Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: The Interface between Humans, Animals and the Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10, 278.
- Costa L, Tse M y Miyada V 2007. Herbal extracts as alternatives to antimicrobial growth promoters for weanling pigs. *Revista Brasileira de Zootecnia* 36, 589-595.
- Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D y James G 1994. Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology* 176, 2137.
- Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR y Wyllie SG 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88, 170-175.
- Creus E, Pérez J, Peralta B, Baucells F y Mateu E 2007. Effect of acidified feed on the prevalence of *Salmonella* in market-age pigs. *Zoonoses and public health* 54, 314-319.
- Cristiano L 2020. Could ozone be an effective disinfection measure against the novel coronavirus (SARS-CoV-2)? *Journal of Preventive Medicine and Hygiene* 61, E301.

Cross DE, McDevitt RM, Hillman K y Acamovic T 2007. The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *British Poultry Science* 48, 496-506.

D'Souza SP, Chavannavar S V., Kanchanashri B y Niveditha SB 2017. Pharmaceutical perspectives of spices and condiments as alternative antimicrobial remedy. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 22, 1002-1010.

Davidson PM y Harrison MA 2002. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technology-Champaign then Chicago* 56, 69-78.

Delmar JA, Su C-C y Yu EW 2014. Bacterial multi-drug efflux transporters. *Annual review of biophysics* 43, 93.

Diaz-Sanchez S, D'Souza D, Biswas D y Hanning I 2015. Botanical alternatives to antibiotics for use in organic poultry production. *Poultry Science* 94, 1419-1430.

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

Díez ÁL 2019. Disentería Porcina: Prevención y tratamientos alternativos. Accedido 21 de septiembre de 2021, a partir de <https://labovejero.es/actualidad/blog-vet/disenteria-porcina-prevencion-y-tratamientos-alternativos-espamicina-autovacunas/>.

DiRusso CC y Black PN 2004. Bacterial long chain fatty acid transport: Gateway to a fatty acid-responsive signaling system \*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 49563-49566.

Dorman HJD y Deans SG 2000. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88, 308-316.

Du E, Gan L, Li Z, Wang W, Liu D y Guo Y 2015. *In vitro* antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 6, 58.

Dubničková M, Řezanka T y Koščová H 2006. Adaptive changes in fatty acids of *E. coli* strains exposed to a quaternary ammonium salt and an amine oxide. *Folia Microbiologica* 2006 51:5 51, 371-374.

Dychdala GR 1991. Chlorine and chlorine compounds. En *Disinfection, Sterilization, and Preservation* (ed. S. Block), pp. 131-151. Lea & Febiger.

Ebani V, Nardoni S, Bertelloni F, Najar B, Pistelli L y Mancianti F 2017. Antibacterial and Antifungal Activity of Essential Oils against Pathogens Responsible for Otitis Externa in Dogs and Cats. *Medicines* 4, 21.

Ellis-Iversen J, Smith R, Gibbens J, Sharpe C, Dominguez M y Cook A 2011. Risk factors for transmission of foot-and-mouth disease during an outbreak in southern England in 2007. *The Veterinary record* 168, 128.

European Commission 2003. European Union Register of Feed Additives. Accedido 8 de julio de 2021, a partir de [https://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed/feed-additives/eu-register\\_en](https://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed/feed-additives/eu-register_en).

European Medicines Agency Veterinary Medicines Division 2017. Zinc oxide - Art 35 - Questions and answers on veterinary medicinal products containing zinc oxidase to be administered orally to food-producing species. EMA/394961/2017. Accedido 7 de julio de 2021, a partir de [www.ema.europa.eu/contact](http://www.ema.europa.eu/contact).

Fahmy NM, Al-Sayed E, Moghannem S, Azam F, El-Shazly M y Singab AN 2020. Breaking down the barriers to a natural antiviral agent: Antiviral activity and molecular docking of *Erythrina speciosa* extract, fractions, and the major compound. *Chemistry and Biodiversity* 17, e1900511.

Fahr A y Liu X 2007. Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs. *Expert Opinion on Drug Delivery* 4, 403-416.

Fairbrother JM y Gyles CL 2012. Colibacillosis: Neonatal *E. coli* diarrhea, postweaning *E. coli* diarrhea and edema disease, *E. coli* infections, coliform mastitis, nonspecific urinary tract infection. En *Diseases of swine* (eds. J.J. Zimmerman, L.A. Karkiker, A. Ramirez, K.J. Schwartz y G.W. Stevenson), pp. 723-750. Wiley-Blackwell.

Fang CL, Sun H, Wu J, Niu HH y Feng J 2014. Effects of sodium butyrate on growth performance,

## 6. Bibliografia

---

haematological and immunological characteristics of weanling piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 98, 680-685.

Filippitzi ME, Kruse AB, Postma M, Sarrazin S, Maes D, Alban L, Nielsen LR y Dewulf J 2018. Review of transmission routes of 24 infectious diseases preventable by biosecurity measures and comparison of the implementation of these measures in pig herds in six European countries. *Transboundary and Emerging Diseases* 65, 381-398.

Le Floc'h N, LeBellego L, Matte JJ, Melchior D y Sève B 2009. The effect of sanitary status degradation and dietary tryptophan content on growth rate and tryptophan metabolism in weaning pigs. *Journal of Animal Science* 87, 1686-1694.

Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Organisation for Animal Health/World Bank 2008. Biosecurity for highly pathogenic avian influenza– Issues and options in developing and transition countries. *FAO Animal Production and Health* 165, 1-90.

Fotheringham V 1995. Disinfection of livestock production premises. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 14, 191-205.

Franklyne JS, Mukherjee A y Chandrasekaran N 2016. Essential oil micro- and nanoemulsions: promising roles in antimicrobial therapy targeting human pathogens. *Letters in Applied Microbiology* 63, 322-334.

Franz C, Baser K y Windisch W 2010. Essential oils and aromatic plants in animal feeding - a European perspective. A review. *Flavour and Fragrance Journal* 25, 327-340.

Fratini F, Mancini S, Turchi B, Friscia E, Pistelli L, Giusti G y Cerri D 2017. A novel interpretation of the Fractional Inhibitory Concentration Index: The case *Origanum vulgare* L. and *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst essential oils against *Staphylococcus aureus* strains. *Microbiological Research* 195, 11-17.

Frederick J, Corner T y Gerhardt P 1974. Antimicrobial actions of hexachlorophene: inhibition of respiration in *Bacillus megaterium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 6, 712-721.

Frentzel H, Menrath A, Tomuzia K, Braeunig J y Appel B 2013. Decontamination of high-risk animal and zoonotic pathogens. biosecurity and bioterrorism: *Biodefense strategy, practice, and science* 11, S102-S114.

Friedman M 2017. Chemistry, antimicrobial mechanisms, and antibiotic activities of cinnamaldehyde against pathogenic bacteria in animal feeds and human foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65, 10406-10423.

Furi L, Ciusa ML, Knight D, Di Lorenzo V, Tocci N, Cirasol D, Aragones L, Coelho JR, Freitas AT, Marchi E, Moce L, Visa P, Northwood JB, Viti C, Borghi E, Orefici G, Morrissey I y Oggioni MR 2013. Evaluation of reduced susceptibility to quaternary ammonium compounds and bisbiguanides in clinical isolates and laboratory-generated mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57, 3488-3497.

Gabert VM y Sauer WC 1994. The effects of supplementing diets for weanling pigs with organic acids. A review. *Journal of Animal and Feed Sciences* 3, 73-87.

Gálfi P y Bokori J 1990. Feeding trial in pigs with a diet containing sodium n-butyrate. *Acta Veterinaria Hungarica* 38, 3-17.

Gan BH, Gaynord J, Rowe SM, Deingruber T y Spring DR 2021. The multifaceted nature of antimicrobial peptides: Current synthetic chemistry approaches and future directions. *Chemical Society reviews* 50, 7820-7880.

Gantzhorn M, Pedersen K, Olsen J y Thomsen L 2014. Biocide and antibiotic susceptibility of *Salmonella* isolates obtained before and after cleaning at six Danish pig slaughterhouses. *International Journal of Food Microbiology* 181, 53-59.

García M, Ribosa I, Kowalczyk I, Pakiet M y Brycki B 2019. Biodegradability and aquatic toxicity of new cleavable betainate cationic oligomeric surfactants. *Journal of Hazardous Materials* 371, 108-114.

Gehr R, Wagner M, Veerasubramanian P y Payment P 2003. Disinfection efficiency of peracetic acid, UV and ozone after enhanced primary treatment of municipal wastewater. *Water Research* 37, 4573-4586.

Gerdts V y Zakhartchouk A 2017. Vaccines for porcine epidemic diarrhea virus and other swine

coronaviruses. *Veterinary Microbiology* 206, 45-51.

Gill AO y Holley RA 2006. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology* 108, 1-9.

Golus J, Sawicki R, Widelski J y Ginalska G 2016. The agar microdilution method ??? a new method for antimicrobial susceptibility testing for essential oils and plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 121, 1291-1299.

Gosling RJ, Mawhinney I, Vaughan K, Davies RH y Smith RP 2017. Efficacy of disinfectants and detergents intended for a pig farm environment where *Salmonella* is present. *Veterinary Microbiology* 204, 46-53.

Gottardi W 1991. Iodine and iodine compounds. En *Disinfection, Sterilization, and Preservation* (ed. S. Block), pp. 152-166. Lea & Febiger.

Greathead H 2003. Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proceedings of the Nutrition Society* 62, 279-290.

Grilli E, Foresti F, Tugnoli B, Fustini M, Zanoni MG, Pasquali P, Callaway TR, Piva A y Alborali GL 2015. Microencapsulated sorbic acid and pure botanicals affect *Salmonella* Typhimurium shedding in pigs: a close-up look from weaning to slaughter in controlled and field conditions. *Foodborne Pathogens and Disease* 12, 813-819.

Grilli E, Tugnoli B, Foerster CJ y Piva A 2016. Butyrate modulates inflammatory cytokines and tight junctions components along the gut of weaned pigs. *Journal of Animal Science* 94, 433-436.

Guilloteau P, Martin L, Eeckhaut V, Ducatelle R, Zabielski R y Immerseel F Van 2010. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutrition Research Reviews* 23, 366-384.

Günther KD y Bossow H 1998. The effect of etheric oil from *Origanum vulgare* (Ropadiar) in the feed ration of weaned pigs on their daily feed intake, daily gains and food utilization. En *Proceedings of the 15th IPVS Congress*, p. 223. Birmingham, UK.

Gutiérrez C, Rodríguez Barbosa J, Suárez J, González O, Tascón R y Rodríguez Ferri E 1995. Efficacy of a variety of disinfectants against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *American Journal of Veterinary Research* 56, 1025-1029.

Habibi Najafi MB y Haddad Khodaparast MH 2009. Efficacy of ozone to reduce microbial populations in date fruits. *Food Control* 20, 27-30.

Haeseler G, Maue D, Grosskreutz J, Bufler J, Nentwig B, Piepenbrock S, Dengler R y Leuwer M 2002. Voltage-dependent block of neuronal and skeletal muscle sodium channels by thymol and menthol. *European Journal of Anaesthesiology* 19, 571.

Hammer KA y Heel KA 2012. Use of multiparameter flow cytometry to determine the effects of monoterpenoids and phenylpropanoids on membrane polarity and permeability in staphylococci and enterococci. *International Journal of Antimicrobial Agents* 40, 239-245.

Hancox LR, Bon M Le, Dodd CER y Mellits KH 2013. Inclusion of detergent in a cleaning regime and effect on microbial load in livestock housing. *The Veterinary Record* 173, 167.

Hanczakowska E, Świątkiewicz M, Natonek-Wiśniewska M y Okoń K 2016. Medium chain fatty acids (MCFA) and/or probiotic *Enterococcus faecium* as a feed supplement for piglets. *Livestock Science* 192, 1-7.

Hansen CF, Phillips ND, La T, Hernandez A, Mansfield J, Kim JC, Mullan BP, Hampson DJ y Pluske JR 2010. Diets containing inulin but not lupins help to prevent swine dysentery in experimentally challenged pigs. *Journal of Animal Science* 88, 3327-3336.

Hansman G, Shahzad-Ul-Hussan S, McLellan J, Chuang G, Georgiev I, Shimoike T, Katayama K, Bewley C y Kwong P 2012. Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate. *Journal of virology* 86, 284-292.

Hao H, Cheng G, Iqbal Z, Ai X, Hussain HI, Huang L, Dai M, Wang Y, Liu Z y Yuan Z 2014. Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. *Frontiers in Microbiology* 5, 288.

Hartnack S, Nathues C, Nathues H, Grosse Beilage E y Lewis FI 2014. Estimating diagnostic test accuracies for *Brachyspira hyodysenteriae* accounting for the complexities of population structure in food



## 6. Bibliografía

---

animals. PLoS ONE 9, e98534.

Helander IM, Alakomi H-L, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris LGM y von Wright A 1998. Characterization of the Action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 3590-3595.

Heo JM, Opapeju FO, Pluske JR, Kim JC, Hampson DJ y Nyachoti CM 2012. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97, 207-237.

Hernández-Jover M, Taylor M, Holyoake P y Dhand N 2012. Pig producers' perceptions of the Influenza Pandemic H1N1/09 outbreak and its effect on their biosecurity practices in Australia. *Preventive veterinary medicine* 106, 284-294.

Hernando-Amado S, Coque TM, Baquero F y Martínez JL 2019. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nature Microbiology* 4, 1432-1442.

Herruzo I, Herruzo R y Vizcaino M 2015. Is there a correlation between antibiotic resistance and decreased susceptibility to biocides in different genus of bacterial genera. *Journal of Antibiotics Research* 1, 1-7.

Hidalgo Á, Carvajal A, Vester B, Pringle M, Naharro G y Rubio P 2011. Trends towards lower antimicrobial susceptibility and characterization of acquired resistance among clinical isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 3330-3337.

Hill GM y Shannon MC 2019. Copper and Zinc Nutritional issues for agricultural animal production. *Biological Trace Element Research* 188, 148.

Holah JT 2014. 9 - Cleaning and disinfection practices in food processing. En *Hygiene in Food Processing (Second Edition)* (eds. H.L.M. Lelieveld, J.T. Holah y D. Napper), pp. 259-304. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.

Hong JK, Lee KN, You SH, Kim SM, Tark D, Lee HS, Ko YJ, Seo MG, Park JH y Kim B 2015. Inactivation of foot-and-mouth disease virus by citric acid and sodium carbonate with deicers. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 7610-7614.

Horky P, Skalickova S, Smerkova K y Skladanka J 2019. Essential oils as a feed additives: Pharmacokinetics and potential toxicity in monogastric animals. *Animals* 9, 352.

Houdkova M, Duskocil I, Urbanova K, Tulin EKCB, Rondevaldova J, Tulin AB, Kudera T, Tulin EE, Zeleny V y Kokoska L 2018a. Evaluation of antipneumonic effect of philippine essential oils using broth microdilution volatilization method and their lung fibroblasts toxicity. *Natural Product Communications* 13, 1059-1066.

Houdkova M, Urbanova K, Duskocil I, Rondevaldova J, Novy P, Nguon S, Chrun R y Kokoska L 2018b. *In vitro* growth-inhibitory effect of Cambodian essential oils against pneumonia causing bacteria in liquid and vapour phase and their toxicity to lung fibroblasts. *South African Journal of Botany* 118, 85-97.

Hsiao CP y Siebert KJ 1999. Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 47, 189-201.

Hu C, Xiao K, Luan Z y Song J 2013. Early weaning increases intestinal permeability, alters expression of cytokine and tight junction proteins, and activates mitogen-activated protein kinases in pigs. *Journal of Animal Science* 91, 1094-1101.

Huang Y y Chen H 2011. Effect of organic acids, hydrogen peroxide and mild heat on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on baby spinach. *Food Control* 22, 1178-1183.

Huang Y, Suyemoto M, Garner CD, Cicconi KM y Altier C 2008. Formate acts as a diffusible signal to induce *Salmonella* invasion. *Journal of Bacteriology* 190, 4233-4241.

Hulánková R y Bořilová G 2011. In vitro combined effect of oregano essential oil and caprylic acid against *Salmonella* serovars, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Acta Veterinaria Brno* 80, 343-348.

Huyghebaert G, Ducatelle R y Immerseel F Van 2011. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *The Veterinary Journal* 187, 182-188.

Hwang KA, Hwang YJ y Song J 2016. Antioxidant activities and oxidative stress inhibitory effects of

ethanol extracts from *Cornus officinalis* on raw 264.7 cells. BMC Complementary and Alternative Medicine 16, 1-9.

Van Immerseel F, De Buck J, Boyen F, Bohez L, Pasmans F, Volf J, Sevcik M, Rychlik I, Haesebrouck F y Ducatelle R 2004. Medium-chain fatty acids decrease colonization and invasion through *hliA* suppression Shortly after infection of chickens with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Applied and Environmental Microbiology 70, 3582-3587.

Van Immerseel F, Russell JB, Flythe MD, Gantois I, Timbermont L, Pasmans F, Haesebrouck F y Ducatelle R 2006. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: A mechanistic explanation of the efficacy. Avian Pathology 35, 182-188.

Inouye S, Takizawa T y Yamaguchi H 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 47, 565-573.

Ivanovic J, Mistic D, Zizovic I y Ristic M 2012. *In vitro* control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates. Food Control 25, 110-116.

Jayaraman B y Nyachoti CM 2017. Husbandry practices and gut health outcomes in weaned piglets: A review. Animal Nutrition 3, 205-211.

Jeffrey DJ 1995. Chemicals used as disinfectants: active ingredients and enhancing additives. Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics) 14, 57-74.

Joerling J, Barth SA, Schlez K, Willems H, Herbst W y Ewers C 2018. Phylogenetic diversity, antimicrobial susceptibility and virulence gene profiles of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from pigs in Germany. PLOS ONE 13, e0190928.

Jorge S y Dellagostin OA 2017. The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches. Biotechnology Research and Innovation 1, 6-13.

Joshi JR, Khazanov N, Senderowitz H, Burdman S, Lipsky A y Yedidia I 2016. Plant phenolic volatiles inhibit quorum sensing in pectobacteria and reduce their virulence by potential binding to ExpI and ExpR proteins. Scientific Reports 6, 1-15.

Jung K, Saif LJ y Wang Q 2020. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): An update on etiology, transmission, pathogenesis, and prevention and control. Virus Research 286, 198045.

Juretić D, Golemac A, Strand DE, Chung K, Ilić N, Goić-Barišić I y Pellay FX 2020. The spectrum of design solutions for improving the activity-selectivity product of peptide antibiotics against multidrug-resistant bacteria and prostate cancer PC-3 cells. Molecules 25, 3526.

Juturu V y Wu J 2016. Microbial production of lactic acid: the latest development. Critical reviews in biotechnology 36, 967-977.

Kachur K y Suntres Z 2020. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 60, 3042-3053.

Kahindi RK, Htoo JK y Nyachoti CM 2014. Short Communication: Effect of dietary lysine content and sanitation conditions on performance of weaned pigs fed antibiotic-free diets. Canadian Journal of Animal Science 94, 115-118.

Kahrs RF 1995. General disinfection guidelines. Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties 14, 105-122.

Kamel C 2001. Tracing modes of action and the roles of plant extracts in non-ruminants. En Recent Advances in Animal Nutrition:2001 (eds. P. Garnsworthy y J. Wiseman), pp. 135-150. The Nottingham University Press.

Kampf G 2018a. Hydrogen Peroxide. En Antiseptic Stewardship, pp. 99-130. Springer.

Kampf G 2018b. Glutaraldehyde. En Antiseptic Stewardship, pp. 131-160. Springer.

Kampf G 2018c. Povidone Iodine. En Antiseptic Stewardship, pp. 609-641. Springer.

Kampf G 2018d. Triclosan. En Antiseptic Stewardship, pp. 211-258. Springer.

Kang S-N, Kim K-J, Park J-H, Kim K-T y Lee O-H 2013. Effect of antimicrobial activity of sodium hypochlorite and organic acids on various foodborne pathogens in Korean ginseng root. African Journal of

## 6. Bibliografía

---

Microbiology Research 7, 2724-2729.

Karatzas K, Webber M, Jorgensen F, Woodward M, Piddock L y Humphrey T 2007. Prolonged treatment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with commercial disinfectants selects for multiple antibiotic resistance, increased efflux and reduced invasiveness. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 60, 947-955.

Karlsson M, Aspán A, Landén A y Franklin A 2003a. Further characterization of porcine *Brachyspira hyodysenteriae* isolates with decreased susceptibility to tiamulin. Journal of Medical Microbiology 53, 281-285.

Karlsson M, Fellström C, Gunnarsson A, Landén A y Franklin A 2003b. Antimicrobial susceptibility testing of porcine *Brachyspira (Serpulina)* species isolates. Journal of Clinical Microbiology 41, 2596-604.

Karuri AR, Dobrowsky E y Tannock IF 1993. Selective cellular acidification and toxicity of weak organic acids in an acidic microenvironment. British Journal of Cancer 68, 1080-1087.

Kawana R, Kitamura T, Nakagomi O, Matsumoto I, Arita M, Yoshihara N, Yanagi K, Yamada A, Morita O, Yoshida Y, Furuya Y y Chiba S 1997. Inactivation of human viruses by povidone-iodine in comparison with other antiseptics. Dermatology 195, 29-35.

Kawatra P y Rajagopalan R 2015. Cinnamon: Mystic powers of a minute ingredient. Pharmacognosy Research 7, S1.

Khadre y Yousef A 2001. Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. International journal of food microbiology 71, 131-138.

Khoramnia A, Ebrahimpour A, Ghanbari R, Ajdari Z y Lai O-M 2013. Improvement of medium chain fatty acid content and antimicrobial activity of coconut oil via solid-state fermentation using a Malaysian *Geotrichum candidum*. BioMed Research International 2013, 1-9.

Kidder D y Manners M 1978. Digestion in the Pig. Scientechica, Bristol.

Kim M, Hatt JK, Weigand MR, Krishnan R, Pavlostathis SG y Konstantinidis KT 2018a. Genomic and transcriptomic insights into how bacteria withstand high concentrations of benzalkonium chloride biocides. Applied and Environmental Microbiology 84, 197-215.

Kim HB y Isaacson RE 2015. The pig gut microbial diversity: Understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing. Veterinary Microbiology 177, 242-251.

Kim H, Lee Y, Kang SC, Han BK y Choi KM 2016. Recent vaccine technology in industrial animals. Clinical and Experimental Vaccine Research 5, 12.

Kim M, Na J y Lee J 2018b. Anti-inflammatory effects of trans-cinnamaldehyde on lipopolysaccharide-stimulated macrophage activation via MAPKs pathway regulation. Immunopharmacology and Immunotoxicology 40, 219-224.

Kirchgässner C, Schmitt S, Borgström A y Wittenbrink MM 2016. Antimicrobial susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* in Switzerland. Schweizer Archiv für Tierheilkunde 158, 405-410.

Kong XF, Wu GY, Liao YP, Hou ZP, Liu HJ, Yin FG, Li TJ, Huang RL, Zhang YM, Deng D, Xie MY, Deng ZY, Xiong H, Ruan Z, Kang P, Yang CB, Yin YL y Fan MZ 2007. Dietary supplementation with Chinese herbal ultra-fine powder enhances cellular and humoral immunity in early-weaned piglets. Livestock Science 1-3, 94-98.

Kovanda L, Zhang W, Wei X, Luo J, Wu X, Atwill ER, Vaessen S, Li X y Liu Y 2019. *In vitro* antimicrobial activities of organic acids and their derivatives on several species of Gram-negative and Gram-positive bacteria. Molecules 24, 3770.

Van Krimpen MM y Binnendijk GP 2001. Ropadiar® as alternative for anti microbial growth promoter in diets of weanling pigs. Rapport-Praktijkonderzoek Veehouderij 205, 1-22.

Kroismayr A, Sehm J, Pfaffl M, Schedle K, Plitzner C y Windisch W 2008. Effects of avilamycin and essential oils on mRNA expression of apoptotic and inflammatory markers and gut morphology of piglets. Czech Journal of Animal Science 53, 377-387.

Kyriakis SC, Sarris K, Lekkas S, Tsinas AC, Ginnakopoulos CG, Alexopoulos C y Saoulidis K 1998. Control of post weaning diarrhoea syndrome of piglets by in-feed applications or *Origanum* essential oils. En Proceedings of the 15th IPVS Congress, p. 218. Birmingham, UK.

- Laanen M, Persoons D, Ribbens S, de Jong E, Callens B, Strubbe M, Maes D y Dewulf J 2013. Relationship between biosecurity and production/antimicrobial treatment characteristics in pig herds. *Veterinary Journal* 198, 508-512.
- Laird K y Phillips C 2012. Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials? *Letters in Applied Microbiology* 54, 169-174.
- Lambert R, Joynson J y Forbes B 2001a. The relationships and susceptibilities of some industrial, laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to some antibiotics and biocides. *Journal of Applied Microbiology* 91, 972-984.
- Lambert RJ, Skandamis PN, Coote PJ y Nychas GJ 2001b. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91, 453-62.
- Lambert RJ y Stratford M 1999. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *Journal of Applied Microbiology* 86, 157-164.
- Larson EL y Morton HE 1991. Alcohols. En *Disinfection, Sterilization, and Preservation* (ed. S. Block), pp. 191-203. Lea & Febiger.
- Lauridsen C 2019. From oxidative stress to inflammation: redox balance and immune system. *Poultry Science* 98, 4240-4246.
- Lee K-W, Everts H y Beynen AC 2004. Essential oils in broiler nutrition. *International Journal of Poultry Science* 3, 738-752.
- Lee C, Giles LR, Bryden WL, Downing JL, Owens PC, Kirby AC y Wynn PC 2005. Performance and endocrine responses of group housed weaner pigs exposed to the air quality of a commercial environment. *Livestock Production Science* 93, 255-262.
- Lee S, Najiah M, Wendy W y Nadirah M 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* flower bud (Clove) against fish systemic bacteria isolated from aquaculture sites. *Frontiers of Agriculture in China* 3, 332-336.
- Lee JH, Park JS, Lee SW, Hwang SY, Young BE y Choi HJ 2015. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Inhibition by polysaccharide from *Ginkgo biloba* exocarp and mode of its action. *Virus Research* 195, 148-152.
- Lekagul A, Tangcharoensathien V y Yeung S 2019. Patterns of antibiotic use in global pig production: A systematic review. *Veterinary and Animal Science* 7, 100058.
- Leonel A y Alvarez-Leite J 2012. Butyrate: implications for intestinal function. *Current opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 15, 474-479.
- Li D, Baert L y Uyttendaele M 2013. Inactivation of food-borne viruses using natural biochemical substances. *Food Microbiology* 35, 1-9.
- Li Y, Fu X, Ma X, Geng S, Jiang X, Huang Q, Hu C y Han X 2018a. Intestinal microbiome-metabolome responses to essential oils in piglets. *Frontiers in Microbiology* 9, 1988.
- Li H jie, Gao D sheng, Li Y tao, Wang Y sheng, Liu H ying y Zhao J 2018b. Antiviral effect of lithium chloride on porcine epidemic diarrhea virus *in vitro*. *Research in Veterinary Science* 118, 288-294.
- Li X, Mao M, Zhang Y, Yu K y Zhu W 2019. Succinate modulates intestinal barrier function and inflammation response in pigs. *Biomolecules* 9, 486.
- Li P, Piao X, Ru Y, Han X, Xue L y Zhang H 2012a. Effects of adding essential oil to the diet of weaned pigs on performance, nutrient utilization, immune response and intestinal health. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 25, 1617-1626.
- Li SY, Ru YJ, Liu M, Xu B, Péron A y Shi XG 2012b. The effect of essential oils on performance, immunity and gut microbial population in weaner pigs. *Livestock Science* 145, 119-123.
- Li C-S y Wang Y-C 2003. Surface Germicidal Effects of Ozone for Microorganisms. *American Industrial Hygiene Association Journal* 64, 533-537.
- Lianou A, Koutsoumanis KP y Sofos JN 2012. Organic acids and other chemical treatments for microbial decontamination of food. En *Microbial Decontamination in the Food Industry: Novel Methods and Applications* (eds. A. Demirci y M. O. Ngadi), pp. 592-664. Woodhead Publishing Series in Food

## 6. Bibliografía

---

Science, Technology and Nutrition.

Lien TF, Horng YM y Wu CP 2007. Feasibility of replacing antibiotic feed promoters with the Chinese traditional herbal medicine Bazhen in weaned piglets. *Livestock Science* 107, 97-102.

Lim C, Lückstädt C, Webster CD y Kesius P 2015. Organic Acids and Their Salts. En *Dietary Nutrients, Additives, and Fish Health* (eds. C. Lee, C. Lim, D. M. Gatlin III, C. Webster), pp. 305-319. John Wiley & Sons.

Lin H, Chen L, Gao L, Yuan X, Ma Z y Fan H 2016. Epidemic strain YC2014 of porcine epidemic diarrhea virus could provide piglets against homologous challenge. *Virology Journal* 13, 1-7.

Llana-Ruiz-Cabello M, Gutiérrez-Praena D, Puerto M, Pichardo S, Jos Á y Cameán A 2015. *In vitro* pro-oxidant/antioxidant role of carvacrol, thymol and their mixture in the intestinal Caco-2 cell line. *Toxicology in vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 29, 647-656.

Lobova D y Cizek A 2004. Bactericidal efficacy of two disinfectants against *Brachyspira hyodysenteriae* and one feed supplement against *B. hyodysenteriae* and *B. pilosicoli*. *Veterinarni Medicina* 49, 156-160.

Lobová D, Smola J y Cizek A 2004. Decreased susceptibility to tiamulin and valnemulin among Czech isolates of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Journal of Medical Microbiology* 53, 287-291.

Lückstädt C 2011. Effects of dietary potassium diformate on feed intake, weight loss and back fat reduction in sows: pre-farrowing till weaning. *Advances in Animal Biosciences* 2, 145.

Luukkonen T y Pehkonen SO 2017. Peracids in water treatment: A critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 47, 1-39.

Luyckx KY, Van Weyenberg S, Dewulf J, Herman L, Zoons J, Vervaeke E, Heyndrickx M y De Reu K 2015. On-farm comparisons of different cleaning protocols in broiler houses. *Poultry Science* 94, 1986-1993.

Lynch H, Leonard FC, Walia K, Lawlor PG, Duffy G, Fanning S, Markey BK, Brady C, Gardiner GE y Argüello H 2017. Investigation of in-feed organic acids as a low cost strategy to combat *Salmonella* in grower pigs. *Preventive Veterinary Medicine* 139, 50-57.

Ma T, Boivin M, Ye D, Pedram A y Said H 2005. Mechanism of TNF- $\alpha$  modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 288, G422-30.

Ma F, Xu S, Tang Z, Li Z y Zhang L 2021. Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. *Biosafety and Health* 3, 32-38.

Vande Maele L, Heyndrickx M, Maes D, De Pauw N, Mahu M, Verlinden M, Haesebrouck F, Martel A, Pasmans F y Boyen F 2016. *In vitro* susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* to organic acids and essential oil components. *The Journal of Veterinary Medical Science* 78, 325-8.

Maertens H, De Reu K, Meyer E, Van Coillie E y Dewulf J 2019. Limited association between disinfectant use and either antibiotic or disinfectant susceptibility of *Escherichia coli* in both poultry and pig husbandry. *BMC Veterinary Research* 15, 310.

Man A, Santacroce L, Jacob R, Mare A y Man L 2019. Antimicrobial activity of six essential oils against a group of human pathogens: A Comparative study. *Pathogens* 8, 15.

Mangalappalli-Illathu AK, Vidović S y Korber DR 2008. Differential adaptive response and survival of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis planktonic and biofilm Cells Exposed to Benzalkonium Chloride. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52, 3669.

Mannion C, Lynch PB, Egan J y Leonard FC 2007. Efficacy of cleaning and disinfection on pig farms in Ireland. *Veterinary Record* 161, 371-375.

Manzoor A, Ul-Haq I, Baig S, Qazi JI y Seratlic S 2016. Efficacy of locally isolated lactic acid bacteria against antibiotic-resistant uropathogens. *Jundishapur Journal of Microbiology* 9, 18952.

Marriott NG y Gravani RB 2006. Cleaning Compounds. En *Principles of Food Sanitation*, pp. 141-165. Springer.

Maruzzella JC y Sicurella NA 1960. Antibacterial activity of essential oil vapors\*\*Received February 2, 1960, from the Department of Biology, Long Island University, Brooklyn, N. Y. *Journal of the American*

Pharmaceutical Association (Scientific ed.) 49, 692-694.

Massacci FR, Luca S De, Cucco L, Tentellini M, Perreten V, Pezzotti G y Magistrali CF 2018. Multiresistant *Brachyspira hyodysenteriae* shedding by pigs during the fattening period. *Veterinary Record* 183, 264-264.

Matsue M, Mori Y, Nagase S, Sugiyama Y, Hirano R, Ogai K, Ogura K, Kurihara S y Okamoto S 2019. Measuring the antimicrobial activity of lauric acid against various bacteria in human gut microbiota using a new method. *Cell Transplantation* 28, 1528-1541.

Mc Carlie S, Boucher CE y Bragg RR 2020. Molecular basis of bacterial disinfectant resistance. *Drug Resistance Updates* 48, 100672.

Mcdonnell G y Russell AD 1999. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 147-179.

McKenna SM y Davies KJ 1988. The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid. Possible role in the bactericidal activity of phagocytes. *Biochemical Journal* 254, 685.

Mehdizadeh L y Moghaddam M 2018. Essential oils: Biological activity and therapeutic potential. En *Therapeutic, Probiotic, and Unconventional Foods* (eds. A. M. Grumezescu y A. M. Holban), pp. 167-179. Elsevier.

Merrett GLB, Bloom G, Wilkinson A y MacGregor H 2016. Towards the just and sustainable use of antibiotics. *Journal of Pharmaceutical Policy and Practice* 7, 31.

Mezzanotte V, Antonelli M, Citterio S y Nurizzo C 2007. Wastewater disinfection alternatives: Chlorine, ozone, peracetic acid, and UV light. *Water Environment Research* 79, 2373-2379.

Miladi H, Zmantar T, Kouidhi B, Chaabouni Y, Mahdouani K, Bakhrouf A y Chaieb K 2017. Use of carvacrol, thymol, and eugenol for biofilm eradication and resistance modifying susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to nalidixic acid. *Microbial pathogenesis* 104, 56-63.

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Bioseguridad y buenas prácticas. Bioseguridad en el sector porcino. Accedido 6 de septiembre de 2021, a partir de [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/bioseguridad-buenas-practicas/porcino\\_bioseg.aspx](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/bioseguridad-buenas-practicas/porcino_bioseg.aspx).

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación 2020. El sector de la carne de cerdo en cifras. Principales Indicadores Económicos. Accedido 2 de noviembre de 2021, a partir de [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/estadisticas/indicadoreseconomicossectorporcino2020\\_tcm30-379728.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/estadisticas/indicadoreseconomicossectorporcino2020_tcm30-379728.pdf).

Mirajkar NS, Davies PR y Gebhart CJ 2016. Antimicrobial susceptibility patterns of *Brachyspira* species isolated from swine herds in the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 54, 2109-2119.

Mith H, Clinquart A, Zhiri A, Daube G y Delcenserie V 2015. The impact of oregano (*Origanum heracleoticum*) essential oil and carvacrol on virulence gene transcription by *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiology Letters* 362, 1-7.

Mohr KI 2016. History of antibiotics research. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 398, 237-272.

Molnar C y Bilkei G 2005. The influence of an oregano feed additive on production parameters and mortality of weaned piglets. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Grosstiere - Nutztiere* 33, 42-47.

Montagne L, Pluske JR y Hampson DJ 2003. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Animal Feed Science and Technology* 108, 95-117.

Mroz Z 2005. Organic Acids as potential alternatives to antibiotic growth promoters for pigs. *Advances in Pork Production* 16, 169-182.

Mucha W y Witkowska D 2021. The Applicability of essential oils in different stages of production of animal-based foods. *Molecules* 26, 3798.

Murtough S, Hiom S, Palmer M y Russell A 2001. Biocide rotation in the healthcare setting: is there a case for policy implementation? *The Journal of hospital infection* 48, 1-6.

Musarra-Pizzo M, Ginestra G, Smeriglio A, Pennisi R, Sciortino MT y Mandalari G 2019. The

## 6. Bibliografía

---

- antimicrobial and antiviral activity of polyphenols from almond (*Prunus dulcis* L.) Skin. *Nutrients* 11, 2355.
- Nagai K, Murata T, Ohta S, Zenda H, Ohnishi M y Hayashi T 2003. Two different mechanisms are involved in the extremely high-level benzalkonium chloride resistance of a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Microbiology and Immunology* 47, 709-715.
- Nakai SA y Siebert KJ 2003. Validation of bacterial growth inhibition models based on molecular properties of organic acids. *International Journal of Food Microbiology* 86, 249-255.
- Nathues C, Hillebrand A, Rossteuscher S, Zimmermann W, Nathues H y Schüpbach G 2015. Evaluating the surveillance for swine dysentery and progressive atrophic rhinitis in closed multiplier herds using scenario tree modelling. *Porcine Health Management* 1, 7.
- National Research Council 2011. Toxicokinetics and modes of action of formaldehyde. En *Review of the Environmental Protection Agency's Draft IRIS Assessment of Formaldehyde*. National Academies Press (US).
- Neiryneck W, Boyen F, Chantziaras I, Vandersmissen T, Vyt P, Haesebrouck F, Dewulf J y Maes D 2020. Implementation and evaluation of different eradication strategies for *Brachyspira hyodysenteriae*. *Porcine Health Management* 6, 27.
- Nguyen T, Nioi P y Pickett CB 2009. The Nrf2-Antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 284, 13291-13295.
- Nöremark M, Lindberg A, Vågsholm I y Sternberg Lewerin S 2009. Disease awareness, information retrieval and change in biosecurity routines among pig farmers in association with the first PRRS outbreak in Sweden. *Preventive veterinary medicine* 90, 1-9.
- de Nova PJG, Carvajal A, Prieto M y Rubio P 2017. *In vitro* susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* to a commercial citrus fruit extract. *Research in Veterinary Science* 115, 318-324.
- de Nova PJG, Carvajal A, Prieto M y Rubio P 2019. *In vitro* susceptibility and evaluation of techniques for understanding the mode of action of a promising non-antibiotic citrus fruit extract against several pathogens. *Frontiers in Microbiology* 10, 884.
- Nowotarska S, Nowotarski K, Grant I, Elliott C, Friedman M y Situ C 2017. Mechanisms of antimicrobial action of cinnamon and oregano oils, cinnamaldehyde, carvacrol, 2,5-dihydroxybenzaldehyde, and 2-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). *Foods* 6, 72.
- O'Brien RT y Newman J 1979. Structural and compositional changes associated with chlorine inactivation of polioviruses. *Applied and Environmental Microbiology* 38, 1034.
- O'Bryan CA, Pendleton SJ, Crandall PG y Ricke SC 2015. Potential of plant essential oils and their components in animal agriculture - *in vitro* studies on antibacterial mode of action. *Frontiers in Veterinary Science* 2, 35.
- Obłąk E, Futoma-Kołoch B y Wiczyńska A 2021. Biological activity of quaternary ammonium salts and resistance of microorganisms to these compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 37, 22.
- Obłąk E, Piecuch A, Maciaszczyk-Dziubińska E y Wawrzycka D 2016. Quaternary ammonium salt n-(dodecyloxycarbonylmethyl)-n,n,n-trimethyl ammonium chloride induced alterations in *Saccharomyces cerevisiae* physiology. *Journal of Biosciences* 41, 601-614.
- Odds FC 2003. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52, 1.
- Ölmez H y Kretschmar U 2009. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT - Food Science and Technology* 42, 686-693.
- Olszewska MA, Gedas A y Simões M 2020. The effects of eugenol, trans-cinnamaldehyde, citronellol, and terpineol on *Escherichia coli* biofilm control as assessed by culture-dependent and -independent methods. *Molecules* 25, 2641.
- Omonijo FA, Ni L, Gong J, Wang Q, Lahaye L y Yang C 2018. Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition* 4, 126-136.

Organización Mundial de la Salud (OMS) 2019. Lista OMS de AIC, 6.<sup>a</sup> revisión. Accedido 7 de julio de 2021, a partir de <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325037/WHO-NMH-FOS-FZD-19.1-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Ortega Morente E, Fernández-Fuentes MA, Grande Burgos MJ, Abriouel H, Pérez Pulido R y Gálvez A 2013. Biocide tolerance in bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 162, 13-25.

Ouedrhiri W, Mounyr B, Harki H, Moja S y Greche H 2017. Synergistic antimicrobial activity of two binary combinations of marjoram, lavender, and wild thyme essential oils. *International Journal of Food Properties* 20, 3149-3158.

Øverland M, Bikker P y Fledderus J 2009. Potassium diformate in the diet of reproducing sows: Effect on performance of sows and litters. *Livestock Science* 122, 241-247.

Owen J 1995. Disinfection of farrowing pens. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 14, 381-391.

Padgett LE, Broniowska KA, Hansen PA, Corbett JA y Tse HM 2013. The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1281, 16.

Van Panhuis WG, Grefenstette J, Jung SY, Chok NS, Cross A, Eng H, Lee BY, Zadorozhny V, Brown S, Cummings D y Burke DS 2013. Contagious diseases in the United States from 1888 to the present. *New England Journal of Medicine* 369, 2152-2158.

Park JE, Kang KJ, Ryu JH, Park JY, Jang H, Sung DJ, Kang JG y Shin HJ 2018. Porcine epidemic diarrhea vaccine evaluation using a newly isolated strain from Korea. *Veterinary Microbiology* 221, 19-26.

Partanen KH y Mroz Z 1999. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutrition Research Reviews* 12, 117-145.

Di Pasqua R, Betts G, Hoskins N, Edwards M, Ercolini D y Mauriello G 2007. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 4863-4870.

Paster BJ y Dewhirst FE 2000. Phylogenetic foundation of spirochetes. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2, 341-344.

Pearlin BV, Muthuvel S, Govidasamy P, Villavan M, Alagawany M, Ragab Farag M, Dhama K y Gopi M 2020. Role of acidifiers in livestock nutrition and health: A review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 104, 558-569.

Peh E, Kittler S, Reich F y Kehrenberg C 2020. Antimicrobial activity of organic acids against *Campylobacter* spp. and development of combinations—A synergistic effect? *PLOS ONE* 15, e0239312.

Pei R, Zhou F, Ji B y Xu J 2009. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. *Journal of Food Science* 74, M379-M383.

Pereira BMP y Tagkopoulos I 2019. Benzalkonium chlorides: Uses, regulatory status, and microbial resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 85, e00377-19.

Piddock L 2006. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nature reviews. Microbiology* 4, 629-636.

Pintado V 2016. Old and new antibiotics for therapy of multidrug resistant bacteria. *Revista Española de Quimioterapia* 29, 39-42.

Pisoschi A y Pop A 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 97, 55-74.

Platel K y Srinivasan K 2004. Digestive stimulant action of spices: A myth or reality? *Indian Journal of Medical Research* 119, 167-179.

Pluske JR, Williams IH y Aherne FX 1996. Maintenance of villous height and crypt depth in piglets by providing continuous nutrition after weaning. *Animal Science* 62, 131-144.

Poli G, Biondi PA, Uberti F, Ponti W, Balsari A y Cantoni C 1979. Virucidal activity of organic acids. *Food Chemistry* 4, 251-258.

Posthaus H, Kittl S, Tarek B y Bruggisser J 2020. *Clostridium perfringens* type C necrotic enteritis in



## 6. Bibliografía

---

pigs: diagnosis, pathogenesis, and prevention. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 32, 203.

Pouton CW 1985. Self-emulsifying drug delivery systems: assessment of the efficiency of emulsification. *International Journal of Pharmaceutics* 27, 335-348.

Prabuseenivasan S, Jayakumar M y Ignacimuthu S 2006. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 6, 39.

Prince D, Prince H, Thraenhardt O, Muchmore E, Bonder E y Pugh J 1993. Methodological approaches to disinfection of human hepatitis B virus. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 3296-3304.

Pritchett JC, Naesens L y Montoya J 2014. Treating HHV-6 infections: The laboratory efficacy and clinical use of anti-HHV-6 agents. *The laboratory efficacy and clinical use of anti-HHV-6 Agents. En Human Herpesviruses HHV-6A, HHV-6B, and HHV-7, Third Edition*, pp. 311-331. Elsevier B.V.

Quitmann H, Fan R y Czermak P 2014. Acidic Organic compounds in beverage, food, and feed production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 143, 91-141.

Raftari M, Jalilian FA, Abdulmir AS, Son R, Sekawi Z y Fatimah AB 2009. Effect of organic acids on *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* contaminated meat. *The Open Microbiology Journal* 3, 121-7.

Ragland D, Schneider J, Stevenson D, Hill MA y Bakker M 2007. Oregano oil as an alternative to antimicrobials in nursery diets. *Journal of Swine Health and Production* 15, 346-351.

Rana IS, Rana AS y Rajak RC 2011. Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* (L.) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol. *Brazilian Journal of Microbiology* 42, 1269.

Randall L, Cooles S, Piddock L y Woodward M 2004. Effect of triclosan or a phenolic farm disinfectant on the selection of antibiotic-resistant *Salmonella enterica*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54, 621-627.

van Riel D y de Wit E 2020. Next-generation vaccine platforms for COVID-19. *Nature Materials* 19, 810-812.

Rolinec M, Medo J, Gábor M, Miluchová M, Bíro D, Šimko M, Juráček M, Hanušovský O, Schubertová Z y Gálik B 2020. The effect of coconut oil addition to feed of pigs on rectal microbial diversity and bacterial abundance. *Animals* 10, 1764.

Ross ZM, O'Gara EA, Hill DJ, Sleightholme H V. y Maslin DJ 2001. Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: Evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 475-480.

Rugna G, Bonilauri P, Carra E, Bergamini F, Luppi A, Gherpelli Y, Magistrali CF, Nigrelli A, Alborali GL, Martelli P, La T, Hampson DJ y Merialdi G 2015. Sequence types and pleuromutilin susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Italian pigs with swine dysentery: 2003-2012. *Veterinary Journal* 203, 115-119.

Russell A 1994. Glutaraldehyde: current status and uses. *Infection control and hospital epidemiology* 15, 724-733.

Russell A 2004. Whither triclosan? *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 53, 693-695.

Russell JB y Díez-González F 1998. The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Advances in Microbial Physiology* 39, 228-234.

Rutala W y Weber D 2021. Disinfection and Sterilization in Health Care Facilities: An Overview and Current Issues. *Infectious disease clinics of North America* 35, 575-607.

Sagong HG, Lee SY, Chang PS, Heu S, Ryu S, Choi YJ y Kang DH 2011. Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. *International Journal of Food Microbiology* 145, 287-292.

Saha S, Buttari B, Panieri E, Profumo E y Saso L 2020. An overview of Nrf2 signaling pathway and its role in inflammation. *Molecules* 25, 5474.

Sakkas H y Papadopoulou C 2017. Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 27, 429-438.

- Sakurazawa T y Ohkusa T 2005. Cytotoxicity of organic acids produced by anaerobic intestinal bacteria on cultured epithelial cells. *Journal of Gastroenterology* 40, 600-609.
- Salehi B, Mishra AP, Shukla I, Sharifi-Rad M, Contreras M del M, Segura-Carretero A, Fathi H, Nasrabadi NN, Kobarfard F y Sharifi-Rad J 2018. Thymol, thyme, and other plant sources: Health and Potential Uses. *Phytotherapy Research* 32, 1688-1706.
- Salgot M, Folch M, Huertas E, Tapias J, Avellaneda D, Girós G, Brissaud F, Vergés C, Molina J y Pigem J 2002. Comparison of different advanced disinfection systems for wastewater reclamation. *Water Science and Technology: Water Supply* 2, 213-218.
- Scott HM, Acuff G, Bergeron G, Bourassa MW, Gill J, Graham DW, Kahn LH, Morley PS, Salois MJ, Simjee S, Singer RS, Smith TC, Storrs C y Wittum TE 2019. Critically important antibiotics: criteria and approaches for measuring and reducing their use in food animal agriculture. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1441, 8-16.
- Scott A, McCluskey B, Brown-Reid M, Grear D, Pitcher P, Ramos G, Spencer D y Singrey A 2016. Porcine epidemic diarrhea virus introduction into the United States: Root cause investigation. *Preventive Veterinary Medicine* 123, 192.
- Sekhon SS, Nguyen PL, Ahn JY, Lee KA, Lee L, Kim SY, Yoon H, Park J, Ko JH y Kim YH 2016. Porcine epidemic diarrhea (PED) infection, diagnosis and vaccination: A mini review. *Toxicology and Environmental Health Sciences* 8, 277-289.
- Semeniuc CA, Pop CR, A y Rotar M 2017. Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of Food and Drug Analysis* 25, 403-408.
- Sharifi-Rad M, Yılmaz YB, Antika G, Salehi B, Tumer TB, Venil CK, Das G, Patra JK, Karazhan N, Akram M, Iqbal M, Imran M, Sen S, Acharya K, Dey A y Sharifi-Rad J 2021. Phytochemical constituents, biological activities, and health-promoting effects of the genus *Origanum*. *Phytotherapy Research* 35, 95-121.
- Shen Y, Piao X, Kim S, Wang L, Liu P, Yoon I y Zhen Y 2009. Effects of yeast culture supplementation on growth performance, intestinal health, and immune response of nursery pigs. *Journal of Animal Science* 87, 2614-2624.
- Shen S, Zhang T, Yuan Y, Lin S, Xu J y Ye H 2015. Effects of cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane. *Food Control* 47, 196-202.
- Sheu CW y Freese E 1973. Lipopolysaccharide layer protection of Gram-negative bacteria against inhibition by long-chain fatty acids. *Journal of Bacteriology* 115, 869-75.
- da Silva JKR, Figueiredo PLB, Byler KG y Setzer WN 2020. Essential oils as antiviral agents. Potential of essential oils to treat SARS-CoV-2 infection: An *in-silico* investigation. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 3426.
- Silvernale JN, Joswick HL, Corner TR y Gerhardt P 1971. Antimicrobial actions of hexachlorophene: cytological manifestations. *Journal of Bacteriology* 108, 482.
- Sim JXF, Khazandi M, Chan WY, Trott DJ y Deo P 2019. Antimicrobial activity of thyme oil, oregano oil, thymol and carvacrol against sensitive and resistant microbial isolates from dogs with otitis externa. *Veterinary Dermatology* 30, 524-e159.
- Skrivanova E, Marounek M, Dlouha G y Kanka J 2005. Susceptibility of *Clostridium perfringens* to C2-C18 fatty acids. *Letters in Applied Microbiology* 41, 77-81.
- Slifierz MJ, Friendship RM y Scott Weese J 2015. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in commercial swine herds is associated with disinfectant and zinc usage. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 2690-2695.
- Sokolova AS, Yarovaya OI, Baranova D V., Galochkina A V., Shtro AA, Kireeva M V., Borisevich SS, Gatilov Y V., Zarubaev V V. y Salakhutdinov NF 2021. Quaternary ammonium salts based on (-)-borneol as effective inhibitors of influenza virus. *Archives of Virology* 166, 1.
- Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N y Garcia-Celma MJ 2005. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 10, 102-110.
- Songer J y Uzal F 2005. Clostridial enteric infections in pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic*

## 6. Bibliografía

---

Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc 17, 528-536.

Šperling D, Smola J y Čížek A 2011. Characterisation of multiresistant *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Czech pig farms. *Veterinary Record* 168, 215.

Sprong RC, Hulstein MFE y Van der Meer R 2001. Bactericidal activities of milk lipids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 1298-1301.

Spurlock M 1997. Regulation of metabolism and growth during immune challenge: an overview of cytokine function. *Journal of Animal Science* 75, 1773-1783.

Sriwilajaroen N, Wilairat P, Hiramatsu H, Takahashi T, Suzuki T, Ito M, Ito Y, Tashiro M y Suzuki Y 2009. Mechanisms of the action of povidone-iodine against human and avian influenza A viruses: its effects on hemagglutination and sialidase activities. *Virology Journal* 6, 124.

Stanojević-Nikolić S, Dimić G, Mojović L, Pejin J, Djukić-Vuković A y Kocić-Tanackov S 2016. Antimicrobial activity of lactic acid against pathogen and spoilage microorganisms. *Journal of Food Processing and Preservation* 40, 990-998.

Strober W, Fuss IJ y Blumberg RS 2002. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annual Review of Immunology* 20, 495-549.

Swenberg JA, Moeller BC, Lu K, Rager JE, Fry RC y Starr TB 2012. Formaldehyde carcinogenicity research: 30 years and counting for mode of action, epidemiology, and cancer risk assessment. *Toxicologic Pathology* 41, 181-189.

Takigawa T y Endo Y 2006. Effects of glutaraldehyde exposure on human health. *Journal of Occupational Health* 48, 75-87.

Tamargo J, Le Heuzey J-Y y Mabo P 2015. Narrow therapeutic index drugs: a clinical pharmacological consideration to flecainide. *European Journal of Clinical Pharmacology* 71, 549-567.

Tan JBL y Lim YY 2015. Critical analysis of current methods for assessing the *in vitro* antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. *Food Chemistry* 172, 814-822.

Tan C, Wei H, Sun H, Ao J, Long G, Jiang S y Peng J 2015. Effects of dietary supplementation of oregano essential oil to sows on oxidative stress status, lactation feed intake of sows, and piglet performance. *BioMed Research International* 2015, 525218.

Tang K, He S, Zhang X, Guo J, Chen Q, Yan F, Banadyga L, Zhu W, Qiu X y Guo Y 2018. Tangeretin, an extract from *Citrus* peels, blocks cellular entry of arenaviruses that cause viral hemorrhagic fever. *Antiviral Research* 160, 87-93.

Tattawasart U, Maillard J, Furr J y Russell A 1999. Development of resistance to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride in *Pseudomonas stutzeri* and changes in antibiotic susceptibility. *The Journal of Hospital Infection* 42, 219-229.

Taylor GR y Butler M 1982. A comparison of the virucidal properties of chlorine, chlorine dioxide, bromine chloride and iodine. *The Journal of Hygiene* 89, 321.

Timbermont L, Lanckriet A, Dewulf J, Nollet N, Schwarzer K, Haesebrouck F, Ducatelle R y Van Immerseel F 2010. Avian pathology control of *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broilers by target-released butyric acid, fatty acids and essential oils. *Avian Pathology* 39, 117-121.

To MS, Favrin S, Romanova N y Griffiths MW 2002. Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5258-5264.

Tong C, Hu H, Chen G, Li Z, Li A y Zhang J 2021. Disinfectant resistance in bacteria: Mechanisms, spread, and resolution strategies. *Environmental Research* 195, 110897.

Trevisi P, Merialdi G, Mazzoni M, Casini L, Tittarelli C, De Filippi S, Minieri L, Lalatta-Costerbosa G y Bosi P 2007. Effect of dietary addition of thymol on growth, salivary and gastric function, immune response, and excretion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, in weaning pigs challenged with this microbe strain. *Italian Journal of Animal Science* 6, 374-376.

Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, Saija A, Mazzanti G y Bisignano G 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and*

Chemotherapy 49, 2474-2478.

Tsiloyiannis V, Kyriakis S, Vlemmas J y Sarris K 2001. The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. *Research in Veterinary Science* 70, 287-293.

Tsinas AC, Ginnakopoulos CG, Papasteriades A, Alexopoulos C, Mavromatis J y Kyriakis SC 1998. Use of *Origanum* essential oils as growth promoter in pigs. En *Proceedings of the 15th IPVS Congress*, p. 221. Birmingham, UK.

Tugnoli B, Giovagnoni G, Piva A y Grilli E 2020. From acidifiers to intestinal health enhancers: How organic acids can improve growth efficiency of pigs. *Animals* 10, 134.

Tung CM y Pettigrew JE 2006. Critical Review of Acidifiers. National Pork Board. Accedido 4 de noviembre de 2021, a partir de <http://porkcdn.s3.amazonaws.com/sites/all/files/documents/AnimalScience/ReviewOfAcidifiers.pdf>

Turner RB, Biedermann KA, Morgan JM, Keswick B, Ertel KD y Barker MF 2004. Efficacy of organic acids in hand cleansers for prevention of rhinovirus infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 2595-2598.

Ultee A, Bennik MHJ y Moezelaar R 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1561-1568.

Ultee A, Slump RA, Steging G y Smid EJ 2000. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection* 63, 620-624.

Upadhyay A, Upadhyaya I, Kollanoor-Johny A y Venkitanarayanan K 2014. Combating pathogenic microorganisms using plant-derived antimicrobials: a minireview of the mechanistic basis. *BioMed Research International* 2014, 761741.

Vaara M 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews* 56, 395-411.

Valdivieso-Ugarte M, Gomez-Llorente C, Plaza-Díaz J y Gil Á 2019. Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: A systematic review. *Nutrients* 11, 2786.

Vendeville A, Winzer K, Heurlier K, Tang CM y Hardie KR 2005. Making 'sense' of metabolism: Autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 3, 383-396.

Vickery K, Pajkos A y Cossart Y 2004. Removal of biofilm from endoscopes: evaluation of detergent efficiency. *American Journal of Infection Control* 32, 170-176.

Villagómez-Estrada S, Pérez JF, Darwich L, Vidal A, Kuijk S van, Melo-Durán D y Solà-Oriol D 2020. Effects of copper and zinc sources and inclusion levels of copper on weanling pig performance and intestinal microbiota. *Journal of Animal Science* 98, 1-15.

Vinolo M, Rodrigues H, Hatanaka E, Sato F, Sampaio S y Curi R 2011. Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 22, 849-855.

Visschers VHM, Backhans A, Collineau L, Iten D, Loesken S, Postma M, Belloc C, Dewulf J, Emanuelson U, Beilage E grosse, Siegrist M, Sjölund M y Stärk KDC 2015. Perceptions of antimicrobial usage, antimicrobial resistance and policy measures to reduce antimicrobial usage in convenient samples of Belgian, French, German, Swedish and Swiss pig farmers. *Preventive Veterinary Medicine* 119, 10-20.

Vondruskova H, Slamova R, Trekova M, Zraly Z y Pavli I 2010. Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhea in weaned piglets: a review. *Veterinary Medicine* 55, 199-224.

Wales AD, Gosling RJ, Bare HL y Davies RH 2021. Disinfectant testing for veterinary and agricultural applications: A review. *Zoonoses and Public Health* 68, 361-375.

Walia K, Argüello H, Lynch H, Leonard FC, Grant J, Yearsley D, Kelly S, Duffy G, Gardiner GE y Lawlor PG 2017. Effect of strategic administration of an encapsulated blend of formic acid, citric acid, and essential oils on *Salmonella* carriage, seroprevalence, and growth of finishing pigs. *Preventive Veterinary Medicine* 137, 28-35.

Wang R, Li S, Jia H, Si X, Lei Y, Lyu J, Dai Z y Wu Z 2021. Protective effects of cinnamaldehyde on the inflammatory response, oxidative stress, and apoptosis in liver of *Salmonella* Typhimurium-challenged

## 6. Bibliografía

---

mice. *Molecules* 26, 2309.

Wang WJ, Wang L, Liu Z, Jiang RW, Liu ZW, Li MM, Zhang QW, Dai Y, Li YL, Zhang XQ y Ye WC 2016. Antiviral benzofurans from *Eupatorium chinense*. *Phytochemistry* 122, 238-245.

Wani AR, Yadav K, Khursheed A y Rather MA 2021. An updated and comprehensive review of the antiviral potential of essential oils and their chemical constituents with special focus on their mechanism of action against various influenza and coronaviruses. *Microbial Pathogenesis* 152, 104620.

Webber M, Whitehead R, Mount M, Loman N, Pallen M y Piddock L 2015. Parallel evolutionary pathways to antibiotic resistance selected by biocide exposure. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70, 2241-2248.

Wei HK, Xue HX, Zhou ZX y Peng J 2017. A carvacrol–thymol blend decreased intestinal oxidative stress and influenced selected microbes without changing the messenger RNA levels of tight junction proteins in jejunal mucosa of weaning piglets. *Animal* 11, 193-201.

Weng L, Weersink A, Poljak Z, de Lange K y von Massow M 2016. An economic evaluation of intervention strategies for Porcine Epidemic Diarrhea (PED). *Preventive Veterinary Medicine* 134, 58-68.

Wenk C 2003. Herbs and botanicals as feed additives in monogastric animals. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 16, 282-289.

Wiegand I, Hilpert K y Hancock REW 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration ( MIC ) of antimicrobial substances. 3, 163-175.

Wildbrett G 2000. Limpieza y desinfección en la industria alimentaria. Ed. Acribia.

Windisch W, Schedle K, Plitzner C y Kroismayr A 2008. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *Journal of Animal Science* 86, 140-148.

Wińska K, Mączka W, Łyczko J, Grabarczyk M, Czubaszek A y Szumny A 2019. Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative? *Molecules* 24, 2130.

Wirtanen G y Salo S 2003. Disinfection in food processing – efficacy testing of disinfectants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 2, 293-306.

van der Wolf P, van Schie F, Elbers A, Engel B, van der Heijden H, Hunneman W y Tielen M 2001. Administration of acidified drinking water to finishing pigs in order to prevent *Salmonella* infections. *The Veterinary Quarterly* 23, 121-125.

Wondrak GT, Villeneuve NF, Lamore SD, Bause AS, Jiang T y Zhang DD 2010. The cinnamon-derived dietary factor cinnamic aldehyde activates the Nrf2-dependent antioxidant response in human epithelial colon cells. *Molecules* 15, 3338.

Woods A 2011. A historical synopsis of farm animal disease and public policy in twentieth century Britain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 366, 1943.

Xiong M, Bao Y, Yang X, Zhu Y y Wang J 2014. Delivery of antibiotics with polymeric particles. *Advanced Drug Delivery Reviews* 78, 63-76.

Yan Jer N, Pei En T, Kuan Shiong K, Chin Kui C, Kit Wayne C y Pau Loke S 2021. A comprehensive review on the techniques for coconut oil extraction and its application. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 44, 1.

Yang H-T, Chen J-W, Rathod J, Jiang Y-Z, Tsai P-J, Hung Y-P, Ko W-C, Paredes-Sabja D y Huang I-H 2018. Lauric Acid is an inhibitor of *Clostridium difficile* growth in vitro and reduces inflammation in a mouse infection model. *Frontiers in Microbiology* 8, 2635.

Yang C, Chowdhury MA, Huo Y y Gong J 2015. Phytogetic Compounds as alternatives to in-feed antibiotics: potentials and challenges in application. *Pathogens* 4, 137-156.

Yang H, Paruch L, Chen X, van Eerde A, Skomedal H, Wang Y, Liu D y Clarke JL 2019a. Antibiotic application and resistance in swine production in China: Current situation and future perspectives. *Frontiers in Veterinary Science* 6, 136.

Yang C, Zhang L, Cao G, Feng J, Yue M, Xu Y, Dai B, Han Q y Guo X 2019b. 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. *Journal of Animal Science* 97, 133-143.

Yazdankhah S, Rudi K y Bernhoft A 2014. Zinc and copper in animal feed – development of resistance and co-resistance to antimicrobial agents in bacteria of animal origin. *Microbial Ecology in Health & Disease* 25, 10.3402/mehd.v25.25862.

Ye-Won I, Jung-Ji K, Hyun-Jung K y Se-Wook O 2013. Antimicrobial activities of acetic acid, citric acid and lactic acid against *Shigella* species. *Journal of Food Safety* 33, 79-85.

Ye ZW, Yuan S, Yuen KS, Fung SY, Chan CP y Jin DY 2020. Zoonotic origins of human coronaviruses. *International Journal of Biological Sciences* 16, 1686-1697.

Yoon BK, Jackman JA, Valle-González ER y Cho N-J 2018. Antibacterial free fatty acids and monoglycerides: Biological activities, experimental testing, and therapeutic applications. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 1114.

Zadrazilova I, Pospisilova S, Pauk K, Imramovsky A, Vinsova J, Cizek A y Jampilek J 2015. *In vitro* bactericidal activity of 4- and 5-chloro-2-hydroxy-n-[1-oxo-1-(phenylamino)alkan-2-yl]benzamides against MRSA. *BioMed Research International* 2015, 349534.

Zeeh F, Vidondo B y Nathues H 2020. Risk factors for the infection with *Brachyspira hyodysenteriae* in pig herds. *Preventive Veterinary Medicine* 174, 104819.

Zeng Z, Xu X, Zhang Q, Li P, Zhao P, Li Q, Liu J y Piao X 2015. Effects of essential oil supplementation of a low-energy diet on performance, intestinal morphology and microflora, immune properties and antioxidant activities in weaned pigs. *Animal Science Journal* 86, 279-285.

Zhai H, Liu H, Wang S, Wu J y Kluentner A-M 2018. Potential of essential oils for poultry and pigs. *Animal Nutrition* 4, 179-186.

Zhang J, Ye K-P, Zhang X, Pan D-D, Sun Y-Y y Cao J-X 2016. Antibacterial activity and mechanism of action of black pepper essential oil on meat-borne *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology* 7, 2094.

Zou Y, Wang J, Peng J y Wei H 2016. Oregano essential oil induces SOD1 and GSH expression through Nrf2 activation and alleviates hydrogen peroxide-induced oxidative damage in IPEC-J2 cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016, 5987183.